Optimierung einer lokalanästhesierenden topischen Arzneiform für die Pädiatrie

Diplomarbeit zur Erlangung des
Fachapothekertitels FPH in Spitalpharmazie

Eingereicht von Manuela Endres

Frühling 2006

Diplomandin	Weiterbildnerin
Manuela Endres	Dr. phil. nat. R. Leu Marseiler
Spital-Pharmazie Spitalstrasse 26 4031 Basel	Spital-Pharmazie Spitalstrasse 26 4031 Basel

1 ZUSAMMENFASSUNG 5
2 AUSGANGSLAGE 6
3 ZIELSETZUNG 7
4 THEORETISCHER TEIL 8
4.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN 8
4.1.1 GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK 8
4.1.2 ALLGEMEINER WIRKUNGSMECHANISMUS VON LOKALANÄSTHETIKA 9
4.1.3 UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN DER LOKALANÄSTHETIKA 11
4.1.3.1 Wirkung auf das ZNS 11
4.1.3.2 Wirkung auf das Herz 11
4.2 TAP-LÖSUNG 12
4.3 HERSTELLUNGSVERFAHREN VON TAP-LÖSUNG 12
4.3.1 CHEMISCH-PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON TETRACAINHYDROCHLORID, PROXYMETACAINHYDROCHLORID UND ADRENALINTARTRAT 14
4.3.1.1 Stabilität von Tetracainhydrochlorid, Proxymetacainhydrochlorid und Adrenalintartrat 16
4.3.1.1.1 Abbauprodukte von Tetracain, Proxymetacain und Adrenalin 17
4.3.2 PHARMAKOLOGIE VON TETRACAIN, PROXYMETACAIN UND ADRENALIN 18
4.3.2.1 Tetracain 18
4.3.2.2 Proxymetacain 19
4.3.2.3 Adrenalin 20
4.3.3 HILFSSTOFFE DER TAP LÖSUNG 22
4.3.3.1 Natriumchlorid 22
4.3.3.2 Natriummetabisulfit 22
4.3.3.3 Ascorbinsäure 25
4.4 FAKTOREN DESIGN 27
4.4.1 AUSWERTUNG DES FAKTOREN DESIGNS 28
4.4.1.1 Berechnung der Effekte 28
4.4.1.2 Statistische Bewertung der Effekte 29
4.4.1.3 Statistische Bewertung der Effekte des Faktoren Designs 29
4.4.1.3.1 Statistische Bewertung mit der Dreifachwechselwirkung ABC als Varianz des Versuchsfehlers 29
4.4.1.3.2 Statistische Bewertung mit Wiederholversuchen als Varianz 30
des Versuchsfehlers 30

4.4.1.3.3 Interpretation der Ergebnisse 31
4.5 OPTIMIERUNG DER FORMULIERUNG UND DES HERSTELLPROZESSES 32
4.5.1 EINFLUSSGRÖSSEN AUF DIE STABILITÄT VON TAP-LÖSUNG 33
4.5.1.1 Auswahl eines geeigneten Schutzgases 33
4.5.1.2 Unterschiedliche Konzentrationen an Natriummetabisulfit 34
4.5.1.3 Ascorbinsäure als alternatives Antioxidans zu Natriummetabisulfit 34
4.5.1.4 Handabfüllung oder Ampullenabfüllmaschine 34
4.5.1.5 Keimfiltration oder Autoklavieren 35
4.5.2 ENDGÜLTIGES FAKTOREN DESIGN 36
4.5.2.1 Versuchsplanung 37
4.5.3 AUSWERTUNG DES FAKTOREN DESIGNS 38
5 MATERIAL UND GERÄTE 39
5.1 ARZNEISTOFFE UND CHEMIKALIEN 39
5.2 MATERIAL 40
5.3 GERÄTE HERSTELLUNG 41
5.4 GERÄTE ANALYTIK 41
6 METHODEN 42
6.1 METHODEN HERSTELLUNG 42
6.1.1 AUSWAHL EINES GEEIGNETEN SCHUTZGASES 42
6.1.2 HERSTELLUNG DER TAP-LÖSUNGEN GEMÄSS FAKTOREN DESIGN 42
6.1.3 AUTOKLAVIEREN DER TAP-LÖSUNGEN 42
6.2 METHODEN ANALYTIK 43
6.2.1 BESTIMMUNG DER OSMOLALITÄT 43
6.2.2 BESTIMMUNG DES PH-WERTES 43
6.2.3 FARBE UND KLARHEIT 43
6.2.4 GEHALTSBESTIMMUNG VON ADRENALINTARTRAT 44
6.2.5 GEHALTSBESTIMMUNG VON TETRACAIN- UND PROXYMETACAINHYDROCHLORID 45
7 RESULTATE UND DISKUSSION 47
7.1 RESULTATE DES FAKTOREN DESIGNS 47
7.1.1 ADRENALINTARTRAT UND FAKTOR A 49
7.1.2 PROXYMETACAINHYDROCHLORID UND FAKTOR A 50
7.1.3 PROXYMETACAINHYDROCHLORID UND FAKTOR B 50
7.1.4 PROXYMETACAINHYDROCHLORID UND FAKTOR C 50
7.1.5 PROXYMETACAINHYDROCHLORID UND WECHSELWIRKUNG BC 51

7.1.6 TETRACAINHYDROCHLORID UND FAKTOR A 51
7.1.7 TETRACAINHYDROCHLORID UND FAKTOR C 51
7.1.8 KRITISCHE BEWERTUNG DER RESULTATE DES FAKTOREN DESIGNS 52
7.2 WEITERE RESULTATE 54
7.2.1 RESULTATE FARBE UND KLARHEIT 54
7.2.2 RESULTATE PH-WERTE 54
7.2.3 RESULTATE OSMOLALITÄT 54
7.3 WIRKSTOFFGEHALT DER VERSUCHE C UND AB ÜBER 6 MONATE IM VERGLEICH 55
7.4 ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE 57
8 KONKLUSIONEN 58
9 DANKSAGUNG 59
10 VERZEICHNISSE 60
10.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN 60
10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 61
10.3 TABELLENVERZEICHNIS 62
10.4 LITERATURVERZEICHNIS 64
11 ANHANG 67
11.1 DEFEKTURMASSSTAB VON TAP-LÖSUNG 67
11.2 OSMOLALITÄT TAP-LÖSUNG (25X4ML) SEIT 2003 67
11.3 BERECHNUNG ZUR ISOTONISIERUNG 68
11.4 AUSWAHL EINES GEEIGNETEN SCHUTZGASES 72
11.5 BERECHNUNG DER MENGE ASCORBINSÄURE ALS ANTIOXIDANS 73
11.6 LÖSUNGEN FÜR DIE ANALYTIK 74
11.7 EINZELAUSWERTUNGEN: ABC UND WIEDERHOLVERSUCHEN ALS VARIANZ DES VERSUCHSFEHLERS 75
11.8 ROHDATEN ZUR GEHALTSBESTIMMUNG VON TETRACAIN, PROXYMETACAIN, ADRENALIN ÜBER 6 MONATE 77
11.9 ROHDATEN: PH-WERT 81
11.10 ROHDATEN: FARBE UND KLARHEIT 82
11.11 ROHDATEN: OSMOLALITÄT 83
12 EXCEL TABELLEN 84

1 Zusammenfassung

Unfallbedingte Wunden sind häufige Ursachen für pädiatrische Notfallkonsultationen. Dabei profitieren Kinder aller Altersgruppen in hohem Maße von der ambulanten Durchführung operativer Eingriffe. Die Wundinfiltration mit Lokalanästhetika stellt für viele Eingriffe in der Kinderchirurgie eine weit verbreitete und einfache Methode dar. Infiltration im Sinne von Umspritzen des Operationsgebietes ist jedoch eine schmerzhafte und traumatisierende Prozedur.

Im Universitätskinderspital beider Basel (UKBB) wird für den Verschluss von Hautwunden ein von der Spital-Pharmazie des USB speziell gemischtes Oberflächenpräparat, die TAP-Lösung (**T**etracainhydrochlorid, **A**drenalintartrat und **P**roxymetacainhydrochlorid), verwendet. Als Antioxidans ist Natriummetabisulfit enthalten. TAP-Lösung wird im Defekturmassstab hergestellt.

Im Rahmen einer Beanstandung wurden Produktmängel im Zusammenhang mit TAP-Lösung offensichtlich. Bei gewissen Chargen zeigte der Inhalt vereinzelter Stechampullen einer Originalpackung eine rot-braune statt eine farblose Lösung. Als Ursache für die Verfärbung wurde die Reaktion des Adrenalintartrates mit Luftsauerstoff in Betracht gezogen. Aufgrund der Beanstandung wurden die Zusammensetzung von TAP-Lösung sowie der Herstellungsprozess in Frage gestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die TAP-Lösung bezüglich Zusammensetzung, Herstellungsprozess und Stabilität optimiert werden.

Es wurde ein 2^3 Faktoren Design geplant und durchgeführt. Als Faktoren wurden Handbegasung versus automatisierte Begasung, Natriummetabisulfit versus Ascorbinsäure als Antioxidantien sowie Autoklavieren versus Keimfiltration getestet. Als Zielgrösse zur Auswertung des Faktoren Designs dienten die Wirkstoff-Gehalte von Adrenalintartrat, Proxymetacainhydrochlorid und Tetracainhydrochlorid, die mittels HPLC bestimmt wurden. Weiterhin wurden von den Proben des Faktoren Designs der pH-Wert sowie die Farbe und Klarheit bestimmt. Die Proben aus den Versuchen des Faktoren Designs wurden für 6 Monate zur Untersuchung der Stabilität bei 2-8°C, bei 15-25°C und bei 40ºC gelagert.

Die Auswertung des Faktoren Designs ergab einen signifikanten Wirkstoffverlust durch Autoklavieren für Adrenalintartrat, einen signifikanten Wirkstoffverlust durch Handbegasung für Proxymetacainhydrochlorid und einen stabilisierenden Effekt durch Natriummetabisulfit. Bezüglich des pH-Wertes lagen alle Versuche innerhalb der geforderten Grenzen von 3,0 bis 5,0. Die Osmolalität der Versuche lag ebenfalls innerhalb der geforderten Grenzen von 281-297mOsmol/kg. Für den Prüfparameter Farbe und Klarheit konnte festgestellt werden, dass die Versuche, die mit Handbegasung hergestellt wurden, verfärbt waren und somit den Anforderungen an diese Prüfung nicht mehr entsprachen. Für die Herstellung von TAP-Lösung kann aufgrund der Ergebnisse folgendes festgelegt werden: Die Lösung kann nicht autoklaviert werden, sie muss weiterhin keimfiltriert werden. Natriummetabisulfit hat sich als Antioxidans behauptet. Das Faktoren Design hat jedoch gezeigt, dass unter Einsatz einer automatisierten Begasungsmethode die Stabilität von TAP-Lösung verbessert werden kann. Daher wird die Evaluation eines geeigneten Gerätes für die Abfüllung- und Begasung von sauerstoffempfindlichen Lösungen empfohlen.

2 Ausgangslage

Unfallbedingte Wunden sind eine häufige Ursache für pädiatrische Notfallkonsultationen. Dabei profitieren Kinder aller Altersgruppen in hohem Maße von der ambulanten Durchführung operativer Eingriffe. Die Wundinfiltration mit Lokalanästhetika stellt für viele Eingriffe in der Kinderchirurgie eine weit verbreitete und einfache Methode dar.

Infiltration – im Sinne von Umspritzen des Operationsgebietes – ist jedoch eine schmerzhafte und traumatisierende Prozedur für Kinder. In den vergangenen Jahren ist aus diesem Grund nach alternativen Anästhesiemethoden gesucht worden. Dabei wurde der Oberflächenanästhesie immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Eine effektive Oberflächenanästhesie kann einer Lokalanästhesie vorausgehen oder diese sogar ersetzen. In den USA sind die Oberflächenpräparate TAC (Tetracain 0,5%, Adrenalin 1:2000, Cocain 4-11,8%) und LET (Lidocain 4%, Adrenalin 1:1000, Tetracain 0,5%) in Gebrauch [21]. Bei der Verwendung von Präparaten mit Cocain wurden unerwünschte Wirkungen wie Bluthochdruck, Krämpfe und Tod beschrieben [1]. Terndrup et al konnten in einer Studie Metabolite von Cocain im Plasma von Kindern nachweisen [2]. Als Betäubungsmittel bringt Cocain zudem arbeitsintensive Kontroll- und Abgabemodalitäten mit sich, die im Rahmen des Betäubungsmittelgesetzes einzuhalten sind.

Mit diesem Hintergrund sind alternative Formulierungen zur Oberflächenanästhesie in der Pädiatrie in der Vergangenheit auf ihre Wirksamkeit getestet worden. LET (Lidocain, Epinephrin, Tetracain), Bupivanor (Bupivacain, Norepinephrin), TLE (Topisches Lidocain-Epinephrin) sind hier als nur einige Beispiele zu nennen [3, 4, 5]. Für die topische Oberflächenanästhesie sind zum einen das Arzneimittel Emla® in der Schweiz und zum anderen Ametop® in Kanada und Amerika zugelassen. Beide Arzneimittel sind jedoch für die Applikation auf intakter Haut bzw. Genitalschleimhaut bestimmt. Ein Produkt für die Oberflächenanästhesie von Wunden in der Pädiatrie ist derzeit auf dem Schweizer Arzneimittelmarkt nicht zugelassen.

Im Universitätskinderspital beider Basel (UKBB) wird für den Verschluss von Hautwunden ein von der Spital-Pharmazie des USB speziell gemischtes Oberflächenpräparat, die TAP-Lösung, verwendet. Der Name des Produktes setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der enthaltenen Wirkstoffe Tetracainhydrochlorid, Adrenalintartrat und Proxymetacainhydrochlorid zusammen. Weiterhin ist Natriummetabisulfit als Antioxidans enthalten. TAP-Lösung wird im Defekturmassstab hergestellt. In den Jahren 2002-2005 sind 1150 bis 1275 Stechampullen pro Jahr produziert worden, entsprechend 46 - 51 Originalpackungen (vgl. Tabelle 11-1).

Im Rahmen einer 2002 erfassten Beanstandung wurden Produktmängel im Zusammenhang mit TAP-Lösung offensichtlich. Bei gewissen Chargen zeigte der Inhalt vereinzelter Stechampullen einer Originalpackung eine rot-braune statt eine farblose Lösung. Als Ursache für die Verfärbung wurde die Reaktion des Adrenalintartrates mit Luftsauerstoff in Betracht gezogen. Eine ungenügende Begasung der Stechampulle mit Medizinalstickstoff während der Herstellung, undichtes Stopfenmaterial oder eine beschädigte Stechampulle könnten Grund für die Reaktion des Adrenalintartrates mit Luftsauerstoff darstellen [36]. Aufgrund der Beanstandung wurden die Zusammensetzung und der Herstellungsprozess von TAP-Lösung in Frage gestellt.

3 Zielsetzung

Um in Zukunft eine gleichbleibend einwandfreie Qualität von TAP-Lösung zu garantieren, wurden die Formulierung der TAP-Lösung bezüglich der eingesetzten Hilfsstoffe sowie das Herstellungsverfahren optimiert. Ziel ist eine möglichst stabile Formulierung mit einer Mindestlaufzeit von 6 Monaten zu evaluieren. Für die antimikrobielle Behandlung wäre das Autoklavieren der TAP-Lösung wünschenswert.

Als Optimierungsansätze für die Formulierung und für den Herstellungsprozess sind folgende Punkte berücksichtigt worden:

- Auswahl eines geeigneten Schutzgases
- Evaluation eines alternativen Antioxidans
- Standardisierung des Herstellungsprozesses durch Automatisierung der Abfüllung und der Begasung
- Autoklavierbarkeit der Lösung
- Isotonisierung der Formulierung

Eine Eignungsprüfung von Hilfsstoffen und Herstellungsverfahren erfolgte mit Hilfe eines statistisch auswertbaren faktoriellen Versuchplanes.

Die aus diesen Optimierungsversuchen resultierenden Formulierungen sind für Stabilitätsprüfungen über einen Zeitraum von 6 Monaten bei Raumtemperatur (15-25°C), im Kühlraum (2-8°C) und bei 40°C eingelagert worden.

4 Theoretischer Teil

4.1 Allgemeine Grundlagen

4.1.1 Geschichtlicher Überblick

In der Geschichte der Lokalanästhetika gibt es zwei Höhepunkte:

1884 mit der Einführung von Cocain in Europa und 1905 mit der Entdeckung von Procain.

Cocain ist die erste natürlich vorkommende Substanz, an der eine anästhesierende Wirkung beobachtet worden ist. Durch die Eroberung Perus um 1530 durch Pizzaro war den Europäern die Existenz einer bemerkenswerten Pflanze – von den Ureinwohnern als „khoka“ (Pflanze) bezeichnet - bekannt geworden. Durch das Kauen der Blätter wurde eine euphorisierende Wirkung entfaltet [6].

Der Coca Strauch (Erythroxylum coca Lam., Fam. Erythroxylaceae) wird in Südamerika seit langer Zeit kultiviert, ein Wildvorkommen ist unbekannt [7]. Im kulturellen und religiösen Leben der Ureinwohner Südamerikas spielte der Coca Strauch eine wichtige Rolle – er hatte das Ansehen einer göttlichen Pflanze und fand als Aufputsch- und Rauschmittel Anwendung.

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts brachte der Österreichische Naturforscher Carl von Scherzer zum ersten Mal Coca Blätter in einer für Analysen ausreichenden Menge mit nach Europa. In den Jahren 1859/60 gelang es dem Chemiker Albert Niemann das Hauptalkaloid der Kokapflanze zu isolieren. Er nannte das Alkaloid Cocain [6].

Knapp 25 Jahre später berichtete der Wiener Ophthalmologe Carl Koller auf einem Ophthalmologen Kongress, dass sich Cocain zur Schmerzausschaltung bei Operationen am Auge eignet. Damit hielt 1884 Cocain als erstes Lokalanästhetikum Einzug in die klinische Anwendung [19].

Kollers Entdeckung wurde als bahnbrechend angesehen und ging in kürzester Zeit um die Welt. Die Methode fand viele Nachahmer, es folgte eine Welle von Untersuchungen nicht nur am Auge, sondern auch an anderen Körperregionen. Mit der klinischen Anwendung von Cocain wurden aber auch seine Schattenseiten schnell ersichtlich. Die zentralnervösen und kardiotoxischen Nebenwirkungen wurden in der ersten Euphorie völlig unterschätzt. So wurde bis 1888 über mehr als 30 Todesfälle unter der Verwendung von Cocain berichtet, die Dunkelziffer der Todesfälle lag jedoch weitaus höher [6].

Aus heutiger Sicht ist klar, dass aufgrund des Nebenwirkungsprofils und des hohen Suchtpotentiales von Cocain Koller mit seiner Entdeckung keinen Erfolg erzielen konnte. Der Ruf nach alternativen, weniger toxischen Substanzen wurde laut.

Mit Cocain als Modellsubstanz gelang es 1905 dem deutschen Chemiker Einhorn, Procain zu synthetisieren. Procain war das erste Lokalanästhetikum, dass gut zur Injektion geeignet und klinisch nutzbar war. 1905 wurde Procain von Heinrich Braun in die chirurgische Praxis eingeführt und verdrängte das Cocain vor allem wegen seiner geringeren Toxizität. In den Folgejahren sind zahlreiche Verbindungen mit ähnlicher Struktur (Esterverbindungen) entwickelt worden. Vor allem Tetracain und Chlorprocain waren häufig genutzte Lokalanästhetika [46].

Lokalanästhetika mit Esterstruktur haben den Nachteil, dass sie schnell durch Plasmaesterasen gespalten und somit unwirksam werden. Durch die Kopplung eines Substituenten an den Ring des Tetracains und durch den Ersatz der Esterbindung durch eine Säureamidbindung in der Zwischenkette der Lokalanästhetika versuchte man den schnellen Wirkungsverlust zu verhindern. Mit dieser Modifikation gelang Löfgren 1943 die Synthese der Amid-Lokalanästhetika.

Diese neue Wirkstoffgruppe wies Vorteile bezüglich Wirkungsdauer und –intensität gegenüber den bis dahin eingesetzten Ester – Lokalanästhetika auf. Dem Lidocain folgten weitere Substanzen wie z.B. Mepivacain, Prilocain, Bupivacain (1963), Etidocain und schliesslich Ropivacain [46].

4.1.2 Allgemeiner Wirkungsmechanismus von Lokalanästhetika

Lokalanästhetika heben reversibel und örtlich begrenzt die Erregbarkeit und das Leitungsvermögen von Nervenfasern auf.

Lokalanästhetika blockieren spannungsabhängige Natriumkanäle und verhindern somit die Bildung von Aktionspotentialen.

Die Reihenfolge und der Grad der Anästhesie sind abhängig vom Durchmesser und Typ der Nervenfasern. Die Blockade der verschiedenen Nervenfasertypen erfolgt im Prinzip in der Reihenfolge B-, C-, Aδ-, Aγ-, Aβ-, Aα-Fasern. Dies bedeutet, dass zuerst Vasokonstriktion, dann das Schmerz-, Wärme-/Kälte-, Berührungs-, Druckempfinden und zuletzt die Motorik ausgeschaltet werden.

Alle Lokalanästhetika sind schwache Basen und liegen bei physiologischem pH-Wert in geladener und ungeladener Form vor. Der Wirkungsort von Lokalanästhetika liegt an der Innenseite der Natriumkanäle in der Zellmembran, daher ist eine Diffusion der Substanzen in das Zellplasma notwendig. Nur die ungeladene Base kann durch die Zellmembran ins Innere gelangen. Dort erfolgt die Protonierung in die geladene Form, welche auch die aktive Form des Lokalanästhetikums darstellt. Bei Verringerung des physiologischen pH-Wertes des Gewebes durch z.B. eine Entzündung liegt ein geringerer Anteil des Lokalanästhetikums in ungeladener Form vor und gelangt damit in geringerer Konzentration in die Nervenzelle. In solchem Gewebe muss also mit abgeschwächter Wirkung gerechnet werden.

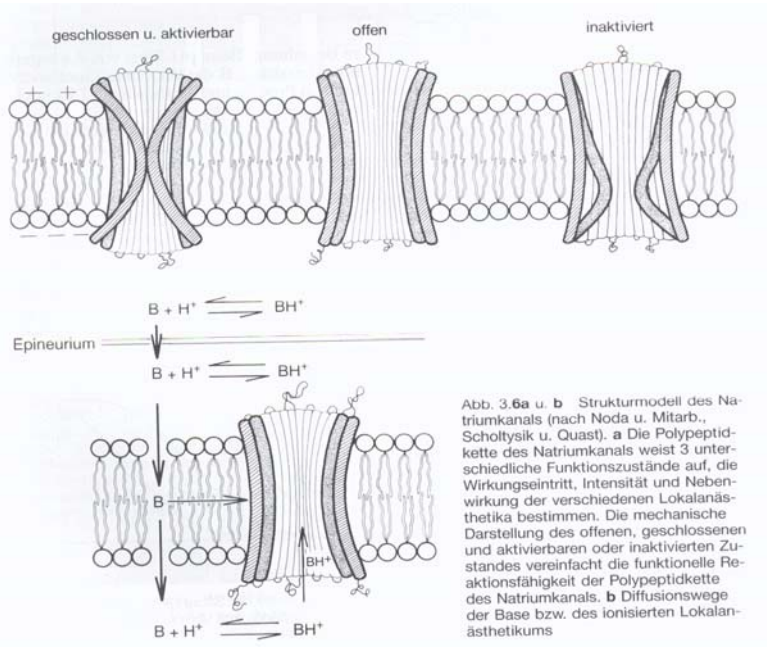

Abbildung 4-1: Wirkungsmechanismus von Lokalanästhetika [39]

Die **pharmakodynamischen Eigenschaften** eines Lokalanästhetikums hängen von seinen **physikochemischen Eigenschaften** ab.

Für die pharmakodynamischen Eigenschaften eines Lokalanästhetikums sind Parameter wie lokalanästhetische Potenz, Anschlagzeit und Wirkungsdauer entscheidend.

Die **lokalanästhetische Potenz** eines Lokalanästhetikums korreliert in etwa mit seiner Lipophilie. Gut fettlösliche Substanzen sind potente Lokalanästhetika. Ein Parameter für die Fettlöslichkeit ist der Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient. Je grösser der Wert für diesen Koeffizienten ist, desto lipophiler und schlussendlich potenter ist eine Substanz. Bei gut fettlöslichen, potenten Lokalanästhetika ist die Anschlagzeit verkürzt. Die Potenz eines Lokalanästhetikums ist auch noch von Faktoren wie z. B. der vasodilatierenden Eigenschaften abhängig. Lokalanästhetika mit stark vasodilatierenden Eigenschaften wie z.B. das Lidocain werden ohne vasokonstriktorischen Zusatz schneller aus dem Gewebe abtransportiert [47].

Die **Anschlagzeit** eines Lokalanästhetikums ist abhängig von dem pK_a Wert der jeweiligen Substanz. Der pk_a Wert entspricht demjenigen pH-Wert, bei dem die Substanz zu 50% in ionisierter und zu 50% in nicht ionisierter Form vorliegt. Die ungeladene Form eines Lokalanästhetikums ist für die Diffusion durch die Nervenhülle verantwortlich. Der physiologische pH-Wert des Gewebes liegt normalerweise bei 7,4. Je höher der pK_a Wert eines Lokalanästhetikums über dem pH-Wert des Gewebes liegt, desto weniger freie Base und damit diffusionsfähige Moleküle stehen zur Verfügung. Der pK_a Wert vieler Lokalanästhetika liegt über dem Wert von 7,4. Da das Gewebemilieu im Vergleich zum pK_a Wert saurer ist, wird das Gleichgewicht zwischen geladener und ungeladener Form auf die Seite der geladenen Form verschoben, was die Diffusionsfähigkeit des Lokalanästhetikums verschlechtert [47].

Je stärker ein Lokalanästhetikum an Proteine bindet, desto länger ist auch seine **Wirkungsdauer**. Ein Mass für die Bindung einer Substanz an Proteine ist die Plasmaproteinbindung. Mit zunehmender Proteinbindung nimmt auch die Kardiotoxizität zu [47].

4.1.3 Unerwünschte Wirkungen der Lokalanästhetika

Bei der Applikation von Lokalanästhetika können kardiotoxische, anaphylaktische und weitere unerwünschte Wirkungen auftreten. Häufig sind den Lokalanästhetika noch Vasokonstriktoren oder Antioxidantien beigefügt, die ebenfalls Nebenwirkungen hervorrufen können [10].

Toxische Reaktionen können vor allem durch die versehentliche intravasale Applikation, durch abnorme Resorptionsverhältnisse, durch Überschreitung von empfohlenen Grenzdosen, durch erniedrigte Toleranzgrenze (Allergie) oder pathologisch veränderten Metabolismus (Leberschaden, genetisch bedingter Pseudocholinesterase Mangel) zu Stande kommen.

Lokalanästhetika können prinzipiell an allen erregbaren Zellen ihre unerwünschten Wirkungen ausüben, vorausgesetzt, sie fluten in ausreichend hoher Konzentration an und die toxische Schwellendosis wird überschritten. So sind in erster Linie die Neurone des Zentralen Nervensystems (ZNS) und das Reizleitungssystem des Herzens betroffen [10].

4.1.3.1 Wirkung auf das ZNS

Normalerweise stehen das ZNS hemmende (inhibitorische) und das ZNS erregende (exzitatorische) Neurone im Gleichgewicht. Konzentrationsabhängig werden durch Lokalanästhetika zuerst die inhibitorischen Neurone gehemmt. Damit überwiegen die exzitatorischen Neurone und es treten Erregungszustände mit Kopfschmerzen, metallischem Geschmack, Kribbeln, Taubheitsgefühl auf Zunge und Lippen, Unruhe, Benommenheit, Desorientierung, Schwindel etc. auf. Bei hohen toxischen Blutkonzentrationen kommt es dann auch zu einer Blockierung der exzitatorischen Neurone mit einer Depression des Gehirns mit Bewusstlosigkeit, zentraler Atemdepression und zentral vermitteltem Kreislaufversagen [9].

4.1.3.2 Wirkung auf das Herz

Lokalanästhetika zeigen nach intravenöser Injektion eine deutliche Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem. Diese äussert sich durch eine verminderte Leitungsgeschwindigkeit am Herzen, einer verminderten Kontraktionskraft und einer Verringerung des Auswurfvolumens. Diese Wirkungen sind nicht nur von toxikologischem Interesse sondern auch von therapeutischem, da Lokalanästhetika wie z.B. Lidocain zur Behandlung von Arrhytmien eingesetzt werden [9].

4.2 TAP-Lösung

Die TAP-Lösung, die 2002 zu der Beanstandung führte, hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 4-1: Zusammensetzung von TAP-Lösung

Substanz	Menge
Tetracainhydrochlorid	5mg
Proxymetacainhydrochlorid	5mg
Adrenalintartrat	0,5mg
Natriummetabisulfit	0,5mg
Natriumchlorid	225µg
Wasser für Injektionszwecke	ad 1,00ml

4.3 Herstellungsverfahren von TAP-Lösung

Der Herstellungsprozess von TAP-Lösung sieht derzeit wie folgt aus:

Die standardmässige Ansatzgrösse für die Herstellung von TAP-Lösung beträgt 2 Liter. Wasser für Injektionszwecke (WFI) wird in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Mit einem Glasrohr, das bis auf den Boden des Erlenmeyerkolbens ragt, wird das WFI mit Stickstoff begast. Die Zeitdauer der Begasung ist nicht genau definiert. Mit diesem begasten Wasser werden die einzelnen Substanzen aufgelöst. Die fertige Wirkstofflösung wird mit Medizinalstickstoff geflutet. Die Lösung wird durch einen 0,2µm Filter keimfrei filtriert und unter aseptischen Bedingungen in farblose Stechampullen mit Hilfe der Abfüllpumpe Baxa portioniert. Das Nennvolumen beträgt 4ml Lösung pro Stechampulle. Zum Verschliessen der Stechampullen dienen Gummistopfen. Ist die Lösung in die Stechampulle gefüllt, so wird der Gummistopfen locker auf die Stechampulle aufgesetzt. Sind eine gewisse Anzahl an Stechampullen mit Lösung gefüllt, so werden die Gummistopfen mit einer Pinzette angehoben und der Kopfraum der Stechampullen wird mit Stickstoff von Hand begast. Die Dauer der Begasung ist auch hier nicht eindeutig festgelegt. Anschliessend werden die Gummistopfen fest angedrückt und die Stechampullen mit Alu-Abreisskappen verschlossen. Nach der Etikettierung werden die einzelnen Stechampullen in Kartonfaltschachteln zu je 25 Stechampullen pro Faltschachtel sekundär verpackt. Die Kartonfaltschachteln dienen nebst der Definition der Packungsgrösse auch noch als Lichtschutz. Originalpackungen mit je 25 Stechampullen stellen die Abgabeeinheiten dar wie sie von den Kunden der Spital-Pharmazie bezogen werden können.

An die unter Kapitel 4.3 hergestellte TAP-Lösung werden derzeit folgende Anforderungen gestellt:

Tabelle 4-2: Anforderungen an TAP-Lösung

Menge / Einheit:	Füllmenge	3,6-4,4g
Eigenschaft:	klare und farblose Flüssigkeit	entspricht
Identität:	Proxymetacain	entspricht
	Tetracain	entspricht
	Adrenalin	entspricht
	Chlorid	entspricht
Gehalt:	Proxymetacain HCl	4,75-5,25g/L
	Tetracain HCl	4,75-5,25g/L
	Adrenalinbitartrat	450-550mg/L
Reinheit:	Farbe und Klarheit	entspricht
pH-Wert:		3,0-5,0
Osmolalität		120-160mosm/kg
Steriltest:		steril
Lagerungsbedingungen		Raumbedingungen
Verwendungsdauer		6 Monate

4.3.1 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Tetracainhydrochlorid, Proxymetacainhydrochlorid und Adrenalintartrat

In den Abbildung 4-2 bis Abbildung 4-4 sind die Strukturformeln der Wirkstoffe, die in der TAP-Lösung enthalten sind, dargestellt:

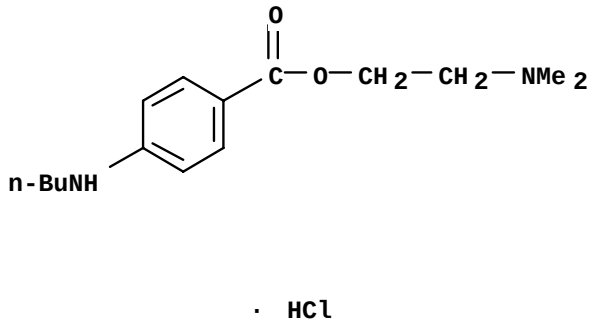

Abbildung 4-2:
Strukturformel von Tetracainhydrochlorid

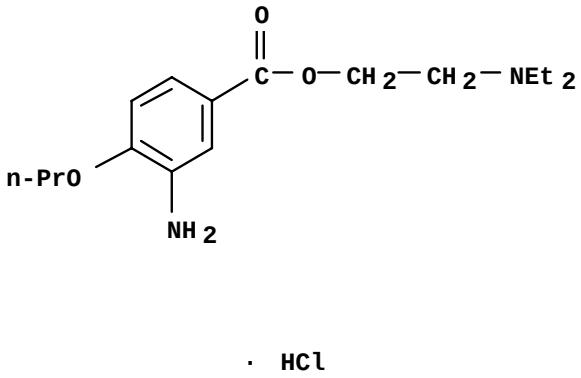

Abbildung 4-3:
Strukturformel von Proxymetacainhydrochlorid

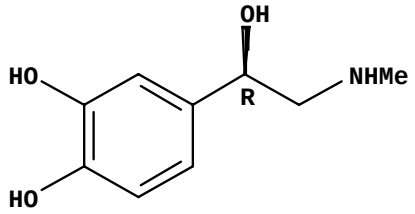

Abbildung 4-4: Strukturformel von Adrenalin

In Tabelle 4-3 sind die chemisch-physikalischen Eigenschaften der in der TAP-Lösung eingesetzten Wirkstoffe zusammengefasst

Tabelle 4-3: Chemisch-physikalische Eigenschaften von Tetracainhydrochlorid, Proxymetacainhydrochlorid, Adrenalintartrat [35]

	Tetracainhydrochlorid	**Proxymetacainhydrochlorid**	**Adrenalintartrat**
Summenformel	$C_{15}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl$	$C_{16}H_{26}N_2O_3 \cdot HCl$	$C_9H_{13}NO_3 \cdot C_4H_6O_6$
Molare Masse	300,84	330,9	333,3
Arzneibuch-Monographien	PhEur, BP, USP etc.	USP, BP	PhEur, BP, OeAB; PhHelv
pH-Wert	4,5 – 6,5 (1%)	5,7 – 6,4 (1%)	ca. 3,5 (2%)
E-Wert	0,18	0,15	0,18 (1% Epinephrin-hydrogentartrat)
Sterilisations-empfehlung	30 Minuten in strömenden Dampf, Autoklavieren bei pH 4	Keimfiltration unter Inert-begasung	Hitzesterilisation (100ºC 30 Minuten oder 121ºC 20 Minuten) mögl. Bei vertretbarer Zersetzung in sauren Lösungen pH 3,0 – 3,8 mit Antioxidans-Zusatz

4.3.1.1 Stabilität von Tetracainhydrochlorid, Proxymetacainhydrochlorid und Adrenalintartrat

Tetracainhydrochlorid

Wässrige Lösungen von Tetracain sind in einem pH-Bereich von 4-6 stabil, selbst bei 30 minütigem Kochen (bei pH 6 3,5% Zersetzung, bei pH 4 weniger als 1% Zersetzung). In saurem oder alkalischem Milieu erfolgt schnell Hydrolyse. Die Hydrolyseprodukte sind 4-Butylaminobenzoesäure und 2-Dimethylaminoethanol. Das Hydrolyseprodukt 4-Butylaminobenzoesäure ist wenig in Wasser löslich und kann auskristallisieren. Im Sauren findet zusätzlich Abspaltung des Butylrestes und Decarboxylierung der 4-Aminobenzoesäure statt [15]. In Gegenwart von Oxidationsmitteln tritt eine Verfärbung und Geruch nach Buttersäure auf. Lösungen können durch Keimfiltration oder durch Autoklavieren bei 121°C während 30 Minuten und einem pH-Wert von 4-6 sterilisiert werden [16].

Proxymetacainhydrochlorid

Durch Erwärmung oder durch Zutritt von Luft können Lösungen von gelb nach braun verfärben. Eine Verfärbung geht mit einem Wirkungsverlust einher. Für die Aufbewahrung werden gut verschlossene Behältnisse unter Stickstoffbegasung, Lichtschutz sowie eine Lagerung bei 2-10 °C für angebrochene Behältnisse angegeben. Zur Erzielung einer sterilen Arzneiform wird die Keimfiltration unter Inertbegasung empfohlen [14]. Als Hydrolyseprodukte wurden 3-Amino-4-propoxybenzoesäure und Diethylaminoethanol identifiziert. Untersuchungen an Hunden haben gezeigt, dass PPC-haltige Lösungen, die bei Raumtemperatur länger als 2 Wochen gelagert werden, einen Wirkungsverlust erfahren. Bei Lagerung im Kühlschrank war dies jedoch nicht der Fall [13].

Adrenalintartrat

Adrenalin ist sowohl im gelösten als auch im festen Zustand aufgrund seiner Brenzkatechinstruktur oxidationsempfindlich und muss vor Licht und Luft geschützt werden. Das gilt besonders für wässrige Lösungen, die sich im Verlaufe der Zeit rot-braun färben können. Hauptoxidationsprodukt ist das Adrenochrom. Die Zersetzung von Adrenalin-Lösungen bleibt aber nicht auf der Stufe des Adrenochroms stehen. In einer Polymerisationsreaktion entsteht Adrenalin-Schwarz, das strukturell unbekannt ist [17]. Oxidation wird durch ein alkalisches Milieu begünstigt, während Racemisierungen durch das Vorhandensein von Säuren beschleunigt werden. Das Minimum der Reaktionsgeschwindigkeit für beide Prozesse (Oxidation, Racemisierung) liegt im pH-Bereich von 3,0 bis 3,8 d.h. hier herrscht optimale Stabilität [35]. Als Stabilisatoren für adrenalinhaltige Lösungen werden unter anderem Natriummetabisulfit und Ascorbinsäure empfohlen [18, 41].

4.3.1.1.1 Abbauprodukte von Tetracain, Proxymetacain und Adrenalin

Bei der Hydrolyse von Tetracain entstehen 4-Butylaminobenzoesäure und 2-Dimethylaminoethanol (vgl. Abbildung 4-5). Bei der Hydrolyse von Proxymetacain entstehen 3-Amnio-4-propoxybenzoesäure und 2-Diethylaminoethanol (vgl. Abbildung 4-6).

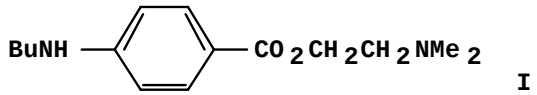

Abbildung 4-5: Strukturformel von 4 Butylaminobenzoesäure

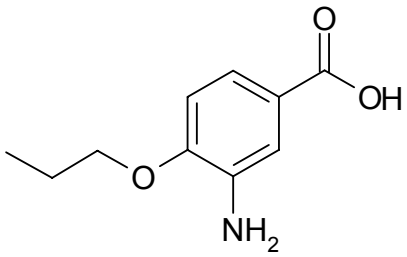

Abbildung 4-6: Strukturformel von 3-Amino-4 - propoxybenzoesäure

Eines der Hauptoxidationsprodukte von Adrenalin ist das Adrenochrom, das von charakteristisch roter Farbe ist.

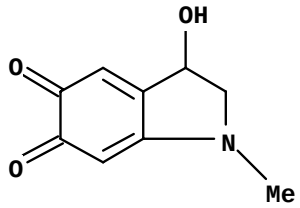

Abbildung 4-7: Strukturformel von Adrenochrom

4.3.2 Pharmakologie von Tetracain, Proxymetacain und Adrenalin

Der allgemeine Wirkungsmechanismus von Lokalanästhetika ist im Kapitel 4.1.2, die unerwünschten Wirkungen sind in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

4.3.2.1 Tetracain

In der folgenden Tabelle ist die Dosierung von Tetracain in Abhängigkeit von der Art der Anwendung dargestellt.

Tabelle 4-4: Art der Anwendung und Dosierung von Tetracain [15, 21]

Art der Anwendung	Dosierung
Oberflächenanästhesie	0,5 – 2,5%
Schleimhautbepinselung	max. 0,5%
Infiltrationsanästhesie	0,1% - 0,25%
Max. Einzeldosis	20mg
Tgl. max. Gesamtdosis	80mg

Für die Anwendung von Tetracain auf Schleimhaut wird eine maximale Konzentration von 5mg/ml (= 0,5%) angegeben. Unter der Annahme, dass der gesamte Inhalt einer Stechampulle (4ml) der TAP-Lösung appliziert und im schlechtesten Falle resorbiert werden würde, ergäbe dies eine Einzeldosis von 20mg Tetracainhydrochlorid. Die Literatur gibt eine maximale Einzeldosis von Tetracain mit 20mg an [15].

Metabolisierung

Tetracain ist ein Lokalanästhetikum mit Esterstruktur. Es wird durch Esterasen des Plasmas und in der Leber hydrolysiert. Es entsteht u. a. Paraaminobenzoesäure, die häufig zu anaphylaktischen Reaktionen führen kann (Paragruppenallergie) [9]. Die Toxizität von Tetracain wird in der Literatur als zehn mal höher im Vergleich zu Procain beschrieben. Im Tetracain Molekül ist die endständige Aminogruppe des aromatischen Ringes mit einer Butylgruppe alkyliert. Aus diesem Grund wird Tetracain vier mal langsamer abgebaut als Procain. Tetracain hat auf Grund seiner Lipophilie eine erhöhte Affinität zum Zentralnervensystem. In der Blutbahn wird Tetracain mit vergleichsweise geringer Geschwindigkeit metabolisiert [15].

4.3.2.2 Proxymetacain

In der folgenden Tabelle ist die Dosierung von Proxymetacain in Abhängigkeit von der Art der Anwendung dargestellt.

Tabelle 4-5: Art der Anwendung und Dosierung von Proxymetacain [15, 23]

Art der Anwendung	Dosierung
Oberflächenanästhesie am Auge	1-2 Tropfen einer 0,5%igen Lösung
Tiefere chirurgische Eingriffe am Auge	4 x 1-2 Tropfen einer 0,5%igen Lösung im Abstand von 5 Minuten
Max. Tagesdosis	10mg (ca. 15 Tropfen einer 0,5%igen Lösung in jedes Auge)

Proxymetacainhydrochlorid ist ein Lokalanästhetikum, das ausschliesslich in der Ophthalmologie angewendet wird. Proxymetacainhydrochlorid ist in Form verschiedener Augentropfen erhältlich. In den meisten Handelsprodukten ist Proxymetacainhydrochlorid in einer Konzentration von 5mg/ml enthalten.

In der TAP-Lösung liegt Proxymetacainhydrochlorid ebenfalls in einer Konzentration von 5mg/ml vor und entspricht somit der gängigen Konzentration der Fertigarzneimittel. Augentropfen mit Proxymetacainhydrochlorid werden nur tropfenweise appliziert. Mit der Anwendung von TAP-Lösung kommt das Proxymetacainhydrochlorid in einer neuen Indikation zum Einsatz. Bei der Anwendung des Inhaltes einer Stechampulle TAP-Lösung (4ml) würden insgesamt 20mg Proxymetacainhydrochlorid appliziert. Diese Dosierung ist doppelt so hoch wie die in der Literatur angegebene maximale Tagesdosis von 20mg. Dosierungshinweise von Proxymetacainhydrochlorid zur topischen Anwendung auf Hautwunden konnten nicht ermittelt werden.

Metabolisierung

Proxymetacainhydrochlorid wird als Lokalanästhetikum vom Estertyp ebenfalls wie Tetracain durch Plasmacholinesterasen gespalten. Die dabei entstehenden Spaltprodukte werden als lokalanästhetisch unwirksam und in den entstehenden Konzentrationen als untoxisch beschrieben [24].

Proxymetacainhydrochlorid zeigt eine von den typischen Ester Lokalanästhetika wie z. B. Tetracain abweichende chemische Struktur. Die Aminogruppe von Proxymetacainhydrochlorid steht nicht in para-Stellung zur Benzoat Kette sondern in meta-Stellung. Das ist der Grund, warum eine Kreuz-Sensibilisierung zwischen Proxymetacainhydrochlorid und anderen Lokalanästhetika angeblich fehlt [25]. Die Autoren Austin et al berichten allerdings in zwei Fällen von allergischer Kontaktdermatitis auf Proxymetacainhydrochlorid mit anschliessender Kreuz-Sensibilisierung auf Tetracain bei der Anwendung von Ophthalmologika [26].

4.3.2.3 Adrenalin

Adrenalin ist ein körpereigenes Hormon, das im Nebennierenmark gebildet wird. Adrenalin reagiert mit den α- und β-Adrenorezeptoren annähernd gleichermassen. In niedrigen Dosen kontrahiert Adrenalin u. a. die Gefässe von Haut und Schleimhaut.

Das ist eine Eigenschaft, die man sich bei der Kombination von Lokalanästhetika mit Adrenalin zu Nutze macht. Adrenalin führt zu lokaler Vasokonstriktion mit Reduktion der Durchblutung, es verzögert die Resorption der Lokalanästhetika, verlängert ihre Wirkung und vertieft die Blockade. Infolgedessen ist das Operationsgebiet geringer durchblutet, die Plasmakonzentration und damit einhergehend das toxikologische Risiko geringer.

Adrenalinzusatz ist bei Anästhesien in Endstromgebieten, insbesondere bei Eingriffen an Fingern, Zehen, Penis und Nasenspitze kontraindiziert wegen der Gefahr der Gangränbildung [27].

Aufgrund der langsameren Resorption und der geringeren Plasmakonzentrationen können höhere Dosen von Lokalanästhetika appliziert werden. Durch Zugabe von Adrenalin wird die Wirkdauer von z.B. Lidocain um 50% verlängert und die systemische Resorption um ca. 30% verringert. Je stärker die vasodilatierende Wirkung eines Lokalanästhetikums ist, desto deutlicher kann seine Wirkung durch Adrenalin verlängert werden [9].

Die Bioverfügbarkeit von exogen zugeführtem Adrenalin ist gering, da es bereits in der Darmmuskulatur sowie in der Leber schnell metabolisiert wird. Peroral zugeführtes Adrenalin ist unwirksam, die Applikation erfolgt in erster Linie parenteral. Bei einer intravenösen Injektion tritt die Wirkung sofort ein. In der nachfolgenden Tabelle sind Dosierungen von Adrenalin in Anhängigkeit von der Art der Applikation aufgeführt.

Tabelle 4-6: Art der Anwendung und Dosierung von Adrenalin [48]

Art der Anwendung	Dosierung
subcutan	0,1 – 0,5mg
intravenös	max. 0,25mg
inhalativ	0,35mg
als Zusatz zu Lokalanästhetika	2µg/ml(1:500`000) bis 20µg/ml (1:50`000)

In der TAP-Lösung liegt Adrenalintartrat in einer Konzentration von 500µg/ml vor. In

Tabelle 4-6 ist die höchste Konzentration für Adrenalin als Zusatz zu Lokalanästhetika mit 20µg/ml angegeben. Dementsprechend wäre das Adrenalin in der TAP-Lösung um den Faktor 25 zu hoch dosiert. Im International Journal of Pharmaceutical Compounding ist eine Formulierung zur topischen Lokalanästhesie mit gleicher Adrenalinkonzentration wie in TAP-Lösung beschrieben [45].

Metabolisierung

Adrenalin wird durch das Enzym Catecholamin – O – Methyl – Transferase (COMT) und durch die Monoaminooxidase (MAO) zu Metanephrin, 3,4-Dihydroxymandelsäure sowie Vanilinmandelsäure metabolisiert, die gekoppelt an Glucuronsäure oder Schwefelsäure mit dem Urin ausgeschieden werden. Ca. 5% des zugeführten Adrenalins werden unverändert ausgeschieden [27].

4.3.3 Hilfsstoffe der TAP Lösung

Die ursprüngliche Formulierung der TAP-Lösung (vgl. Tabelle 4-1) enthält die Hilfsstoffe Natriumchlorid und Natriummetabisulfit.

Zur Optimierung der Formulierung wurde Ascorbinsäure als ein alternatives Antioxidans verwendet. Im Nachfolgenden werden die Hilfsstoffe Natriumchlorid, Natriummetabisulfit und Ascorbinsäure in ihrer pharmazeutisch-technologischen Funktion näher charakterisiert.

4.3.3.1 Natriumchlorid

Summenformel: NaCl

Anwendung

Natriumchlorid kommt in einer Vielzahl von pharmazeutischen Formulierungen zum Einsatz. Der hauptsächliche Einsatz von Natriumchlorid ist als isotonisierender Zusatz.

Wässrige Lösungen von Natriumchlorid sind stabil und können entweder durch Autoklavieren oder durch Keimfiltration sterilisiert werden [49].

4.3.3.2 Natriummetabisulfit

Summenformel: $Na_2S_2O_5$

Anwendung

Anorganische Schwefelverbindungen werden häufig als Antioxidantien für wässrige Arzneiformen eingesetzt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt anorganische Antioxidantien, die zur Stabilisierung wässriger Lösungen zur Verfügung stehen.

Tabelle 4-7: schwefelhaltige anorganische Antioxidantien für wässrige Lösungen [28]

Substanz	Formel	pH-Wert der wässrigen Lösung	Bemerkungen
Natriumsulfit	Na_2SO_3	Ca. 9	Unangenehmer Geschmack und Geruch, chemisch nicht indifferent, z.B. Reaktion mit Adrenalin, physiologisch nicht unbedenklich
Kaliumsulfit	K_2SO_3		
Natriumhydrogensulfit (Natriumbisulfit)	$NaHSO_3$	Ca. 4	
Kaliumhydrogensulfit (Kaliumbisulfit)	$KHSO_3$		
Natriummetabisulfit (Natriumdithionit, Natriumpyrosulfit)	$Na_2S_2O_5$		
Kaliummetabisulfit (Kaliumdithionit, Kaliumpyrosulfit)	$K_2S_2O_5$		

Natrium- und Kaliumsulfit kommen als Antioxidantien nicht in Frage, weil sie in wässriger Lösung einen alkalischen pH-Wert haben. Dies würde zum einen die Hydrolyse von Tetracainhydrochlorid und Proxymetacainhydrochlorid begünstigen und zum anderen das Adrenalintartrat oxidieren.

Auf Grund des pH-Wertes würden Natriumhydrogensulfit, Kaliumhydrogensulfit und Natriummetabisulfit in Frage kommen.

Natriummetabisulfit wird in oralen, parenteralen und topischen pharmazeutischen Formulierungen als Antioxidans eingesetzt. In der Literatur sind unterschiedliche Angaben zu der Einsatzkonzentration von Natriummetabisulfit zu finden. Die Einsatzkonzentration von Natriummetabisulfit reicht von 0,01 bis 1,0% [28, 29, 30]. In der ursprünglichen Formulierung der TAP-Lösung ist Natriummetabisulfit als Antioxidans enthalten. Natriummetabisulfit liegt in der TAP-Lösung in einer Konzentration von 0,5mg/ml (≙ 0,05%) vor und entspricht somit den Angaben der Literatur.

Das Wirkungsprinzip von Natriummetabisulfit beruht darauf, dass es ein stärker negatives Redoxpotential als die zu schützenden Wirkstoffe hat [28].

In Wasser löst sich Natriummetabisulfit vollständig unter Ausbildung von Natriumhydrogensulfit ($NaHSO_3$) [31]. In einer irreversiblen Reaktion wird Natriummetabisulfit vom Sauerstoff oxidiert und damit verbraucht.

$Na_2S_2O_5 + H_2O \rightleftharpoons 2\ NaHSO_3$

1. Oxidation: $2\ HSO_3^- + 2\ H_2O \rightleftharpoons 2\ SO_4^{2-} + 6\ H^+ + 4\ e^-$

2. Reduktion: $O_2 + 4\ e^- \rightleftharpoons 2\ O^{2-}$

Gesamtgleichung: $2\ HSO_3^- + 2\ H_2O + O_2 \rightleftharpoons 2\ SO_4^{2-} + 6\ H^+ + 2\ O^{2-}$

Wie aus der Gesamtgleichung zu sehen ist, entstehen bei der Oxidation von Natriummetabisulfit Sulfat und Hydroxoniumionen. Findet also in einer Lösung Oxidation und damit eine Natriummetabisulfit verbrauchende Reaktion statt, so ist dies an einem Absinken des pH-Wertes in der Lösung zu erkennen.

Wässrige Lösungen von Natriummetabisulfit zersetzen sich in der Luft. Besonders durch Erhitzen wird der Zersetzungsprozess beschleunigt. Werden wässrige Lösungen von Natriummetabisulfit autoklaviert, so wird eine Inertbegasung der Primärbehälter empfohlen [43].

In sauren Lösungen bildet Natriummetabisulfit – wie auch die anderen anorganische Schwefelverbindungen – schwefelige Säure aus. Der Einsatz in peroralen Arzneiformen ist daher wegen des Geschmackes ungeeignet [28].

4.3.3.3 Ascorbinsäure

Summenformel: $C_6H_8O_6$

Anwendung

Ascorbinsäure wird häufig als Antioxidans für wässrige Lösungen eingesetzt.

Ascorbinsäure sind farblose Kristalle oder ist ein weisses bis fast weisses Pulver. In kristalliner Form ist Ascorbinsäure beständig gegenüber Luftsauerstoff. Bei längerer Lagerung kann sich das Pulver an der Luft und durch Feuchtigkeit verfärben [33].

Beim längeren Stehen von wässrigen, neutralen, alkalischen oder stark sauren Ascorbinsäurelösungen kommt es zur Oxidation zu Dehydro-Ascorbinsäure. Diese reagiert in mehreren Stufen weiter bis zur Bildung von Oxalsäure und L-Threonsäure. Oxalsäure wird als giftig beschrieben und wirkt ätzend auf Haut und Schleimhaut [44].

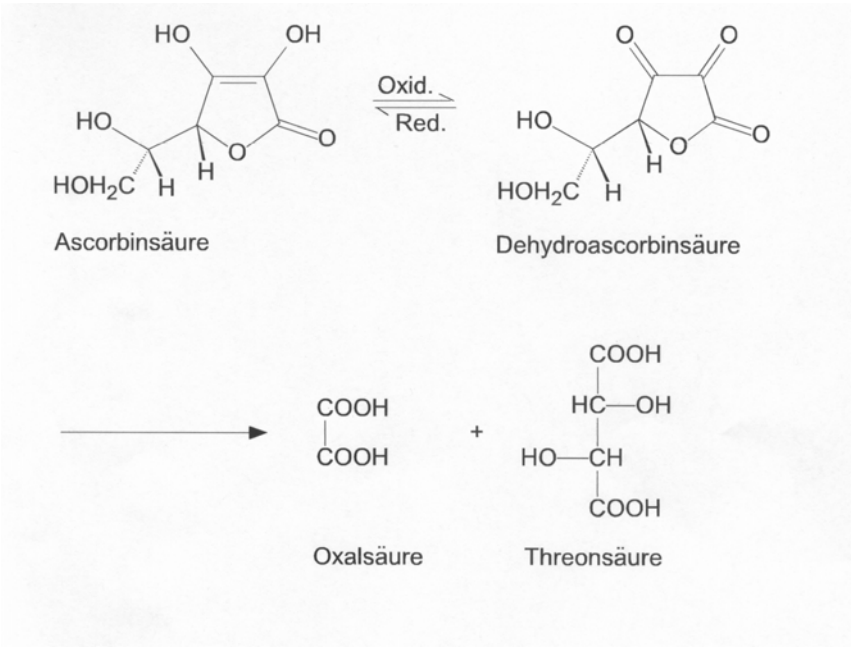

Abbildung 4-8: Oxidation von Ascorbinsäure in wässriger Lösung [33]

Bei Abwesenheit von Sauerstoff sind Lösungen von Ascorbinsäure bei Raumtemperatur beständig. Unter Einfluss höherer Temperaturen und Licht werden diese jedoch ebenfalls unter Dunkelfärbung oxidiert. Ascorbinsäure hat ihr Stabilitätsmaximum in einem pH-Bereich zwischen 5-7 [32]. Zur Sterilisierung von Ascorbinsäurelösungen wird die Keimfiltration empfohlen [34].

Für injizierbare Lösungen sind ein pH<6 und aseptische Herstellung mit Keimfiltration und Schutzbegasung zweckmässig [11].

4.4 Faktoren Design

Zur Planung von Optimierungsversuchen kann entweder die klassische oder die statistische Versuchsplanung gewählt werden. Versuche zur Optimierung sind im Allgemeinen zeit- und kostenintensiv. Auf der einen Seite soll die Anzahl der Einzelversuche möglichst klein gehalten werden, auf der anderen Seite muss der Versuchsumfang jedoch gross genug sein, um Unterschiede feststellen zu können.

Ein Vergleich beider Ansätze sieht wie folgt aus [37]:

Klassische Versuchsplanung

- Veränderung von nur einem Faktor zur Zeit
- Anzahl der Niveaus nicht beschränkt
- Wechselwirkungen können nicht erkannt werden
- Nichtlinearitäten können erkannt werden

Statistische Versuchsplanung

- Testen alle Kombinationsmöglichkeiten meist durch Veränderung mehrerer Faktoren zur Zeit
- Niveau auf 2 beschränkt (Yates Schema)
- Wechselwirkungen können erkannt und quantifiziert werden
- Annahme einer linearen Beziehung zwischen den Faktoren und Zielgrössen

Im Zusammenhang mit dem Thema Faktoren Design kommen verschiedene Definitionen zur Anwendung. Hier sind die Wichtigsten zusammengefasst.

Tabelle 4-8: Faktoren Design: gebräuchliche Definitionen [37]

Faktor	• unabhängige Grösse, die vermutlich Einfluss auf das Ergebnis eines Versuches hat • Unterscheidung zwischen qualitativen und quantitativen Faktoren
Niveau	• gibt die Einstellung des Faktors an, pro Faktor müssen mind. 2 Stufen untersucht werden • die Niveaus der Faktoren werden mit + für das obere und mit – für das untere Niveau bezeichnet • bei quantitativen Faktoren belegt der numerisch höhere Wert das + Niveau und der numerisch niedrigere Wert das – Niveau • bei qualitativen Faktoren erfolgt die Zuordnung willkürlich
Effekt	• Einfluss der Faktoren auf die Zielgrösse • der Effekt kann aus Versuchsergebnissen berechnet werden • kann positiv, negativ oder auch Null sein • seine Signifikanz muss statistisch geprüft werden
Zielgrösse	• abhängige Variable • pharmazeutisch-technologische Parameter (z.B. Gehalt von Arzneistoffen, pH-Wert, Zerfall etc.)
Wechselwirkung	• Faktoren können sich gegenseitig beeinflussen, was entweder einen erwünschten oder einen unerwünschten Effekt auf die Zielgrösse haben kann • können wie die Effekte der Faktoren berechnet werden • Signifikanz muss statistisch geprüft werden • eine Wechselwirkung tritt dann auf, wenn der Effekt des einen Faktors von dem Niveau des anderen abhängt • die Existenz einer reinen Wechselwirkung, ohne dass die Effekte separat auftreten, ist äusserst selten

Die Versuche in einem Faktoren Design werden wie folgt bezeichnet.

- oder +	Faktor auf einem niedrigem oder hohem Niveau
(1)	Alle Faktoren befinden sich auf niedrigem Niveau
a	Faktor A befindet sich auf hohem Niveau, alle anderen Faktoren auf niedrigem Niveau
A, B, C	Faktoren
AB, AC, ABC	Wechselwirkungen der Faktoren

Der Versuchsplan zur Durchführung des 2^3 Designs wurde nach den Kriterien von Yates aufgestellt: Bei dem ersten Versuch befinden sich alle Faktoren auf dem unteren Niveau. Die Niveaus pro Faktor werden mit den Zeichen „+“ und „–" umschrieben. Die Standardform der Versuchsbezeichnung lautet auf z.B. „a“, „b“ etc. für die Experimente mit Faktor A bzw. B auf dem höheren Niveau. Um für die Wechselwirkungen die korrekten Vorzeichen zu erhalten, müssen die Vorzeichen der entsprechenden Spalten miteinander multipliziert werden. Für die Durchführung eines Faktoren Designs gilt im Allgemeinen die Regel, dass die Versuche nie genau in der Reihenfolge des Versuchsplanes nach Yates durchgeführt werden, sondern in einer randomisierten Reihenfolge [42].

Tabelle 4-9: Versuchsplan nach Yates für ein 2^3 Faktoren Design

Bezeichnung der Versuche	Faktoren			Wechselwirkungen			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
(1)	-	-	-	+	+	+	-
a	+	-	-	-	-	+	+
b	-	+	-	-	+	-	+
ab	+	+	-	+	-	-	-
c	-	-	+	+	-	-	+
ac	+	-	+	-	+	-	-
bc	-	+	+	-	-	+	-
abc	+	+	+	+	+	+	+

4.4.1 Auswertung des Faktoren Designs

Zur Auswertung des Faktoren Designs werden zuerst die Effekte quantifiziert und anschliessend statistisch bewertet.

4.4.1.1 Berechnung der Effekte

Grundlage für die Berechnung der Effekte ist Tabelle 4-9.

Der Effekt z. B. des Faktors A in einem 2^3-Versuchsplan kann durch 4 Versuchspaare dargestellt werden:

(1)	---	a
b	---	ab
c	---	ac
bc	---	abc

Die Unterschiede in den Ergebnissen eines Paares kann nur durch den Faktor A hervorgerufen werden, weil alle anderen Bedingungen gleich sind. Der Mittelwert dieser Unterschiede ist daher ein Mass für den Effekt von Faktor A.

Der Mittelwert der Unterschiede für Faktor A kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$A = \frac{((a-1)+(ab-b)+(ac-c)+(abc-bc))}{4}$$

Gleichung 4-1: Berechnung des Mittelwertes für Faktor A

Grundsätzlich können die Resultate der Zielgrössen entsprechend der Spalte des jeweiligen Faktors in Tabelle 4-9 addiert bzw. subtrahiert werden und die Summe durch 4 geteilt werden (vgl. Tabellen 12-1 bis 12-12).

4.4.1.2 Statistische Bewertung der Effekte

Die Bewertung der Effekte erfolgt durch den F-Test. Der F-Test dient zur Prüfung auf Gleichheit von Varianzen. Es werden 2 Varianzen (s_1^2 / s_2^2) mit ihren Freiheitsgraden benötigt. Zum Vergleich der 2 Streuungen dient folgender Quotient als Prüfgrösse

$$F_b = \frac{s_1^2}{s_2^2} \qquad \text{wobei } s_1^2 > s_2^2$$

Gleichung 4-1: Prüfgrösse im F-Test

Zur Beurteilung der Signifikanz dient der Vergleich des berechneten Wertes F_b mit dem Tabellenwert F_{tab}.

4.4.1.3 Statistische Bewertung der Effekte des Faktoren Designs

Nach der Definition von Yates sind die Effekte und Wechselwirkungen eines 2^3 Faktoren Designs mit der Quadratsummenzerlegung bei der Varianzanalyse verknüpft [38].

Allgemein gilt:

$$F_b = \frac{Varianz\ des\ Effektes\ bzw.\ der\ Wechselwirkung}{Varianz\ des\ Versuchsfehlers}$$

Die Forderung gemäss Gleichung 4-1 gilt bei Yates nicht, da im Nenner zwingend die Varianz des Versuchsfehlers stehen muss. Die Signifikanz von Faktor und Wechselwirkung kann auf zwei Arten berechnet werden. Erstens mit der Dreifachwechselwirkung ABC oder zweitens mit Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers.

4.4.1.3.1 Statistische Bewertung mit der Dreifachwechselwirkung ABC als Varianz des Versuchsfehlers

Bei höherdimensionalen Faktoren Designs (2^n mit $n \geq 3$), treten höherdimensionale Wechselwirkungen auf, die in der Praxis jedoch keine Bedeutung haben und somit als Mass für die Versuchsstreuung gelten können [20]. Im Falle eines 2^3 Faktoren Design geht man davon aus, dass die Dreifachwechselwirkung ABC nicht existent sei und als Mass für die Versuchsstreuung gelten kann.

Mittels F-Test ist es möglich, die Signifikanz von Faktoren und Wechselwirkungen zu berechnen [38].

Es kann folgende Nullhypothese (H_0) erstellt werden:

$$F_b = \frac{(X)^2}{(ABC)^2} \leq F_{tab.} = 161{,}4 \ (\alpha = 0{,}05;\ \upsilon = 1;\ \upsilon_2 = 1)$$ Literaturquelle für F-Tabelle [8]

X= Faktor oder Wechselwirkung, deren Signifikanz getestet wird

Gleichung 4-2: Prüfgrösse zur Berechnung der Signifikanz eines Faktors oder einer Wechselwirkung mit der Dreifachwechselwirkung ABC als Varianz des Versuchsfehlers

Wird die Nullhypothese abgelehnt, dann ist der Effekt bzw. die Wechselwirkung wahrscheinlich (α = 0,05) vorhanden.

4.4.1.3.2 Statistische Bewertung mit Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers

Eine zweite Methode, um die Versuchsstreuung zu berechnen, ist mit Wiederholversuchen. Unter Wiederholversuchen versteht man von Grund auf wiederholte Versuche. Mit den Versuchen 1 und abc als Beispiele für Wiederholversuche kann gemäss [40] der Versuchsfehler wie folgt berechnet werden:

$$s^2 = \frac{((1) - WHV(1))^2 + ((abc) - WHV(2))^2}{2} \cdot \frac{1}{2}$$

Legende:	s^2	Versuchsfehler
	WHV (1)	Wiederholversuch 1
	WHV (2)	Wiederholversuch 2

Gleichung 4-3: Prüfgrösse zur Berechnung der Signifikanz eines Faktors oder einer Wechselwirkung mit Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers

Es kann folgende Nullhypothese (H_0) erstellt werden:

$$F_b = \frac{(X)^2}{s^2} \leq F_{tab} = 18{,}51 \ (\alpha = 0{,}05;\ \upsilon_1 = 1;\ \upsilon_2 = 2)$$ Literatur für F-Tabelle [8]

Legende:	X	Faktor oder Wechselwirkung, deren Signifikanz getestet wird
	s^2	Versuchsfehler aus Gleichung 4-3

4.4.1.3.3 Interpretation der Ergebnisse

Es werden die Ergebnisse interpretiert, die einen signifikanten Effekt oder eine signifikante Wechselwirkung ergeben. Für die Interpretation der Ergebnisse ist das Vorzeichen von grosser Bedeutung [20]. Das Vorzeichen für den Einfacheffekt kann entweder negativ (-) oder positiv (+) sein.

Faktor A zeigt z. B. einen signifikanten Effekt in der Auswertung und der berechnete Zahlenwert für den Einfacheffekt trägt ein negatives Vorzeichen (-A). Dies bedeutet, Faktor A auf hohem Niveau hat einen negativen Einfluss auf eine Zielgrösse wie z.B. den Gehalt eines Wirkstoffes innerhalb einer Formulierung. Soll die Ausbeute an diesem Wirkstoff erhöht werden, so muss Faktor A auf niedrigem Niveau (+A) gewählt werden.

Der Zahlenwert für den Einfacheffekt kann auch ein positives Vorzeichen tragen (z. B. +B). Dies beutet, dass Faktor B auf hohem Niveau einen positiven Einfluss auf eine Zielgrösse hat.

4.5 Optimierung der Formulierung und des Herstellprozesses

Bei der Optimierung der Formulierung und des Herstellungsprozesses sind die Schwerpunkte auf folgende Aspekte gelegt worden:

- Isotonierung der Formulierung
- Auswahl eines geeigneten Schutzgases
- Evaluation eines alternativen Antioxidans
- Standardisierung des Herstellungsprozesses durch Automatisierung der Abfüllung und Begasung
- Autoklavierbarkeit der Lösung

Zur Optimierung der Formulierung und des Herstellungsprozesses von TAP-Lösung ist ein Faktoren Design geplant und durchgeführt worden.

Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- Auswahl der Faktoren, die Einfluss auf die Stabilität von TAP-Lösung haben können und untersucht werden sollen
- Festlegung der Niveaus für die Faktoren
- Aufstellen des Versuchsplanes nach Yates
- Festlegung der Zielgrössen, an Hand derer die Wirkung der Faktoren beurteilt wird
- Durchführung der Versuche

4.5.1 Einflussgrössen auf die Stabilität von TAP-Lösung

4.5.1.1 Auswahl eines geeigneten Schutzgases

In der TAP-Lösung sind mit Adrenalintartrat und Proxymetacainhydrochlorid oxidationsempfindliche Substanzen enthalten. Eine effektive Möglichkeit zur Stabilisierung der TAP-Lösung erfolgt durch Ausschluss von Luftsauerstoff während des Herstellungsprozesses. Luftsauerstoff kann sich in der Lösung und im Kopfraum der Stechampullen befinden. In dem derzeitig durchgeführten Herstellungsprozess (vgl. Kapitel 4.3) wird Stickstoff als Schutzgas zur Begasung des WFI und des Kopfraumes verwendet. Unter der Verwendung von Stickstoff trat allerdings teilweise eine bräunliche Verfärbung von TAP-Lösung auf.

In der nachfolgenden Tabelle sind einige Kennzahlen von gebräuchlichen Inertgasen dargestellt.

Tabelle 4-10: Kennzahlen einiger Inertgase [28]

Substanz	Dichte	Löslichkeit in Wasser*
Luft	1,29	19ml
Sauerstoff	1,43	30ml
Stickstoff	1,25	15ml
Argon	1,78	56ml

* ml Gas, die mit 1 Liter Wasser bei 20ºC eine gesättigte Lösung ergeben

Stickstoff löst sich schlechter in Wasser als Sauerstoff. Dies erschwert die Verdrängung von Sauerstoff aus dem Wasser. Stickstoff ist spezifisch leichter als Sauerstoff verflüchtigt sich schnell bei der Begasung.

Das Edelgas Argon ist spezifisch schwerer als Luft und Stickstoff. Argon hat zudem die grössere Löslichkeit in Wasser als Stickstoff und Sauerstoff. Somit vermag Argon Sauerstoff aus wässriger Lösung besser zu verdrängen und auch in offenen Behältern länger über der Wirkstofflösung zu verweilen als Stickstoff. Deshalb wurde neu Argon anstelle von Stickstoff verwendet.

Ein ursprünglicher Gedanke zur Gestaltung des Faktoren Designs war den Einfluss der Begasung resp. fehlender Begasung auf die Stabilität der TAP-Lösung zu untersuchen. Da TAP-Lösung derzeit und damit auch die Schutzbegasung in Handarbeit hergestellt wird, würde eine fehlende Begasung ein „worst case Szenario“ darstellen. Dieser Gedanke ist allerdings wieder verworfen worden auf Grund einer Publikation von Thoma et al über die Stabilisierung von Adrenalin-Lösungen [35]. In ihrer Arbeit haben die Autoren unterschiedliche Stabilisierungsmöglichkeiten von Adrenalinlösungen durch Redoxstabilisatoren und Komplexbildner untersucht. Die Autoren kommen u. a. zu dem Ergebnis, dass die Schutzbegasung mit Stickstoff das Mittel der ersten Wahl zur Stabilisierung von Adrenalin-Lösungen sei [35].

Für die Optimierung des Herstellungsprozesses war somit klar, dass mit einem Schutzgas gearbeitet werden würde. Der Faktor Begasung versus fehlende Begasung wurde nicht in das Faktoren Design aufgenommen.

In einem Vorversuch sind Argon versus Medizinalstickstoff getestet worden. Mit beiden Inertgasen ist die optimale Begasungszeit für WFI, das als Lösungsmittel für die Wirk- und Hilfsstoffe der TAP-Lösung eingesetzt wird, ermittelt worden (vgl. Anhang 11-4).

4.5.1.2 Unterschiedliche Konzentrationen an Natriummetabisulfit

Die Konzentration von Natriummetabisulfit in der ursprünglichen TAP-Lösung beträgt 0,5mg/ml (≙ 0,05%). Die Konzentration stimmt mit den Literaturdaten von 0,01-1,0% überein (vgl. 4.3.3.2) In der Publikation von Thoma et al zur Stabilisierung von Adrenalin-Lösungen [35] sind u. a. Adrenalin-Lösungen 0,1% G/V mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriummetabisulfit (wässrige Lösungen mit 0,1%, 0,5% und 1,0% Natriummetabisulfit) bei 50ºC auf ihre Stabilität untersucht worden. Die Autoren fanden heraus, dass bei unbegasten Adrenalin-Lösungen eine Erhöhung der Konzentration an Natriummetabisulfit von 0,1% auf 0,5% bzw. 1,0% zu einem schnelleren Abbau von Adrenalin führen würde [35]. Auf den Einsatz von zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Natriummetabisulfit im Faktoren Design ist somit verzichtet worden. Die Einsatzkonzentration von Natriummetabisulfit wird unverändert bei 0,5mg/ml belassen.

4.5.1.3 Ascorbinsäure als alternatives Antioxidans zu Natriummetabisulfit

Die Autoren Thoma et al konnten weiterhin in ihrer Arbeit zur Stabilisierung von Adrenalin-Lösungen zeigen, dass mit dem Einsatz von 0,05% Ascorbinsäure in Kombination mit Begasung in Adrenalin-Lösungen 0,1% G/V der beste stabilisierende Effekt erzielt werden konnte [35]. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde Ascorbinsäure als alternatives Antioxidans zu Natriummetabisulfit in das Faktoren Design aufgenommen.

Mit dem Einsatz von Ascorbinsäure als Antioxidans entsteht eine neue Formulierung, in der die Stoffmenge an Ascorbinsäure gleich gross wie die Stoffmenge an Natriummetabisulfit in der ursprünglichen Formulierung sein soll. Die Rechnung zur Festlegung der Einsatzmenge an Ascorbinsäure ist im Anhang 11.5 zu finden. Die Menge an Ascorbinsäure wurde auf 0,0463% (gerundet 0,05%) festgelegt.

4.5.1.4 Handabfüllung oder Ampullenabfüllmaschine

TAP-Lösung wird derzeit in Handarbeit produziert. Eine ausführliche Beschreibung des derzeitigen Herstellungsprozesses ist unter Kapitel 4.3 dargestellt. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, kann eine ungenügende oder fehlende Begasung des Kopfraumes der Stechampulle während der Abfüllung eine Ursache für die Verfärbung der TAP-Lösung sein. Durch die Abfüllung und Begasung des Kopfraumes in Handarbeit kann kein standardisierter und damit reproduzierbarer Begasungsprozess gewährleistet werden.

Aus diesem Grund ist die Abfüllung von TAP-Lösung mit der Ampullenabfüllmaschine als alternative Methode zur Handabfüllung in Betracht gezogen worden. Die Ampullenabfüllmaschine gewährleistet eine Begasung der leeren Ampullen und des Kopfraumes. Mit der Ampullenabfüllmaschine, die in der Spital-Pharmazie zur Verfügung steht, können nur Brechampullen befüllt werden. Brechampullen sind als Primärverpackung für TAP-Lösung eher ungeeignet, da beim Öffnen der Ampullen Glassplitter in die Lösung gelangen können.

Diese Glassplitter können beim Leeren der Ampulle auf eine Gaze und somit auf die zu anästhesierende Wunde gelangen. Um einer möglichen Verletzungsgefahr der Patienten durch Glassplitter entgegen zu wirken, müsste der Inhalt der Brechampullen mit einer Spritze aufgezogen werden. Der Durchmesser der Kanüle würde hier als Partikelgrössen limitierender Faktor wirken. Dies wurde jedoch von Seiten der Klinikbetreuung als unpraktisch angesehen und abgelehnt.

Trotz dieser Nachteile ist die Ampullenabfüllmaschine in das Faktoren Design aufgenommen worden, weil damit die Idee der standardisierten und damit reproduzierbaren Begasung verfolgt wird.

Für den Fall, dass das automatisierte Begasen einen positiven Einfluss auf die Stabilität der TAP-Lösung hat, würde ein geeignetes Gerät zur Abfüllung von Flüssigkeiten unter Inertbegasung evaluiert werden.

Als Faktor im Design ist somit die Handabfüllung der Abfüllung mit der Ampullenabfüllmaschine gegenüber gestellt worden.

4.5.1.5 Keimfiltration oder Autoklavieren

Um eine sterile Arzneiform zu erzielen, wird TAP-Lösung derzeit keimfiltriert. Das Autoklavieren wird jedoch als die sichere Methode angesehen. Autoklavieren würde darüber hinaus zu einer Arbeitserleichterung bei der Herstellung führen.

Aus diesen Gründen ist als weiterer Faktor Keimfiltration versus Autoklavieren in das Faktoren Design aufgenommen worden.

4.5.2 Endgültiges Faktoren Design

Im Faktoren Design sollen folgende Faktoren untersucht werden:

- Faktor A (Sterilisationsmethode) Keimfiltration versus Autoklavieren
- Faktor B (Abfüll- bzw. Begasungsmethode) Handabfüllung versus Ampullenmaschine
- Faktor C (Antioxidans) Ascorbinsäure versus Natriummetabisulfit

Pro Faktor wurden 2 Niveaus untersucht. Es resultierte ein 2^3 Design mit insgesamt 8 Versuchen. Auf Grund der Isotonisierung und des Einsatzes an Ascorbinsäure als alternatives Antioxidans wurde das Faktoren Design mit folgenden 2 Formulierungen durchgeführt:

Tabelle 4-11: Zusammensetzungen der TAP-Lösungen für das Faktoren Design im Vergleich

Substanzen	**Bisherige Formulierung (Formulierung 1)**	**Alternative Formulierung (Formulierung 2)**
Tetracainhydrochlorid	500mg	500mg
Proxymetacainhydrochlorid	500mg	500mg
Adrenalintartrat	50mg	50mg
Natriummetabisulfit	50mg	---
Ascorbinsäure	---	46,3mg
Natriumchlorid	710mg	710mg
Wasser für Injektionszwecke	ad 100ml	ad 100ml

Um im weiteren Verlauf der Diplomarbeit die Benennung der verschiedenen TAP-Lösungen zu vereinfachen, wird die bisherige Formulierung mit Natriummetabisulfit als TAP-Lösung 1 und die alternative Formulierung mit Ascorbinsäure als TAP-Lösung 2 bezeichnet.

4.5.2.1 Versuchsplanung

Für die Optimierung von TAP-Lösung ist ein 2^3 Faktoren Versuchsplan nach Yates aufgestellt worden. Die Reihenfolge der Versuchsdurchführungen erfolgte randomisiert (vgl. Tabelle 4-12). Die Faktoren sind qualitativer Art. Daher geschieht die Festlegung der Niveaus pro Faktor willkürlich.

Tabelle 4-12: Versuchsplan nach Yates für ein 2^3 Design mit randomisierter Versuchsreihenfolge

Bezeichnung der Versuche	Faktoren			Wechselwirkungen				Reihenfolge der Versuchsdurchführung
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
(1)	-	-	-	+	+	+	-	9
a	+	-	-	-	-	+	+	5
b	-	+	-	-	+	-	+	7
ab	+	+	-	+	-	-	-	6
c	-	-	+	+	-	-	+	2
ac	+	-	+	-	+	-	-	1
bc	-	+	+	-	-	+	-	4
abc	+	+	+	+	+	+	+	3
WHV 1 (≙Versuch 1)								8
WHV 2 (≙Versuch abc)								10

Faktor A: -Keimfiltration
+Autoklavieren

Faktor B: - Ampullenabfüllmaschine
+ Handabfüllung

Faktor C - Ascorbinsäure
+ Natriummetabisulfit

Zur Bestimmung des Versuchsfehlers sind Wiederholversuche durchgeführt worden. Als Wiederholversuche sind die Versuche 1 und abc ausgewählt worden, weil diese Extrema darstellen. Bei Versuch 1 befinden sich alle Faktoren auf dem niedrigen Niveau, während bei Versuch abc alle Faktoren auf dem hohen Niveau sind.

4.5.3 Auswertung des Faktoren Designs

Zur Auswertung des Faktoren Designs werden die Effekte der Faktoren A, B und C mit den Wirkstoffgehalten von Adrenalintartrat, Proxymetacain- und Tetracainhydrochlorid als Zielgrösse berechnet und statistisch bewertet. Insgesamt sind zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung (t_0), nach einem Monat (t_1), nach drei Monaten (t_3) und nach 6 Monaten (t_6) die Wirkstoffgehalte ermittelt worden. Die Auswertung des Faktoren Designs nach Yates ist aber nur zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung bei den verschiedenen Lagerbedingungen Kühlraum, Raumtemperatur und 40ºC ermittelt worden. Den Zeitpunkt „direkt nach Herstellung“ wurde gewählt, weil man wissen wollte, ob ein Effekt so gross ist, dass man ihn auch schon direkt nach der Herstellung sehen kann. Das Faktoren Design ist mit den Ergebnissen nach 6 Monaten erneut ausgewertet worden, weil man davon ausgegangen ist, signifikante Effekte am ehesten dann zu sehen (vgl. Tabelle 12-1 bis 12-12).

5 Material und Geräte

5.1 Arzneistoffe und Chemikalien

Bezeichnung der Substanzen	Chargennummer	Lieferant
Tetracainhydrochlorid PhEur	2000080668	Hänseler
Proxymetacainhydrochlorid BP	0206A164	Synopharm
Epinephrinhydrogentartrat PhEur	2002020688	Hänseler
Natriummetabisulfit PhEur	K28451057103	Merck
Ascorbinsäure	2002010582	Hänseler
Natriumchlorid für Parenteralia PhEur	0000115904	Schweizer Hall Chemie
Wasser für Injektionszwecke PhEur	entfällt	Spital-Pharmazie
Wasser behandelt vollentsalzt	entfällt	Spital-Pharmazie
Acetonitril supergradient, HPLC grade	54277	Scharlau Chemie
Kalium-di-hydrogenphosphat	443014/1	Fluka
Lichropur® (Octan-1-sulfonsäure)	K31499207250	Merck
Argon	Gebinde Nr.: 330220	Carbagas
Medizinalstickstoff	entfällt	Carbagas
TAP-Lösung	030314S01	Spital-Pharmazie

5.2 Material

Bezeichnung des Materials	Hersteller
Stechampullen 5ml farblos, Glasart 1	Flaver AG
Ampullen 5ml OPC Form D, Neutralglas, Glasqualität 1	Forma Vitrum AG
Kartonfaltschachteln 50x10ml Ampullen	Säuberlin und Pfeiffer SA
Gummistopfen für Stechampullen	Flaver AG
Alu-Abreisskappen neutral für Stechampullen	Coplax AG
Etiketten weiss 25x50mm	Wilux Print
UV-Küvetten halbmikro	Brand GmbH, Deutschland
Filter Acrodisk 0,8/0,2µm	Pall Gelmann Laboratories
Baxa Transfer Tube Set	Baxa
Baxa Beutel 1000ml	Baxter
Terumo Nadel 18Gx1 $1/2$ und 1,2x40mm Luer	Terumo Coperation
UV-Küvetten halbmikro	Brand GmbH

5.3 Geräte Herstellung

Bezeichnung des Gerätes	Gerätetyp	Hersteller
Tiefkühlschrank	DLT 69	Koch
Magnetrührer	Thermodyne	Ismatec
Laminar Flow Bench	HFX180BS	Skan
Abfüllpumpe	099E	Baxa
Sauerstoffmessgerät	CellOX 325	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Wärmeschrank	TSW-270E	Salvis
Füll- und Verschliessmaschine mit LF	R910	Rota
Autoklav Turbotherm SDT 09.06.12/2F	SDT 9612/2F	SBM, MMM AG
Flow Star Filtertestgerät	TYP-FFS01	Pall

5.4 Geräte Analytik

Bezeichnung des Gerätes	Gerätetyp	Hersteller
Micro-Osmometer	3300	Advanced Instruments
HPLC Alliance Waters 2690 Separation Modul	diverse	Waters
Photodiode Array Detector	996	Waters
Millenium 32 Software, Version 4.0	entfällt	Waters
pH-Meter	M-691	Metrohm
UV/VIS-Spektrophotometer	Lamda Bio 20	Perkin Elmer
Analysenwaage	XS205DU/M	Mettler
Kolbenhubpipetten	Referenz	Eppendorf
Ultraschallbad	3510 E-DTH	Branson

6 Methoden

6.1 Methoden Herstellung

6.1.1 Auswahl eines geeigneten Schutzgases

Für die Auswahl eines geeigneten Schutzgases und die Bestimmung der optimalen Begasungszeit ist WFI verwendet worden. WFI ist das Lösungsmittel für die Wirk- und Hilfsstoffe und wird im regulären Herstellungsprozess vor seiner Verwendung mit Stickstoff begast.

Die übliche Chargengrösse bei der Herstellung von TAP-Lösung beträgt 2l. Zur Ermittlung des Schutzgases und der Begasungszeit ist dementsprechend auch eine Ansatzgrösse von 2l gewählt worden.

Das WFI ist durch Auskochen erst einmal von seinem gelösten Sauerstoff befreit worden. Anschliessend wurde das WFI abgekühlt unter Durchleiten mit Stickstoff respektive Argon.

Der Sauerstoffgehalt im WFI wurde mit dem Gerät CellOx 325 gemessen. Die Sauerstoffkonzentrationen sind alle 15 Minuten abgelesen worden. Es wurde insgesamt über einen Zeitraum von 155 Minuten begast. Das Gerät CelloX325 arbeitet mit einem membranbedeckten polarographischen Sensor. Die Oberfläche einer negativ geladenen Goldelektrode reduziert den Sauerstoff zu Hydroxid. Bei dieser chemischen Reaktion fliesst ein Strom, der der umgesetzten Sauerstoff-Stoffmenge proportional ist. Das Gerät berechnet aus dem Sensorsignal die Konzentration des Sauerstoffes.

6.1.2 Herstellung der TAP-Lösungen gemäss Faktoren Design

WFI wurde gemäss dem Vorversuch zur Ermittlung der Begasungszeit für die Dauer von 45 Minuten mit Argon begast. Die einzelnen Substanzen wurden abgewogen und mit dem vorbegasten WFI gelöst. Die Lösungen wurden durch Rühren auf einem Magnetrührer und unter Durchleitung von Argon homogenisiert. Die Lösungen wurden entweder mit der Schlauchquetschpumpe Baxa in Stechampullen oder mit der Ampullenabfüllmaschine in Brechampullen abgefüllt. Bei der Abfüllung mit der Baxa ist eine Doppelnadel mit Hilfe zweier Kanülen imitiert worden. Die eine Kanüle diente als Produktauslass während die andere Kanüle über einen Schlauch an die Argon Flasche angeschlossen war. Das Inertgas ist steril filtriert worden.

6.1.3 Autoklavieren der TAP-Lösungen

Die Stechampullen wurden bei 121°C für die Dauer von 20 Minuten autoklaviert. Die Brechampullen sind bei 121°C für die Dauer von 25 Minuten autoklaviert worden.

6.2 Methoden Analytik

6.2.1 Bestimmung der Osmolalität

Die Messung der Osmolalität beruht auf dem Prinzip der Gefrierpunkterniedrigung. Grundlage ist die Methode 2.2.35 der PhEur.

Pro Versuch wurde je ein Wert aus zwei verschiedenen Stech- bzw. Brechampullen bestimmt.

6.2.2 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit der potentiometrischen Methode gemäss PhEur 2.2.3 gemessen. Pro Versuch wurde je ein Wert aus zwei verschiedenen Stech- bzw. Brechampullen bestimmt.

6.2.3 Farbe und Klarheit

Die Farbe und Klarheit der Lösungen wurde nach der Prüfmethode Color and Clarity gemäss Epinephrine Injection USP bestimmt. Die einzelnen TAP-Lösungen sind visuell betrachtet worden. Die TAP-Lösungen durften dabei keine Verfärbung aufweisen. War eine Färbung einer Lösung festzustellen, so wurde die Probelösung gegen die Standardlösung für den Prüfpunkt Farbe und Klarheit im UV/VIS-Spektrometer vermessen. Die Prüflösung ist unverdünnt vermessen worden. Die Absorption der Probelösung bei einer Wellenlänge von 460nm durfte nicht grösser als die Absorption der Standardlösung sein.

6.2.4 Gehaltsbestimmung von Adrenalintartrat

Die Gehaltsbestimmung erfolgte nach der HPLC Methode aus der Monographie Cocaine Tetracaine Hydrochlorides and Epinephrine Topical Solutions aus der USP 2002.

In der Monographie werden die einzelnen Komponenten mittels Ionenpaarchromatographie getrennt. Als Ionenpaarreagenz wurde Octan-1-sulfonsäure eingesetzt.

Tabelle 6-1: Chromatographische Bedingungen zur Gehaltsbestimmung von Adrenalintartrat

Parameter	Einstellung / Beschreibung
Säule	Lichrosphere 100® RP 18e 250mmx5µm von Merck
Name der Methode	Grad 5_2_Lichrocart_Inst
Mobile Phase • Solvent A • Solution B	 900ml Pufferlösung 0,05molar pH 2,5 und 100ml Acetonitril 700ml Pufferlösung 0,05molar pH 2,5 und 300ml Acetonitril
Säulen- und Probentemperatur	25ºC
Flussrate	1,0ml/min
Injektionsvolumen	10µl
Quantifizierung bei	280nm
Laufzeit der Chromatogramme	45 Minuten

Stamm- und Kalibrationslösungen

Die Stammlösung ist mit allen drei Wirkstoffen hergestellt worden. Die Stammlösung enthielt 250mg ADR und je 2500mg PPC und TTC pro 250ml. Die Wirkstoffe sind in WBV gelöst worden.

Für die Kalibrationslösungen ist von der Stammlösung ein bestimmtes Volumen pipettiert und mit Solvent A verdünnt worden. In der nachfolgenden Tabelle sind die Konzentrationen der Kalibrationslösungen und die von der Stammlösung zu pipettierenden Volumina angegeben.

Tabelle 6-2: Pipettierschema zum Herstellen der Kalibrationslösungen von ADR

	Adrenalin [mg/l]	Volumen der Stammlösung [µl]	Endvolumen [ml]
80%	40	400	10
100%	50	500	10
120%	60	600	10

Probenvorbereitung: 1ml TAP-Lösung ad 10ml mit Solvent A im Messkolben auffüllen.

6.2.5 Gehaltsbestimmung von Tetracain- und Proxymetacainhydrochlorid

Zur Gehaltsbestimmung von Tetracain- und Proxymetacainhydrochlorid ist eine HPLC Methode entwickelt worden. Die chromatographischen Bedingungen sind der Tabelle 6-3 zu entnehmen.

Tabelle 6-3 : Chromatographische Bedingungen zur Gehaltsbestimmung von Tetracain- und Proxymetacainhydrochlorid

Parameter	**Einstellung / Beschreibung**
Säule	YMC-Pack Hydrosphere, 150x3,0mm i.d., S-3µm, 120A von Stagroma
Name der Methode	YMC_Grad16_Fluss05ml_Inst
Mobile Phase	Solvent A: Phosphatpuffer 0,05 molar, pH 3,0 Solvent B: Acetonitril
Säulen- und Probentemperatur	25ºC
Flussrate	0,5ml
Injektionsvolumen	10µl
Quantifizierung bei	280nm
Laufzeit der Chromatogramme	35 Minuten

PPC und TTC wurden mittels Gradientenelution aufgetrennt.

Tabelle 6-4: Gradient zur Gehaltsbestimmung von Tetracain- und Proxymetacainhydrochlorid

Zeit [min]	% Solvent A	% Solvent C
	100,0	0,00
5	100,0	0,00
6	65,0	35,0
11	65,0	35,0
13	50,0	50,0
14	40,0	60,0
20	40,0	60,0
21	65,0	35,0
23	100,0	0,00
35	100,0	0,00

Stamm- und Kalibrationslösungen

Für die Stammlösung sind je 250mg PPC und TTC mit WBV ad 100ml gelöst worden.

Tabelle 6-5: Konzentrationsbereiche der Kalibrationslösungen

80%	S1	PPC 160mg/l	TTC 160mg/l
100%	S2	PPC 200mg/l	TTC 200mg/l
120%	S3	PPC 240mg/l	TTC 240mg/l

Ausgehend von der Stammlösung werden wie in Tabelle 6-6 angegeben folgende Volumina pipettiert und mit Solvent A bis zum gewünschten Volumen aufgefüllt.

Tabelle 6-6: Pipettierschema zum Herstellen der Kalibrationslösungen

	PPC und TTC [mg/l]	Volumen der Stammlösung [µl]	Endvolumen [ml]
80%	160	1600	25
100%	200	2000	25
120%	240	2400	25

Probenvorbereitung

1ml TAP-Lösung mit Solvent A ad 25ml im Messkolben auffüllen. Dies entspricht 100% der Kalibrationsgeraden.

7 Resultate und Diskussion

7.1 Resultate des Faktoren Designs

Das Faktoren Design wurde zu den Zeitpunkten direkt nach der Herstellung (t_0) und nach 6 Monaten (t_6) Lagerung der Proben im Kühlraum (2-8ºC), bei Raumtemperatur (15-25ºC) und bei 40ºC ausgewertet. Die Auswertung wurde einmal mit der Dreifachwechselwirkung ABC als Varianz des Versuchsfehlers und einmal unter Berücksichtigung der Wiederholversuche als Varianz des Versuchsfehlers vorgenommen. Die einzelnen Yates Schemata sind im Anhang (Tabellen 12-1 bis 12-12) zu finden. Zusammenfassende Übersichten von der Auswertung mit ABC und den Wiederholversuchen sind den Tabelle 11-3 und Tabelle 11-4 zu entnehmen. Im Nachfolgenden ist eine kombinierte Übersicht aus den Tabelle 11-3 Tabelle 11-4 dargestellt.

Tabelle 7-1: Übersicht über signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit ABC und Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers

Wirkstoff	Faktor			Wechselwirkungen				Zeitpunkt der Probenahme
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
Adrenalintartrat	**+/-**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Direkt nach Herstellung
	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	Nach 6 Monaten KS
	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	Nach 6 Monaten RT
	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Nach 6 Monaten 40ºC
PPC	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Direkt nach Herstellung
	-/+	**-/+**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Nach 6 Monaten KS
	-/-	**+/-**	**+/-**	-/-	-/-	**+/-**	-/-	Nach 6 Monaten RT
	-/-	**+/-**	**+/-**	-/-	-/-	**+/-**	-/-	Nach 6 Monaten 40ºC
TTC	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Direkt nach Herstellung
	-/+	-/-	**-/+**	-/-	-/-	-/-	-/-	Nach 6 Monaten KS
	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Nach 6 Monaten RT
	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	Nach 6 Monaten 40ºC

Allgemein Das erste Zeichen vor dem Schrägstrich ist die Auswertung mit ABC als Varianz des Versuchsfehlers, das zweite Zeiten die Auswertung mit den Wiederholversuchen

Legende

+/+	Signifikant in der Auswertung mit ABC und Wiederholversuchen
-/+ oder +/-	Signifikant in der Auswertung entweder mit ABC oder mit Wiederholversuchen
-/-	Nicht signifikant, weder in der Auswertung mit ABC noch mit Wiederholversuchen

Ausgehend von Tabelle 7-1 werden an Hand folgender Kriterien die Faktoren und Wechselwirkungen, die interpretiert werden, ausgewählt:

- Faktoren, die ein **+/-**, **-/+** oder ein **+/+** in ihrem Feld haben
- Die Existenz einer reinen Wechselwirkung ohne dass die Effekte separat als signifikant auftreten, ist äusserst selten [38]. Bezogen auf Tabelle 7-1 ist nur bei PPC und der Wechselwirkung BC bei Raumtemperatur und bei 40ºC eine interpretierbare Wechselwirkung vorhanden.

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Auswahlkriterien werden folgende Ergebnisse näher betrachtet.

Tabelle 7-2: Signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit den Zahlenwerten für die einfachen Effekte

Wirkstoff	Faktor	1-facher Effekt	Lagerzeit und -bedingungen	Signifikanz mit ABC / WHV
Adrenalintartrat	A	-4,275	Direkt nach Herstellung	ABC
	A	-5,02	6 Monate Kühlraum	ABC + WHV
	A	-3,13	6 Monate Raumtemperatur	ABC
PPC	A	-3,50	6 Monate Kühlraum	WHV
	B	-2,01	6 Monate Kühlraum	WHV
	B	-3,08	6 Monate Raumtemperatur	ABC
	B	-3,98	6 Monate 40°C	ABC
	C	5,37	6 Monate Raumtemperatur	ABC
	C	5,53	6 Monate 40ºC	ABC
	BC	4,97	6 Monate Raumtemperatur	ABC
	BC	6,08	6 Monate 40ºC	ABC
TTC	A	-1,34	6 Monate Kühlraum	WHV
	C	0,85	6 Monate Kühlraum	WHV

7.1.1 Adrenalintartrat und Faktor A

Wie aus Tabelle 7-2 hervorgeht, zeigt Faktor A direkt nach Herstellung, bei Kühlraumlagerung und bei Raumtemperatur einen signifikanten Effekt. Eigentlich würde man erwarten, dass nach 6 monatiger Lagerung bei 40ºC ebenfalls ein signifikanter Effekt des Faktors A auftritt. Dies ist aber nicht der Fall. Ein Vergleich der Varianzen der Versuchsfehler stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 7-3: Vergleich der Versuchsstreuungen für Adrenalintartrat und Faktor A

	Zahlenwerte für Varianz des Versuchsfehlers	Zeitpunkte der Probenahme	Signifikant
$(ABC)^2$	0,04	t_0	ja
	0,06	t_6 KS	ja
	0,05	t_6 RT	ja
	0,52	t_6 40°C	nein
Wiederholversuche	1,39	t_0	nein
	0,70	t_6 KS	ja
	29,16	t_6 RT	nein
	45,29	t_6 40°C	nein

Die Varianz für den Versuchsfehler für 40°C ist mit 0,52 klein, aber im Vergleich zu den Varianzen zu den Zeitpunkten t_6 um den Faktor 10 grösser. Faktor A ist daher bei dieser Temperatur nicht signifikant.

Bei der Auswertung mit den WHV sind die Varianzen des Versuchsfehlers mit 29,16 und 45,29 gross. Ein Vergleich der Wirkstoffgehalte ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 7-4: Wirkstoffgehalt von Adrenalintartrat nach 6 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur und 40°C

	t_6 RT	t_6 40°C
Versuch 1	101,43%	85,23%
Wiederholversuch 1	98,99%	94,16%
Versuch abc	99,26%	81,58%
Wiederholversuch 2	88,74%	91,65%

Der Unterschied in den Wirkstoffgehalten kann nicht erklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Proben versehentlich falsch beschriftet oder aber vertauscht worden sind. Eine weitere Fehlerquelle wäre das Bestücken und Programmieren des Autosamplers des HPLC-Systemes.

Faktor A auf hohem Niveau sind die Versuche mit Autoklavieren. Dies betrifft die Versuche a, ab, ac und abc. Diese Versuche weisen nach z. B. nach 6 Monaten Lagerung im Kühlraum einen durchschnittlichen Wirkstoffgehalt von 92-95% auf, während die keimfiltrierten Versuche einen durchschnittlichen Wirkstoffgehalt von 98-100% zeigen.

Um einen höheren Gehalt an Adrenalintartrat zu erzielen, muss Faktor A auf niedrigem Niveau (Keimfiltration) gewählt werden.

7.1.2 Proxymetacainhydrochlorid und Faktor A

Faktor A führt zu einem Wirkstoffverlust von PPC. Nach 6 Monaten Lagerung im Kühlraum weisen die Versuche mit Autoklavieren einen durchschnittlichen Wirkstoffgehalt von 92-97% auf. Die keimfiltrierten Versuche (1, b, c, bc) dagegen liegen mit einem durchschnittlichen Wirkstoffgehalt von 97-100% höher. Dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur, in der für PPC die Keimfiltration als Sterilisationsmethode angegeben wird [14].

7.1.3 Proxymetacainhydrochlorid und Faktor B

In allen drei Fällen des signifikanten Faktors B ist das Vorzeichen für den einfachen Effekt negativ. Die Versuche mit Handabfüllung (b, ab, bc, abc) weisen somit einen niedrigeren Wirkstoffgehalt auf als die Versuche, die mit der Ampullenabfüllmaschine produziert worden sind. Um einen höheren Gehalt an PPC zu erzielen, sollte TAP- Lösung mit einen standardisiertem Begasungsprozess hergestellt werden.

7.1.4 Proxymetacainhydrochlorid und Faktor C

Faktor C zeigt bei der Auswertung mit der Dreifachwechselwirkung als Versuchsfehler bei sechsmonatiger Lagerung bei Raumtemperatur und bei 40ºC einen signifikanten Effekt. Die Versuche mit Natriummetabisulfit (c, ac, bc und abc) haben nach 6 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur einen Wirkstoffgehalt von durchschnittlich 96-99%. Die Versuche mit Ascorbinsäure (1, a, b, ab) weisen hingegen nur einen durchschnittlichen Wirkstoffgehalt von 88-97% auf.

7.1.5 Proxymetacainhydrochlorid und Wechselwirkung BC

In Falle der signifikanten Wechselwirkung BC trägt das Resultat für die Wechselwirkung ein positives Vorzeichen. Das positive Vorzeichen ergibt sich aus der Kombination der Vorzeichen von Faktor B und C. Mögliche Kombinationen wären demzufolge

B (-1) x C (-1) = BC (+1) oder B (+1) x C (+1) = BC (+1)

Gemäss der Ausführungen in Kapitel 7.1.3 ist Faktor B auf niedrigem Niveau (Ampullenmaschine) signifikant. Gemäss den Ausführungen in Kapitel 7.1.4 ist Faktor C auf hohem Niveau (Natriummetabisulfit) signifikant. Daraus ergäbe sich folgende Kombination:

B (-1) x C (+1) = BC (-1)

Demzufolge müsste das Vorzeichen für die Wechselwirkung negativ sein. Die berechneten Werte für die Wechselwirkung tragen aber ein positives Vorzeichen. Das ist unlogisch und kann nicht erklärt werden. Die Wechselwirkung ist nicht interpretierbar. Grundsätzlich wäre jedoch eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren B und C denkbar. Durch die unterschiedliche Begasungstechnik (Faktor B) ist der Sauerstoffgehalt in der Lösung und im Kopfraum der Primärverpackung unterschiedlich. Dies wirkt sich auf das Antioxidans (FaktorC) aus, das durch den Sauerstoff in Lösung irreversibel oxidiert und damit verbraucht wird.

7.1.6 Tetracainhydrochlorid und Faktor A

Faktor A auf hohem Niveau sind die Versuche mit Autoklavieren. Das Vorzeichen des einfachen Effektes ist negativ. Der Zahlenwert für den Einfacheffekt ist mit – 1,34 kleiner als bei den Wirkstoffen Adrenalintartrat (- 5,02 und – 3,13) und bei Proxymetacainhydrochlorid mit -2,01. Dies lässt auf eine höhere Stabilität von TTC gegenüber dem Autoklavieren schliessen.

7.1.7 Tetracainhydrochlorid und Faktor C

Faktor C ist mit 18,62 (vgl. Tabelle 12-6) nur knapp signifikant. Natriummetabisulfit als Antioxidans führt zu einem leicht höheren Wirkstoffgehalt an TTC als die Versuche mit Ascorbinsäure.

7.1.8 Kritische Bewertung der Resultate des Faktoren Designs

Auffällig ist, dass der eine oder andere Faktor nur bei einer Lagerungstemperatur einen signifikanten Effekt zeigt. Dies ist bei PPC und Faktor A (KR), bei PPC und Faktor B (KR), bei TTC und Faktor A (KR) sowie bei TTC und Faktor C (KR) der Fall. Eigentlich würde man erwarten, dass die Faktoren auch bei den höheren Lagerungstemperaturen (Raumtemperatur und 40°C) signifikant wären. Dies ist jedoch nicht der Fall. Mit einem Vergleich der Varianzen für die Versuchsfehler wie am Beispiel von PPC und Faktor A dargestellt, kann dies erklärt werden.

Tabelle 7-5: Vergleich der Versuchsstreuungen für PPC und Faktor A

	Varianz des Versuchsfehlers		Varianz des Versuchsfehlers	Zeitpunkte der Probenahme
$(ABC)^2$	0,12	$(WHV)^2$	7,79	t_0
$(ABC)^2$	0,17	$(WHV)^2$	0,19	t_6 KS
$(ABC)^2$	0,04	$(WHV)^2$	1,9	t_6 RT
$(ABC)^2$	0,09	$(WHV)^2$	7,59	t_6 40ºC

Ein Vergleich der Versuchsstreuungen zwischen ABC und den Wiederholversuchen zeigt, dass die Streuungen für ABC sehr klein sein können. Aufgrund der unterschiedlichen Grössenordnungen von Versuchsstreuungen zwischen ABC und Wiederholversuchen ergeben sich unterschiedlich signifikante Effekte und Wechselwirkungen (vgl.Tabelle 11-3 und Tabelle 11-4).

Die tabellierten F-Werte für ABC und Wiederholversuche sind von den Freiheitsgraden abhängig. Die Versuchsstreuung für ABC ist klein und damit kann die berechnete Prüfgrösse im F-Test gross sein. Der tabellierte F-Wert ist aber dafür mit 161,4 (α=0,05; υ_1=1 υ_2=1) gross. Die Versuchsstreuung für Wiederholversuche ist in der Regel grösser, aber dafür ist der tabellierte F-Wert mit 18,51 (α=0,05; υ_1=1 υ_2=1) kleiner. Aufgrund dessen nähern sich zwar beide Methoden zur Berechnung der Versuchsstreuung an, die Auswertungen entweder mit ABC als Streuung für den Versuchsfehler oder mit den Wiederholversuchen führen dennoch zu verschiedenen signifikanten Effekten.

Bei der Auswertung des Faktoren Designs mit Wiederholversuchen und mit ABC sind insgesamt 168 Signifikanztest berechnet worden. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% für den Fehler erster Art besteht die Wahrscheinlichkeit, dass im Mittel bei mehrfacher Durchführung des Designs bei 8 Versuchen die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen werden könnte. Das bedeutet, dass bei 8 Versuchen fälschlicherweise ein signifikanter Effekt angenommen werden könnte Dies ist ein offensichtliches Problem bei wiederholten Signifikanztests. Der Autor Stephen Senn geht in seinem Buch Statistical Issues in Drug Development näher auf diese Problematik ein [22].

Wie Tabelle 7-1 darstellt, sind insgesamt 15 signifikante Faktoren und Wechselwirkungen berechnet worden. Aufgrund des Problems der multiplen Signifikanztests kann angenommen werden, dass die Signifikanzen teilweise fälschlicherweise zustande gekommen sind.

Unter Berücksichtigung

- des Problems der multiplen Signifikanztests
- dem eher unwahrscheinlichen Auftreten von signifikanten Effekten bei nur einer Lagerungstemperatur
- nicht interpretierbarer Wechselwirkungen
- Auftreten von Wechselwirkungen, ohne dass die entsprechenden Faktoren signifikant sind,

verbleiben schlussendlich drei Aussagen, die als wahrscheinlich angesehen werden können:

ADR und Faktor A (-A)

PPC und Faktor B (-B)

PPC und Faktor C (+C)

Dementsprechend kann **Versuch c** (Keimfiltration, Ampullenabfüllmaschine, Natriummetabisulfit,) als der Beste und **Versuch ab** (Autoklavieren, Handabfüllung, Ascorbinsäure,) als der Schlechteste identifiziert werden.

Werden die Kriterien für die Aussagen, die als wahrscheinlich angesehen werden noch enger gefasst, indem sowohl die Auswertung mit ABC als auch die Auswertung mit den Wiederholversuchen einen signifikanten Effekt ergeben muss, so bleibt schlussendlich nur ADR und Faktor A (-A) übrig. Um aber überhaupt eine Idee zu bekommen, was die Ursache für die verfärbte TAP-Lösung sein könnte, wurden die oben genannten drei Aussagen als wahrscheinlich angenommen.

7.2 Weitere Resultate

7.2.1 Resultate Farbe und Klarheit

Die einzelnen Versuche zeigten im Prüfpunkt Farbe und Klarheit folgende Resultate:

Tabelle 7-6: Farbe und Klarheit nach 6 Monaten: Lagerbedingungen: Kühlraum, Raumtemperatur und 40°C

	Kühlraum		Raumtemperatur		40°C	
	i.O.	n. i.O.	i.O.	n. i.O.	i.O.	n. i.O.
Versuch 1	X		X		X	
Versuch a	X		X		X	
Versuch b	X			X		X
Versuch ab	X			X		X
Versuch c	X		X		X	
Versuch ac	X		X		X	
Versuch bc	X		X			X
Versuch abc	X		X			X

Tabelle 7-6 zeigt den Effekt des Faktors B. Immer dann, wenn Faktor B auf hohem Niveau ist, sind die Versuche b, ab, bc und abc nicht in Ordnung. Die Versuche mit Faktor B auf hohem Niveau sind von Hand begast worden. Dieses Resultat stimmt mit den Resultaten des Faktoren Designs überein, in dem die Begasung von Hand einen negativen Einfluss auf die Wirkstoffstabilität von PPC hat.

7.2.2 Resultate pH-Werte

Alle Versuche lagen bei allen drei Lagerbedingungen über den Zeitraum von 6 Monaten innerhalb der geforderten Grenzen von pH 3,0 – 5,0 (vgl. Anhang 11.9).

7.2.3 Resultate Osmolalität

Die gemessenen Werte für die Osmolalitäten sind nicht mittels Yates auf signifikante Effekte und Wechselwirkungen untersucht worden. Wichtig für TAP-Lösung ist, dass die applizierte Lösung innerhalb des isotonen Bereiches liegt. Wie aus Tabelle 11-7 hervorgeht, liegen die Osmolalitäten für alle Versuche während des Stabilitätstestes innerhalb der geforderten Grenze von 281-297mosmol/kg. Das Resultat vom Wiederholversuch 2 liegt zu den Zeitpunkten t_0 und nach 6 Monaten bei 40°C mit 297mosmol/kg knapp oberhalb der Limite. Das wird jedoch als unkritisch betrachtet.

7.3 Wirkstoffgehalt der Versuche c und ab über 6 Monate im Vergleich

Versuch c hat sich im Faktoren Design als der beste Versuch erwiesen. Der Verlauf der Wirkstoffgehalte über den Lagerzeitraum von 6 Monaten stellt sich wie folgt dar:

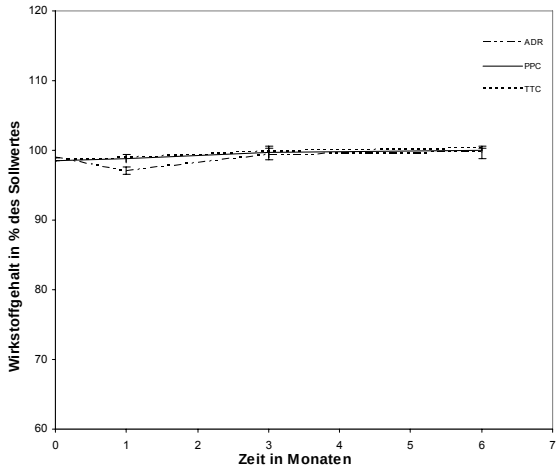

Abbildung 7-1: Versuch c, Lagerung im KS

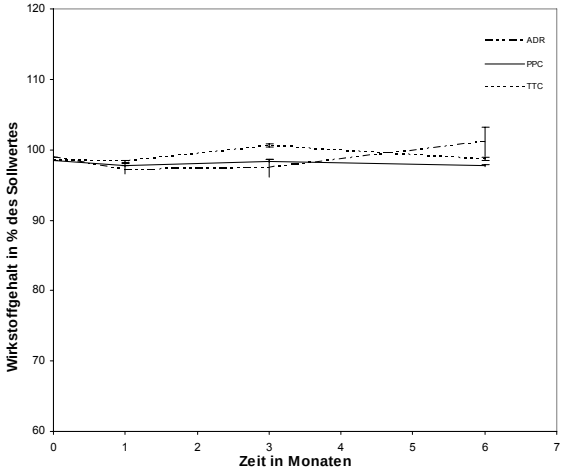

Abbildung 7-2: Versuch c, Lagerung bei RT

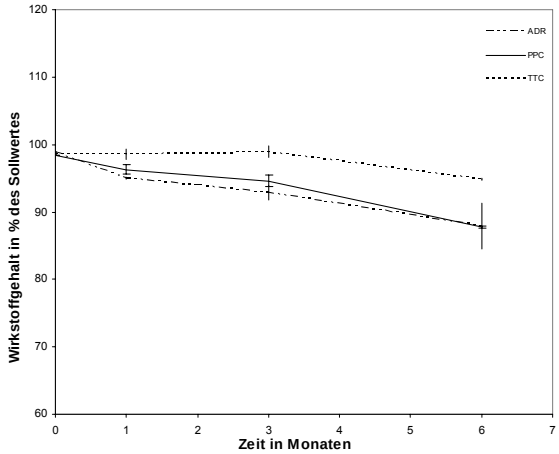

Abbildung 7-3: Versuch c, Lagerung bei 40°C

Versuch ab hat sich im Faktoren Design als der schlechteste Versuch erwiesen. Der Verlauf der Wirkstoffgehalte über einen Lagerzeitraum von 6 Monaten sieht wie folgt aus:

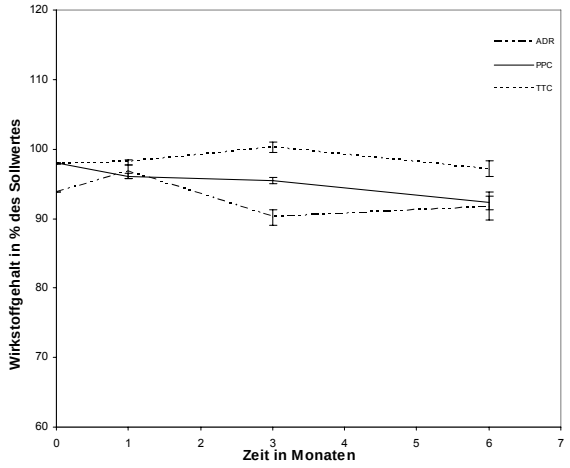

Abbildung 7-4: Versuch ab, Lagerung im KS

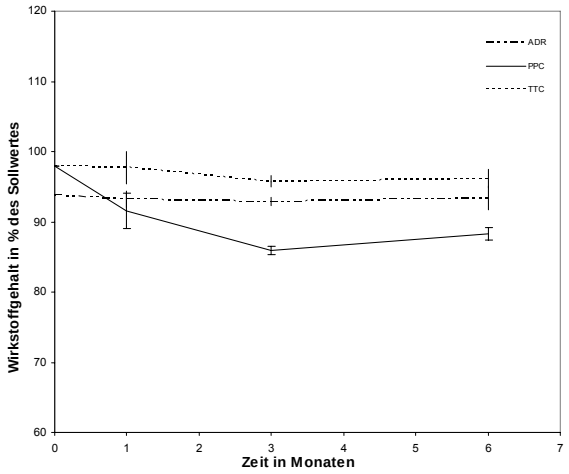

Abbildung 7-5: Versuch ab, Lagerung bei RT

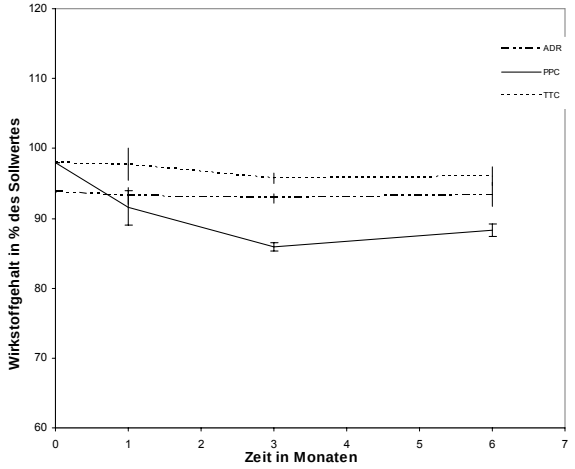

Abbildung 7-6: Versuch ab, Lagerung bei 40°C

Hier zeigt sich noch einmal deutlich, dass TAP-Lösung nicht autoklaviert werden kann.

7.4 Zusammenfassung der Resultate

Für die Herstellung von TAP-Lösung kann folgende Empfehlung abgegeben werden. TAP-Lösung kann nicht autoklaviert werden. Die Keimfiltration bleibt als Sterilisationsmethode weiterhin bestehen. Ascorbinsäure hat sich als alternatives Antioxidans nicht bewährt. Natriummetabisulfit wird weiterhin als Bestandteil der Formulierung enthalten sein. Die Formulierung sollte durch Zusatz von Natriumchlorid isotonisiert werden. Die Inertbegasung von Hand hat deutliche Nachteile auf die Wirkstoffstabilität von Proxymetacainhydrochlorid gezeigt. Daher sollte ein geeignetes Gerät zur Abfüllung und Begasung von Flüssigkeiten unter Inertgasatmosphäre evaluiert werden.

Im Faktoren Design wurde mit Argon als Inertgas gearbeitet. In der Praxis wird jedoch Medizinalstickstoff verwendet. Wie unter 4.5.1.1 beschrieben, ist Argon wegen seiner besseren Löslichkeit in Wasser und seiner grösseren Dichte als Inertgas besser geeignet als Stickstoff. Da bei der derzeitigen Herstellung von TAP-Lösung Medizinalstickstoff verwendet und die Begasung von Hand durchgeführt wird, bleibt die Haltbarkeit von TAP-Lösung bei 6 Monaten bestehen. Ob eine Verlängerung der Haltbarkeit auf z.B. ein Jahr möglich ist, müssen Langzeitstabilitätstests beweisen. Die Lagerung von TAP-Lösung bei 2-8ºC wird empfohlen.

Aufgrund der Gesamtheit aller Ergebnisse werden, müssen die Anforderungen an TAP-Lösung neu definiert werden:

Tabelle 7-7: Alte und neue Anforderungen an TAP-Lösung im Vergleich

		Alt	Neu
Menge / Einheit:	Füllmenge	3,6-4,4g	3,6-4,4g
Eigenschaft:	klare und farblose Flüssigkeit	entspricht	entspricht
Identität:	Proxymetacain	entspricht	entspricht
	Tetracain	entspricht	entspricht
	Adrenalin	entspricht	entspricht
	Chlorid	entspricht	entspricht
Gehalt:	Proxymetacain HCl	4,75-5,25g/L	4,75-5,25g/L
	Tetracain HCl	4,75-5,25g/L	4,75-5,25g/L
	Adrenalintartrat	450-550mg/L	450-550mg/L
Reinheit:	Farbe und Klarheit	entspricht	entspricht
pH-Wert:		3,0-5,0	3,0-5,0
Osmolalität		120-160mosm/kg	281-297mosm/kg
Steriltest:		steril	steril
Lagerungsbedingungen:		Raumbedingungen	2-8ºC
Verwendungsdauer:		6 Monate	6 Monate

Die neuen Anforderungen an TAP-Lösung werden in die Spezifikation, die noch zu erstellen ist, aufgenommen.

8 Konklusionen

Faktoren Design ist prinzipiell eine effektive Methode, um Formulierungen und Prozesse zu optimieren. Es bietet die Möglichkeit, signifikante Einflussgrössen von nicht signifikanten zu trennen. Die als signifikant identifizierten Einflussgrössen wie z. B. die Begasung von Hand müssen dann in einem weiteren Schritt auf ihr Optimum eingestellt werden.

Die Auswertungen nach Yates haben unterschiedliche signifikante Effekte und Wechselwirkungen ergeben, je nachdem ob mit der Dreifachwechselwirkung oder den Wiederholversuchen als Versuchsfehler gerechnet worden ist. In den meisten Lehrbüchern der pharmazeutischen Technologie ist zu dem Thema statistische Versuchsplanung ein und dasselbe Beispiel angegeben. Dieses Beispiel ist ein konstruiertes, in dem mit ABC als Versuchsfehler gerechnet wird [12, 38]. Um aber einen gesamthaften Überblick über mögliche signifikante Faktoren und Wechselwirkungen und damit schlussendlich mögliche Lösungsansätze für ein Problem zu bekommen, empfiehlt es sich, die Auswertung eines solchen Designs mit beiden Methoden vorzunehmen.

In dem Beanstandungsbericht von 2002 [36] ist man davon ausgegangen, dass das Adrenalin die Ursache für die Verfärbung der TAP-Lösung sei. Im Faktoren Design hat sich jedoch gezeigt, dass die Handbegasung bei PPC zu einem Wirkstoffverlust führt. Wie unter 0 beschrieben, können sich PPC haltige Lösungen unter Zutritt von Wärme und Luft bräunlich verfärben. Eine mögliche Ursache für die Verfärbung der TAP-Lösung könnte demnach auch das PPC gewesen sein. Zumal bei der damaligen Untersuchungen zu der Beanstandung mögliche Abbauprodukte von Adrenalin, die für die Verfärbung verantwortlich hätten sein können, nicht identifiziert werden konnten.

Die Auswahl eines geeigneten Gerätes, um sauerstoffempfindliche Flüssigkeiten unter Inertgasatmospäre abfüllen zu können, wird noch einige Probleme aufwerfen. Eigentlich wäre eine kleine Abfüllstrasse optimal, in der die leeren Primärverpackungen vor dem Einfüllen der Lösung mit Inertgas geflutet werden würden. Abschliessend müsste der Kopfraum begast und die Primärverpackung direkt verschlossen werden. Dies würde der Arbeitsweise der Ampullenabfüllmaschine entsprechen. Solche Maschinen setzten aber eine Mindestansatzgrösse voraus. Und hier liegt das Problem der Spital-Pharmazie. Für viele Geräte sind unsere Ansatzmengen einfach zu klein. Die Evaluation eines geeigneten Gerätes steht derzeit in der Spital-Pharmazie noch aus.

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Dr. R. Leu Marseiler, Leiterin Qualitätssicherung Spital-Pharmazie, durchgeführt. Ihr gilt mein besonderer Dank für die stete Diskussionsbereitschaft und für das Durchsehen des Skriptes.

Herrn Dr. R. Werner, Leiter Herstellung Spital-Pharmazie, danke ich für die Freistellung, um die Arbeit durchführen und verfassen zu können.

Ich möchte mich sehr herzlich bei den Mitarbeitern der Sterilabteilung der Spital-Pharmazie bedanken, die mich tatkräftig in der Durchführung der Versuche unterstützt haben.

Frau Katja Zimmermann, wissenschaftliche Mitarbeiterin Spital-Pharmazie, danke ich für ihre spontane Hilfestellung bei Informatik-Problemen.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Ch. Surber, Fachtechnischer Leiter Spital-Pharmazie, für die Möglichkeit zur Ausbildung zur Spitalapothekerin FPH danken.

10 Verzeichnisse

10.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ZNS	Zentrales Nervensystem
TTC	Tetracainhydrochlorid
PPC	Proxymetacainhydrochlorid
ADR	Adrenalintartrat
WFI	Wasser für Injektionszwecke
WBV	Wasser behandelt vollentsalzt (= gereinigter Wasser PhEur)
WHV	Wiederholversuch
KR	Kühlraum
RT	Raumtemperatur
k. A.	Keine Angaben

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4-1: Wirkungsmechanismus von Lokalanästhetika 9

Abbildung 4-2: Strukturformel von Tetracainhydrochlorid 14

Abbildung 4-3:Strukturformel von Proxymetacainhydrochlorid 14

Abbildung 4-4: Strukturformel von Adrenalin 14

Abbildung 4-5: Strukturformel von 4-Butylaminobenzoesäure 17

Abbildung 4-6: Strukturformel von 3-Amino-4 -propoxybenzoesäure 17

Abbildung 4-7: Strukturformel von Adrenochrom 17

Abbildung 4-8: Oxidation von Ascorbinsäure in wässriger Lösung 25

Abbildung 7-1: Versuch c, Lagerung im KS 55

Abbildung 7-2: Versuch c, Lagerung bei RT 55

Abbildung 7-3: Versuch c, Lagerung bei 40°C 55

Abbildung 7-4: Versuch ab, Lagerung im KS 56

Abbildung 7-5: Versuch ab, Lagerung bei RT 56

Abbildung 7-6: Versuch ab, Lagerung bei 40°C 56

Abbildung 11-1: Konzentration von gelöstem Sauerstoff in Wasser in Abhängigkeit von der Begasungszeit mit Stickstoff resp. Argon als Schutzgas 72

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Zusammensetzung von TAP-Lösung 12

Tabelle 4-2: Anforderungen an TAP-Lösung 13

Tabelle 4-3: Chemisch-physikalische Eigenschaften von Tetracainhydrochlorid, Proxymetacainhydrochlorid, Adrenalintartrat **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Tabelle 4-4: Art der Anwendung und Dosierung von Tetracain 18

Tabelle 4-5: Art der Anwendung und Dosierung von Proxymetacain 19

Tabelle 4-6: Art der Anwendung und Dosierung von Adrenalin 21

Tabelle 4-7: schwefelhaltige anorganische Antioxidantien für wässrige Lösungen 23

Tabelle 4-8: Faktoren Design: gebräuchliche Definitionen 26

Tabelle 4-9: Versuchsplan nach Yates für ein 2^3 Faktoren Design 27

Tabelle 4-10: Kennzahlen einiger Inertgase 33

Tabelle 4-11: Zusammensetzungen der TAP-Lösungen für das Faktoren Design im Vergleich 36

Tabelle 4-12: Versuchsplan nach Yates für ein 2^3 Design mit randomisierter Versuchsreihenfolge 37

Tabelle 6-1: Chromatographische Bedingungen zur Gehaltsbestimmung von Adrenalintartrat 44

Tabelle 6-2: Pipettierschema zum Herstellen der Kalibrationslösungen von ADR 44

Tabelle 6-3 : Chromatographische Bedingungen zur Gehaltsbestimmung von Tetracain- und Proxymetacainhydrochlorid 45

Tabelle 6-4: Gradient zur Gehaltsbestimmung von Tetracain- und Proxymetacainhydrochlorid 45

Tabelle 6-5: Konzentrationsbereiche der Kalibrationslösungen 46

Tabelle 6-6: Pipettierschema zum Herstellen der Kalibrationslösungen 46

Tabelle 7-1: Übersicht über signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit ABC und Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers 47

Tabelle 7-2: Signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit den Zahlenwerten für die einfachen Effekte 48

Tabelle 7-3: Vergleich der Versuchsstreuungen für Adrenalintartrat und Faktor A 49

Tabelle 7-4: Wirkstoffgehalt von Adrenalintartrat nach 6 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur und 40°C 49

Tabelle 7-5: Vergleich der Versuchsstreuungen für PPC und Faktor A 52

Tabelle 7-6: Farbe und Klarheit nach 6 Monaten: Lagerbedingungen: Kühlraum, Raumtemperatur und 40°C 54

Tabelle 7-7: Alte und neue Anforderungen an TAP-Lösung im Vergleich 57

Tabelle 11-1: Defekturmässige Herstellung von TAP-Lösung in den Jahren 2002 bis 2005 67

Tabelle 11-2: Osmolalität von TAP-Lösung verschiedener Produktionschargen im Zeitraum 2003 - 2005 67

Tabelle 11-3: Übersicht über signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit ABC als Varianz des Versuchsfehlers 75

Tabelle 11-4: Übersicht über signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers 76

Tabelle 11-5: pH-Werte bei Lagerung im Kühlraum, bei Raumtemperatur und bei 40°C zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung, nach einem und nach 6 Monaten 81

Tabelle 11-6: Farbe und Klarheit bei Lagerung im Kühlraum, bei Raumtemperatur und bei 40°C zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung, nach einem und nach 6 Monaten 82

Tabelle 11-7: Osmolalität der Versuche aus dem Faktoren Design zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung bei 2-8ºC, 15-25ºC und bei 40ºC 83

Tabelle 12-1: Resultate Faktoren Design Adrenalin direkt nach Herstellung 84

Tabelle 12-2: Resultate Faktoren Design PPC direkt nach Herstellung 85

Tabelle 12-3: Resultate Faktoren Design TTC direkt nach Herstellung 86

Tabelle 12-4: Resultate Faktoren Design Adrenalin 6 Monate Kühlraum 87

Tabelle 12-5: Resultate Faktoren Design PPC 6 Monate Kühlraum 88

Tabelle 12-6: Resultate Faktoren Design TTC 6 Monate Kühlraum 89

Tabelle 12-7: Resultate Faktoren Design Adrenalin 6 Monate Raumtemperatur 90

Tabelle 12-8: Resultate Faktoren Design PPC 6 Monate Raumtemperatur 91

Tabelle 12-9: Resultate Faktoren Design TTC 6 Monate Raumtemperatur 92

Tabelle 12-10: Resultate Faktoren Design Adrenalin 6 Monate 40ºC 93

Tabelle 12-11: Resultate Faktoren Design PPC 6 Monate 40ºC 94

Tabelle 12-12: Resultate Faktoren Design TTC 6 Monate 40ºC 95

10.4 Literaturverzeichnis

[1] Hegenbarth MA, Altieri MF, Hawk WH, Greene A, Ochsenschlager DW, O`Donnell R: Com parison of topical tetracaine, adrenaline, and cocaine anesthesia with lidocaine infiltration for repair of lacerations in children. Ann Emerg Med. 1990 Jan; 19 (1): 63-7.

[2] TerndrupTE, Walls HC, Mariani PJ, Gavula DP, Madden CM, Cantor RM: Plasma cocaine and tetracaine levels following application of topical anaesthesia in children. Ann Emerg Med 1992; Febr; 21 (2): 162-66.

[3] Blackburn PA, Butler KH, Hughes MJ, Clark MR, Riker.: Comparison of topical tetracaine, adrenaline, and cocaine anesthesia with lidocaine infiltration for repair of lacerations in chil dren. Ann Emerg Med. 1990 Jan;19(1):63-7.

[4] Schilling CG, Bank DE, Borchert BA, Klatzko MD, Udem DL.: Tetracaine, epinephrine (adrenalin), and cocaine (TAC) versus lidocaine, epinephrine, and tetracaine (LET) for anesthesia of lacerations in children. Ann Emerg Med 1995, Febr; 25 (2): 203-208.

[5] Smith GA, Strausbaugh SD, Harbeck-Weber C, Shields BJ, Powers JD, Hackenberg D.: Comparison of topical anesthetics without cocaine to tetracaine-adrenaline-cocaine and lido caine infiltration during repair of lacerations: bupivacaine-norepinephrine is an effective new topical anesthetic agent. Pediatrics. 1996 Mar;97(3):301-7.

[6] Ruetsch YA, Boni T, Borgeat A: From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. Curr Top Med Chem. 2001 Aug;1(3):175-82.

[7] Rimpler H. Biogene Arzneistoffe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1990. S. 344.

[8] Box George E: P. Statistics for Experiments, 1. Auflage 1978, S. 638.

[9] Striebel W. Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis. Stuttgart: Schattenauer 2003. S. 303.

[10] Striebel W. Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis. Stuttgart: Schattenauer 2003. S. 302.

[11] Ascorbinsäure. In: Kommentar zur PhEur Nachtrag 1999.

[12] Bauer KH, Frömming KH, Führer C. Pharmazeutische Technologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag1993. S. 10-12.

[13] Stiles J, Krohne S, Rankin A, Chang M:The efficacy of 0,5% proparacaine stored at room temperature. Vet Ophthalmol. 2001 Sep;4(3):205-7.

[14] Dolder R, Skinner F: Ophthalmika: Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1990. S. 301-2.

[15] Tetracain. In: Arzneistoffprofile, 3. Ergänzungslieferung Juni 1985, Govi Verlag GmbH, Frankfurt am Main.

[16] Tetracainhydrochlorid. In: Hagers`s Handbuch, 5. Auflage, S. 830.

[17] Baran H, Schwedt G: Identifizierung von Epinehrin (Adrenalin) Zersetzungsprodukten in Infusionslösungen mittels HPLC und Multidetektion. Pharmazie. 1993;48: 205-205

[18] Adrenalintartrat. In: Hager`s Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, CD Rom 2004.

[19] Wawersik J: History of anesthesia in Germany. J. Clin. Anesth. 1991; 3: 235-244.

[20] Sucker H, Fuchs P, Speiser P: Pharmazeutische Technologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1978, S. 128.

[21] La Scala G. Die Wundbehandlung beim Kind. Paediatrica. Vol. 14 No. 5. 2003, S. 16 – 21.

[22] Senn S: Statistical Issues in Drug Development. Chichester: Johm Wiley & Sons Ltd. 1997, S. 141-152.

[23] Alcain®. In: Morant J. Arzneimittelkompendium der Schweiz® 2004. 25. Auflage. Basel: Documed AG. 2004. S.76-7.

[24] Ursapharm. Fachinformation von Proparacain-POS 0,5%® (Deutschland).

[25] AHFS drug information. Bethesda (Md.). American Society of Health-System Pharmacists. S. 2803.

[26] Dannaker CJ, Maibach HI, Austin E: Allergic contact dermatitis to proparacaine with subsequent cross-sensitization to tetracaine from ophthalmic preparations. Am J Contact Dermat. 2001 Sep;12(3):177-9.

[27] Adrenalin 1mg Sintetica®. In: Arzneimittelkompendium der Schweiz® 2006. 27. Auflage. Basel. Dokumed AG. 2006. S. 53-4.

[28] Sucker H, Fuchs P, Speiser P: Pharmazeutische Technologie. Stuttgart: Georg Thieme Ver lag, 1978, S. 470.

[29] Sodium Metabisulfite. In: Rowe R. C., Sheskey P. J., Weller P. J.: Handbook of Pharmaceutical Exipients Fourth Edi tion. London, Chicago: American Pharmaceutical Association, 2003, S. 571-3.

[30] Schöffling U: Arzneiformenlehre. Stuttgart. Deutscher Apotheker Verlag, 1998.

[31] Ullmann`s Encyclopedia, Industrial Inorganic Chemicals and Products 1998, 6. Volume S. 4538.

[32] Roth H, Eger K, Troschütz R: Pharmazeutische Chemie II Arzneistoffanalyse Reaktivität Stabilität Analytik: Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1997.

[33] Ascorbinsäure . In: Hager`s Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, CD Rom 2004.

[34] Ascorbic Acid. In: Rowe Sheskey Weller. Handbook of Pharmaceutical Exipients Fourth Edition. S. 32

[35] Thoma K, Struve M: Stabilisierung von Adrenalin-Lösungen. Pharm Acta Helv. 1986;61(2):34-41.

[36] Figueiredo V. Beanstandungsbericht zur Beanstandung B2002/10 TAP-Lösung 4ml. Spital-Pharmazie des Universitätsspitals Basel (2002).

[37] Porro M, Hehl C, Factorial Design. Galenik-Seminar Pharmazeutisches Institut der Universität Basel, 06.November 2000.

[38] Sucker H, Fuchs P, Speiser P: Pharmazeutische Technologie. Stuttgart: Georg Thieme Ver lag, 1978, S. 129.

[39] Niesel, Regionalanästhesie Lokalanästhesie Regionale Schmerztherapie, Thieme Verlag, 1994.

[40] Box George E: P. et al. Statistics for Experiments, 1. Auflage 1978, S. 319ff.

[41] Epinephrinhydrogentartrat. In: Kommentar zur Europäischen Pharmakopöe 4.00. Schweizer Ausgabe. 19. Lieferung. Eschborn: Govi Verlag 2005.

[42] Sucker H, Fuchs P, Speiser P: Pharmazeutische Technologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1978, S. 126 ff.

[43] Rowe R. C., Sheskey P. J., Weller P. J.: Handbook of Pharmaceutical Exipients Fourth Edi tion. London, Chicago: American Pharmaceutical Association, 2003, S. 571.

[44] Burger A. Wachter H. Pharmazeutisches Wörterbuch. 8. Auflage. De Gruyter Verlag Berlin. New York. 1998.

[45] Lidocaine Hydrochloride 4%, Epinephrine Hydrochloride 0,05% and Tetracaine hydrochloricde 0,5% Topical Solution. In: International Journal of Pharmaceutical Compounding. Vol. 8. No. 6 November / December 2004.

[46] Striebel W. Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis. Stuttgart: Schattenauer 2003. S. 293.

[47] Striebel W. Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis. Stuttgart: Schattenauer 2003. S. 300-2.

[48] Epinephrin In: Arzneistoffprofile, 2. Ergänzungslieferung November 1983, Govi-Verlag, Frankfurt am Main.

[49] Sodium chloride In: Rowe R. C., Sheskey P. J., Weller P. J.: Handbook of Pharmaceutical Exipients Fourth Edition. London, Chicago: American Pharmaceutical Association, 2003, S. 556-8.

11 Anhang

11.1 Defekturmassstab von TAP-Lösung

Tabelle 11-1: Defekturmässige Herstellung von TAP-Lösung in den Jahren 2002 bis 2005

Jahr	Anzahl Stechampullen / Jahr	Anzahl Originalpackungen / Jahr
2005	1220 Stechampullen	48
2004	1220 Stechampullen	48
2003	1275 Stechampullen	51
2002	1150 Stechampullen	46

11.2 Osmolalität TAP-Lösung (25x4ml) seit 2003

Tabelle 11-2: Osmolalität von TAP-Lösung verschiedener Produktionschargen im Zeitraum 2003 - 2005

Probennummer	Chargennummer	Osmolalität [mosmol/kg]
030704-02	030627S01	141 / 142
031010-03	030930S01	137 / 141
040309-03	040225S03	139 / 139
040526-17	040525S01	139 / 139
040920-05	040915S01	138 / 137
050216-01	050131S01	143 / 138
050419-03	050415S01	139 / 139
050817-06	050811S01	139 / 138

11.3 Berechnung zur Isotonisierung

Berechnung nach der DAC Methode

$$HS[\%] = \frac{0{,}52K - n \bullet \Delta T_A 1\%}{\Delta T_H 1\%}$$

HS	Menge isotonischer Zusatz in %
0,52K	Gefrierpunktserniedrigung der Körperflüssigkeit
n	Gehalt des Arzneistoffes in %
$\Delta T_A 1\%$	Gefrierpunktserniedrigung einer 1% Lösung des Arzneistoffes [K], Wert ist tabelliert
$\Delta T_H 1\%$	Gefrierpunktserniedrigung einer 1% Lösung des isotonisierenden Zusatzes [K], Wert ist tabelliert, Δ T (NaCl)1% = 0,58K

Ist ΔT_A unbekannt, so wird ΔT_A mit folgender Formel abgeschätzt:

$$\Delta T_A = \frac{16{,}95 \bullet Z}{M_{R(A)}}$$

Z	Wertigkeit
$M_{R(A)}$	Molekulargewicht des Arzneistoffes (g/mol)

Berechnung der benötigten Menge Natriumchlorid zur Isotonisierung der TAP-Lösung

Annahme: Die Werte für $\Delta T_A 1\%$ für Tetracainhydrochlorid, Proxymetacainhydrochlorid und Adrenalintartrat sind unbekannt:

Berechnung von $\Delta T_A 1\%$ für Tetracainhydrochlorid:

$$\Delta T(Tetracainhydrochlorid)1\% = \frac{16{,}95 \bullet 2}{300{,}8}$$

$\Delta T(Tetracainhydrochlorid)$ 1% = 0,11

(vgl. Tabellenwert DAC 1999: DAC-Anlage B = 0,11)

Berechnung von $\Delta T_A 1\%$ für Adrenalintartrat:

$$\Delta T(Adrenal\,\mathrm{int}\,artrat)1\% = \frac{16{,}95 \bullet 2}{303{,}3}$$

$\Delta T(Adrenal\,\mathrm{int}\,artrat)1\%$ = 0,11

(vgl. Tabellenwert DAC 1999: DAC-Anlage B = 0,11)

Berechnung von $\Delta T_A 1\%$ für Proxymetacainhydrochlorid:

$$\Delta T(\mathrm{Pr}\,oxymetacainhydrochlorid)1\% = \frac{16{,}95 \bullet 2}{330{,}9}$$

$\Delta T(\mathrm{Pr}\,oxymetacainhydrochlorid)1\%$ = 0,10

(Tabellenwert DAC 1999: DAC-Anlage B, kein Tabellenwert vorhanden)

Alternative Berechnung von $\Delta T_A 1\%$ für Proxymetacainhydrochlorid

$$\Delta T(\mathrm{Pr}\,oxymetacainhydrochlorid)1\% = \frac{3{,}4 \bullet 10}{330{,}9}$$

$\Delta T(\mathrm{Pr}\,oxymetacainhydrochlorid)1\%$ = 0,10

Berechnung der benötigten Menge Natriumchlorid als isotonisierender Zusatz:

$$HS[\%] = \frac{0{,}52K - \left(\left(0{,}5 \bullet 0{,}1\right) + \left(0{,}5 \bullet 0{,}11\right) + \left(0{,}05 \bullet 0{,}11\right) + \left(0{,}05 \bullet 0{,}27\right)\right)}{0{,}58}$$

$HS =$ 0,683%

Während der Herstellung von TAP-Lösung werden die Substanzen in Natiumchloridlösung 0,9% aufgelöst. Die bedeutet, dass bereits eine Natriumchloridkonzentration von 0,225% vorhanden ist, die von der berechneten Gesamtmenge an isotonisierendem Zusatz abzuziehen ist.

0,683% - 0,225% = 0,458%

In 100ml TAP-Lösung müssen noch 458mg Natriumchlorid als Festsubstanz zugegeben werden.

Aufgrund der Berechnung ergibt folgende Zusammensetzung der TAP-Lösung:

Tetracainhydrochlorid	500mg
Proxymetacainhydrochlorid	500mg
Adrenalintartrat	50mg
Natriummetabisulfit	50mg
Natriumchlorid	683mg
Wasser für Injektionszwecke	ad 100ml

Die Osmolalität der TAP-Lösung mit dieser Zusammensetzung ist erneut gemessen worden. Die Lösung war mit 273mosmol/kg immer noch hypoton. Mit den zur Berechnung der benötigten Menge an Natriumchlorid verwendeten Formeln können nur Näherungswerte berechnet werden.

Die für die Erreichung des angestrebten Osmolalitätsbereiches von 281-297mosmol/kg mussten schlussendlich 485mg Natriumchlorid pro 100ml TAP-Lösung als Festsubstanz zugegeben werden.

Die finale Zusammensetzung der TAP-Lösung wie sie mit Natriummetabisulfit im Faktorendesign einsetzt worden ist, sieht also wie folgt aus:

Tetracainhydrochlorid	500mg
Proxymetacainhydrochlorid	500mg
Adrenalintartrat	50mg
Natriummetabisulfit	50mg
Natriumchlorid	705mg
Wasser für Injektionszwecke	ad 100ml

11.4 Auswahl eines geeigneten Schutzgases

Die Abbildung 11-1 zeigt die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in Wasser in Abhängigkeit von der Zeit. Es ist ein Volumen von 2l WFI begast worden, was einer repräsentativen Ansatzgrösse für TAP-Lösung entspricht.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, werden mit Argon tiefere Restsauerstoffkonzentrationen im WFI als mit Stickstoff erreicht. Argon wird als Schutzgas gewählt, die Begasungszeit von 2l WFI wird auf 45 Minuten festgelegt.

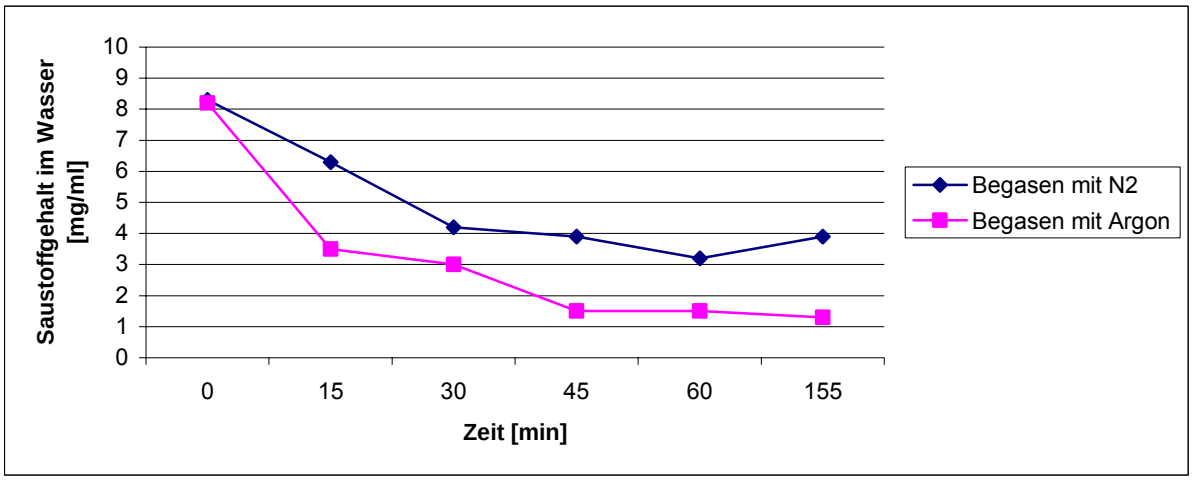

Abbildung 11-1: Konzentration von gelöstem Sauerstoff in Wasser in Abhängigkeit von der Begasungszeit mit Stickstoff resp. Argon als Schutzgas

11.5 Berechnung der Menge Ascorbinsäure als Antioxidans

Für die alternative Formulierung soll Ascorbinsäure in der gleich Stoffmenge vorhanden sein wie Natriummetabisulfit in der ursprünglichen TAP-Lösung.

In der ursprünglichen Formulierung sind 50mg Natriummetabisulfit pro 100ml TAP-Lösung enthalten.

Rechnung:

0,05g NMBS in 100ml Lösung

1mol NMBS	$\hat{=}$	190,1g	
X_1	$\hat{=}$	0,05g	$X_1 = 2{,}63 \cdot 10^{-4}$

In 100ml TAP-Lösung sind $2{,}63 \cdot 10^{-4}$ mol NMBS enthalten.

Diese Stoffmenge wird auch für die alternative Formulierung zu Grunde gelegt.

Ascorbinsäure hat ein molekulares Gewicht von 176,1g/mol. $2{,}63 \cdot 10^{-4}$ mol Ascorbinsäure entsprechen einer Einwaage von 46,3mg pro 100ml Lösung.

11.6 Lösungen für die Analytik

Phosphorsäure 0,05 molar zur pH Einstellung

In einem Messkolben 2000ml wird ein Grossteil des WBV vorgelegt. 11,53g Phosphorsäure 85% werden abgewogen und quantitativ in den Messkolben überführt. Mit WBV auf 2000ml auffüllen.

Pufferlösung 0,05 molar pH 2,5 für HPLC (Adrenalinbestimmung)

13,60g Kaliumhydrogenphosphat und 1,32g Octan-1-sulfonsäure werden in einem Grossteil WBV gelöst. Mit 0,05 molarer Phosphorsäure wird auf einen pH von 2,5 eingestellt und mit WBV auf 2000ml ergänzt.

Mobile Phase für HPLC (Adrenalinbestimmung)

Solution A: 900ml Pufferlösung 0,05molar pH 2,5 und 100ml Acetonitril

Solution B: 700ml Pufferlösung 0,05molar pH 2,5 und 300ml Acetonitril

Phosphatpuffer 0,05molar pH 3,0 (Tetracain- und Proxymetacainbestimmung)

13,60g Kaliumhydrogenphosphat werden in einem Grossteil WBV gelöst. Mit Phosphorsäure 0,05 molar wird auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt. Mit WBV wird auf ein Volumen von 2000ml ergänzt.

Standardlösung für Prüfpunkt Farbe und Klarheit

2ml einer 0,1N Iodlösung werden mit WBV im Messkolben auf ein Volumen von 500ml aufgefüllt.

11.7 Einzelauswertungen: ABC und Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers

Tabelle 11-3: Übersicht über signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit ABC als Varianz des Versuchsfehlers

Wirkstoff	Faktor			Wechselwirkungen				Zeitpunkt der Probenahme
Adrenalintartrat	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
	+	-	-	-	-	-	-	Direkt nach Herstellung
	+	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten KS
	+	-	-	+	-	-	-	Nach 6 Monaten RT
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten 40ºC
PPC	-	-	-	-	-	-	-	Direkt nach Herstellung
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten KS
	-	+	+	-	-	+	-	Nach 6 Monaten RT
	-	+	+	-	-	+	-	Nach 6 Monaten 40ºC
TTC	-	-	-	-	-	-	-	Direkt nach Herstellung
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten KS
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten RT
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten 40ºC

Legende
+ Signifikant
- Nicht signifikant

Tabelle 11-4: Übersicht über signifikante Faktoren und Wechselwirkungen mit Wiederholversuchen als Varianz des Versuchsfehlers

Wirkstoff	Faktor			Wechselwirkungen				Zeitpunkt der Probenahme
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
Adrenalintartrat	-	-	-	-	-	-	-	Direkt nach Herstellung
	+	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten KS
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten RT
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten 40ºC
PPC	-	-	-	-	-	-	-	Direkt nach Herstellung
	+	+	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten KS
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten RT
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten 40ºC
TTC	-	-	-	-	-	-	-	Direkt nach Herstellung
	+	-	+	-	-	-	-	Nach 6 Monaten KS
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten RT
	-	-	-	-	-	-	-	Nach 6 Monaten 40ºC

Legende
+ Signifikant
- Nicht signifikant

11.8 Rohdaten zur Gehaltsbestimmung von Tetracain, Proxymetacain, Adrenalin über 6 Monate

Zeit in Monaten nach Herstellung	0	0	0	0	1	1	1	1
Messung (x/y : x = vial, y = Injektion)	1/1	1/2	2/1	2/2	1/1	1/2	2/1	2/2
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Versuch 1 Adrenalin KS	501,36	502,16	k. A.	k. A.	494,44	490,12	492,86	494,22
Versuch 1 Adrenalin RT					502,97	504,07	498,56	497,75
Versuch 1 Adrenalin 40 Grad					496,62	496,94	481,23	479,83
Versuch 1 PPC KS	5129.47	5089.47	5047.78	5077.89	4965,70	4974,43	5016,74	5005,59
Versuch 1 PPC RT					5168,875	5159,45	Pipettierfehler	Pipettierfehler
Versuch 1 PPC 40 Grad					4815,60	4801,35	4845,75	4818,45
Versuch 1 TTC KS	5122.77	5087.03	5040.10	5070.12	4966,99	4976,54	5020,63	5002,56
Versuch 1 TTC RT					5185,225	5173,90	Pipettierfehler	Pipettierfehler
Versuch 1 TTC 40 Grad					4934,60	4921,28	4972,88	4941,80
Versuch a Adrenalin KS	468,70	475,78	k. A.	k. A.	466,37	469,11	482,70	476,61
Versuch a Adrenalin RT					478,82	477,10	475,27	479,32
Versuch a Adrenalin 40 Grad					469,30	460,05	459,70	472,36
Versuch a PPC KS	4848,48	4829,66	4918,79	4966,97	4896,425	4875,41	4894,51	4862,51
Versuch a PPC RT					4992,625	4992,90	4994,45	4991,325
Versuch a PPC 40 Grad					4849,90	4828,85	4759,90	4763,25
Versuch a TTC KS	4904,47	4881,68	4976,44	5019,92	4952,79	4928,59	4950,41	4915,81
Versuch a TTC RT					5084,35	5086,10	5084,05	5080,325
Versuch a TTC 40 Grad					5012,80	4991,45	4925,20	4924,25
Versuch b Adrenalin KS	498,86	492,23	k. A.	k. A.	507,51	497,10	494,75	492,62
Versuch b Adrenalin RT					489,28	485,64	490,17	492,40
Versuch b Adrenalin 40 Grad					467,03	466,50	467,14	468,17
Versuch b PPC KS	4949,46	4930,13	5012,57	5002,76	4941,99	4940,35	4982,35	4974,79
Versuch b PPC RT					4850,50	4855,20	4927,05	4918,425
Versuch b PPC 40 Grad					4462,00	4436,83	4440,88	4436,75
Versuch b TTC KS	4952,40	4930,57	5023,51	5007,44	4946,99	4948,29	4987,10	4979,94
Versuch b TTC RT					4987,78	4989,35	5048,40	5044,10
Versuch b TTC 40 Grad					4918,33	4911,65	4919,48	4916,00
Versuch ab Adrenalin KS	472,73	467,98	k. A.	k. A.	481,62	480,52	487,40	491,22
Versuch ab Adrenalin RT					470,08	474,34	462,64	462,05
Versuch ab Adrenalin 40 Grad					421,29	427,81	419,18	425,82
Versuch ab PPC KS	4834,33	4817,65	4788,07	4758,445	4822,46	4780,51	4802,55	4813,65
Versuch ab PPC RT					4468,33	4471,00	4685,53	4683,43
Versuch ab PPC 40 Grad					4380,35	4360.00	4304,18	4309,75
Versuch ab TTC KS	4931	4910,955	4891,265	4849,51	4916,63	4875,64	4910,60	4917,08
Versuch ab TTC RT					4789,33	4791,00	4938,71	5025,55
Versuch ab TTC 40 Grad					4817,65	4792,38	4735,98	4739,55
Versuch c Adrenalin KS	491,02	498,12	k. A.	k. A.	487,19	481,73	485,51	487,01
Versuch c Adrenalin RT					484,20	482,90	489,70	486,42
Versuch c Adrenalin 40 Grad					475,63	473,82	474,74	476,13
Versuch c PPC KS	4912,865	4907,935	4942,57	4932,9	4956,03	4969,94	4934,68	4902,51
Versuch c PPC RT					4896,83	4889,55	4896,375	4877,325
Versuch c PPC 40 Grad					4783,88	4789,88	4822,38	4864,63
Versuch c TTC KS	4916,32	4907,25	4949,235	4937,885	4960,31	4974,56	4938,81	4913,55
Versuch c TTC RT					4921,825	4910,45	4928,725	4912,10
Versuch c TTC 40 Grad					4892,98	4895,20	4943,33	4973,28
Versuch ac Adrenalin KS	464.9	463.27	466.62	467.07	467,40	473,37	462,11	472,97
Versuch ac Adrenalin RT					471,70	472,17	470,30	476,55
Versuch ac Adrenalin 40 Grad					456,44	458,86	450,01	451,57
Versuch ac PPC KS	4809.53	4790.7	4815.02	4804.09	4813,05	4807,56	4815,24	4794,13
Versuch ac PPC RT					4797,88	4790,45	4775,10	4785,25
Versuch ac PPC 40 Grad					4732,33	4721,73	4700,50	4696,25
Versuch ac TTC KS	4884.33	4873.72	4895.79	4886.76	4910,00	4901,25	4908,46	4887,51

Zeit in Monaten nach Herstellung	0	0	0	0	1	1	1	1
Messung (x/y : x = vial, y = Injektion)	1/1	1/2	2/1	2/2	1/1	1/2	2/1	2/2
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Versuch ac TTC RT					4909,05	4907,05	4884,20	4892,15
Versuch ac TTC 40 Grad					4913,48	4902,70	4875,28	4873,03
Versuch bc Adrenalin KS	486.6	487.4	500.96	500.46	489,95	501,61	515,99	506,50
Versuch bc Adrenalin RT					488,35	489,71	488,73	491,84
Versuch bc Adrenalin 40 Grad					477,85	478,12	476,58	476,93
Versuch bc PPC KS	4937,5	4904,6	5022,59	5025,58	4908,66	4908,11	4873,08	4875,00
Versuch bc PPC RT					5038,525	5028,175	5051,10	5059,925
Versuch bc PPC 40 Grad					4929,20	4905,55	4883,875	4864,30
Versuch bc TTC KS	4941,07	4906,77	5024,38	5020,54	4918,38	4917,60	4881,50	4881,94
Versuch bc TTC RT					5044,75	5036,175	5059,30	5068,225
Versuch bc TTC 40 Grad					5005,98	4986,33	4959,15	4943,00
Versuch abc Adrenalin KS	467,14	469,77	474,39	474,215	475,19	479,52	474,34	471,57
Versuch abc Adrenalin RT					460,38	460,14	463,84	460,24
Versuch abc Adrenalin 40 Grad					449,64	447,51	449,61	447,53
Versuch abc PPC KS	4853,63	4855,88	4931,85	4911,45	4825,73	4827,35	4807,45	4806,80
Versuch abc PPC RT					4778,025	4785,50	4809,18	4809,175
Versuch abc PPC 40 Grad					4877,15	4880,75	4766,13	4756,88
Versuch abc TTC KS	4946,58	4950,79	5029,075	5013,87	4926,25	4927,83	4906,95	4908,25
Versuch abc TTC RT					4897,85	4904,23	4905,375	4906,175
Versuch abc TTC 40 Grad					4993,90	4998,08	4880,23	4872,18
WHV1 Adrenalin KS	492.67	492.13	k. A.	k. A.	506,34	506,32	503,54	497,02
WHV1 Adrenalin RT					494,81	494,87	501,48	497,28
WHV1 Adrenalin 40 Grad					481,88	478,18	475,50	486,59
WHV1 PPC KS	5129,47	5089,47	5077,88	5047,78	4975,90	4988,20	4980,28	4978,05
WHV1 PPC RT					4919,05	4911,10	Pipettierfehler	Pipettierfehler
WHV1 PPC 40 Grad					4812,60	4797,55	4865,75	4847,90
WHV1 TTC KS	5122,77	5087,03	5070,12	5040,10	4982,35	4995,93	4989,78	4990,03
WHV1 TTC RT					4941,30	4933,53	Pipettierfehler	Pipettierfehler
WHV1 TTC 40 Grad					4952,60	4939,55	5007,20	4993,23
WHV2 Adrenalin KS	464,48	461,02	466,06	465,32	476,03	471,90	474,52	466,50
WHV2 Adrenalin RT					452,56	453,32	460,54	459.89
WHV2 Adrenalin 40 Grad					410,46	410,43	409,73	443,50
WHV2 PPC KS	4708,225	4716,16	4744,025	4754,66	4754,66	4744,03	4716,16	4708,23
WHV2 PPC RT					k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
WHV2 PPC 40 Grad					k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
WHV2 TTC KS	4807,6	4814,99	4845,175	4857,36	4857,36	4845,18	4814,99	4807,60
WHV2 TTC RT					k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
WHV2 TTC 40 Grad					k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Zeit in Monaten nach Herstellung	3	3	3	3	6	6	6	6
Messung (x/y : x = vial, y = Injektion)	1/1	1/2	2/1	2/2	1/1	1/2	2/1	2/2
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Versuch 1 Adrenalin KS	494,52	495,31	491,74	493,60	496.24	498.42	489.99	494.09
Versuch 1 Adrenalin RT	503,28	498,39	499,39	503,84	504.30	501.98	516.12	510.15
Versuch 1 Adrenalin 40 Grad	475,20	476,03	467,94	469,15	430.50	440.52	406.83	404.93
Versuch 1 PPC KS	5058,675	5072,60	5055,50	4962,225	4958.03	4967.68	4966.40	4964.95
Versuch 1 PPC RT	4949,80	4927,80	4922,475	4961,45	4795.18	4812.73	4934.00	4867.38
Versuch 1 PPC 40 Grad	4726,93	4732,93	4760,13	4753,53	4418.00	4416.08	4355.18	4349.48
Versuch 1 TTC KS	5063,725	5081,33	5060,625	4972,85	4974.95	4980.45	4977.30	4980.28
Versuch 1 TTC RT	5010,10	5003,20	4991,45	5025,75	4882.30	4899.48	5026.30	4957.48
Versuch 1 TTC 40 Grad	4993,83	5003,98	5036,65	5031,03	4816.30	4822.60	4740.33	4733.25
Versuch a Adrenalin KS	471,75	470,00	474,53	472,47	475.93	477.61	472.68	474.97
Versuch a Adrenalin RT	480,11	479,07	479,09	475,35	472.59	474.15	480.33	472.61
Versuch a Adrenalin 40 Grad	457,69	455,82	466,00	466,38	419.68	374.32	456.60	417.23
Versuch a PPC KS	4904,00	4916,225	4939,425	4947,10	4817.93	4814.93	4812.30	4806.00
Versuch a PPC RT	4799,40	4736,65	4850,25	4835.35	4795.88	4808.13	4815.23	4824.23
Versuch a PPC 40 Grad	4697,88	4682,88	4576,98	4511,98	4278.10	4318.13	4268.23	4323.55
Versuch a TTC KS	4985,925	5001,925	5021,70	5029,35	4907.85	4906.35	4893.53	4896.33
Versuch a TTC RT	4931,98	4923,00	4975,025	4961.98	4935.10	4947.73	4955.43	4962.90
Versuch a TTC 40 Grad	4974,70	4964,65	4866,23	4788,75	4687.98	4734.65	4677.83	4732.28
Versuch b Adrenalin KS	495,05	490,92	490,26	495,00	487.05	497.23	488.25	494.37
Versuch b Adrenalin RT	485,84	481,23	481,07	484,50	468.07	480.71	461.20	480.51
Versuch b Adrenalin 40 Grad	417,48	416,08	383,49	384,37	400.30	404.79	374.54	389.67
Versuch b PPC KS	4950,50	4989,175	4897,75	4957,375	4880.93	4860.43	4876.53	4878.79
Versuch b PPC RT	4376,98	4339,50	4356,15	4372,60	4445.58	4456.28	4460.05	4420.63
Versuch b PPC 40 Grad	4235,90	4279,40	4223,20	4305,25	3785.95	3916.85	3803.53	3929.88
Versuch b TTC KS	5024,10	5050,125	4967,90	5017,525	4959.63	4952.13	4954.88	4953.95
Versuch b TTC RT	4910,90	4833,70	4829,075	4928,15	4885.53	4883.83	4861.98	4851.53
Versuch b TTC 40 Grad	4752,18	4846,90	4725,35	4822,05	4478.45	4641.30	4503.05	4635.78
Versuch ab Adrenalin KS	450,78	445,84	458,81	453,50	467.71	470.04	449.06	454.31
Versuch ab Adrenalin RT	463,07	466,55	469,69	463,24	475.50	460.03	476.14	461.98
Versuch ab Adrenalin 40 Grad	350,68	356,67	355,58	355,63	397.27	390.66	339.94	368.84
Versuch ab PPC KS	4743,25	4762,925	4776,575	4796,15	4637.18	4572.83	4576.70	4669.75
Versuch ab PPC RT	4272,20	4271,93	4300,35	4335,45	4373.53	4373.43	4444.35	4458.33
Versuch ab PPC 40 Grad	4160,05	4167,93	4106,05	4204,15	3758.50	3877.73	3735.93	3889.98
Versuch ab TTC KS	4999,925	5021,00	4976,575	5062,975	4904.25	4807.85	4808.78	4911.90
Versuch ab TTC RT	4769,85	4744,58	4815,825	4824,725	4741.10	4753.75	4860.40	4865.45
Versuch ab TTC 40 Grad	4729,98	4749,70	4669,40	4786,78	4452.80	4553.30	4438.68	4565.23
Versuch c Adrenalin KS	501,02	500,04	496,52	491,75	503.2	498.87	492.48	498.94
Versuch c Adrenalin RT	491,60	492,67	481,00	482,69	511.93	514.66	503.89	492.12
Versuch c Adrenalin 40 Grad	460,03	459,26	467,92	469,84	418.29	439.68	439.61	460.24
Versuch c PPC KS	5018,20	4975,775	4931,675	5023,075	5003.93	5016.73	4991.53	4996.3
Versuch c PPC RT	4907,125	4925,925	4910,475	4931,175	4893.13	4883.08	4888.08	4875.80
Versuch c PPC 40 Grad	4707,88	4733,15	4694,68	4785,05	4390.83	4373.88	4386.03	4387.85
Versuch c TTC KS	5022,80	4978,975	4935,95	5019,95	5010.35	5026.68	4999.13	5012.7
Versuch c TTC RT	5018,60	5041,00	5017,225	5041,80	4945.23	4936.35	4932.40	4925.73
Versuch c TTC 40 Grad	4920,53	4945,35	4918,68	5004,55	4743.15	4733.75	4749.70	4750.88
Versuch ac Adrenalin KS	474,70	473,39	471,08	470,02	479.49	469.75	487.08	472.39
Versuch ac Adrenalin RT	471,25	474,14	469,81	469,24	477.93	475.47	452.81	475.70
Versuch ac Adrenalin 40 Grad	449,82	449,62	453,42	452,88	427.68	426.56	435.34	438.51
Versuch ac PPC KS	4883,675	4917,675	4888,125	4929,75	4883.33	4856.63	4875.23	4861.95
Versuch ac PPC RT	4810,275	4782,825	4767,925	4816,20	4828.75	4804.40	4807.43	4827.18
Versuch ac PPC 40 Grad	4647,08	4689,48	4606,23	4590,08	4239.43	4243.55	4236.50	4245.25
Versuch ac TTC KS	4971,15	5007,425	4976,875	5024,85	4978.30	4953.53	4969.95	4959.38
Versuch ac TTC RT	4997,70	4977,475	4961,20	5003,875	4950.73	4930.75	4932.38	4948.23
Versuch ac TTC 40 Grad	4940,28	4981,83	4898,75	4878,40	4657.43	4655.58	4650.53	4657.25
Versuch bc Adrenalin KS	498,11	497,56	492,61	492,40	485.68	485.00	494.17	489.73
Versuch bc Adrenalin RT	488,73	485,36	491,45	493,77	494.14	491.91	491.37	495.43

Zeit in Monaten nach Herstellung	3	3	3	3	6	6	6	6
Messung (x/y : x = vial, y = Injektion)	1/1	1/2	2/1	2/2	1/1	1/2	2/1	2/2
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Versuch bc Adrenalin 40 Grad	467,10	465,77	465,44	466.73	443.13	442.49	435.58	433.25
Versuch bc PPC KS	5009,775	4984,55	5010,90	4975,10	4956.60	4954.68	4965.63	4954.45
Versuch bc PPC RT	4914,60	4911,95	4896,975	4906,40	4954.98	4959.75	4956.53	4948.55
Versuch bc PPC 40 Grad	4787,98	4792,25	4700,95	4854,30	4423.75	4450.28	4422.95	4450.85
Versuch bc TTC KS	5028,85	4994,99	5023,025	4986,65	4967.40	4962.13	4965.50	4965.30
Versuch bc TTC RT	5017,975	5015,05	5003,85	5008,375	4994.90	4996.90	4989.98	4980.85
Versuch bc TTC 40 Grad	4981,75	5000,45	4911,58	5048,83	4789.55	4810.08	4791.73	4815.55
Versuch abc Adrenalin KS	470,75	473,52	466,16	469,97	465.02	452.93	464.55	454.43
Versuch abc Adrenalin RT	462,02	462,72	450,13	453,25	470.29	474.66	455.82	466.92
Versuch abc Adrenalin 40 Grad	412,49	k. A.	436,20	434,44	424.75	426.26	390.66	390.00
Versuch abc PPC KS	4847,10	4861,35	4855,05	4820,55	4817.05	4790.75	4787.88	4806.25
Versuch abc PPC RT	4762,65	4758,825	4771,075	4758,925	4817.33	4898.13	4804.10	4795.53
Versuch abc PPC 40 Grad	4544.3	4591.85	4562.13	4593.93	4396.63	4400.68	k. A.	k. A.
Versuch abc TTC KS	4975,85	4989,35	4985,95	4945,80	4932.95	4909.00	4908.05	4927.30
Versuch abc TTC RT	4974.15	4972.70	4978.55	4967.58	4953.55	5042.75	4941.88	4934.68
Versuch abc TTC 40 Grad	4830.83	4880.5	4857.58	4889.63	4766.33	4771.73	k. A.	k. A.
WHV1 Adrenalin KS	495,00	493,95	501,03	493,16	490.38	492.62	501.02	499.51
WHV1 Adrenalin RT	503,70	500,86	503,38	509,79	499.14	496.47	492.84	493.50
WHV1 Adrenalin 40 Grad	475.73	476.31	475.80	471.87	460.17	482.99	457.05	484.90
WHV1 PPC KS	5049,75	5020,15	5046,475	4898,725	4950.33	4952.30	4956.05	4956.95
WHV1 PPC RT	4959,30	4788,80	4891,38	4962,125	4913.90	4925.10	4893.43	4898.10
WHV1 PPC 40 Grad	4722,53	4714,58	4793,45	4722,73	4315.45	4324.88	4335.88	4331.13
WHV1 TTC KS	5054,15	5023,875	5054,075	4892,075	4965.83	4970.50	4967.33	4973.05
WHV1 TTC RT	5034,30	4951,125	4961,525	5030,475	5004.90	5013.68	4984.43	4988.60
WHV1 TTC 40 Grad	4979,00	4957,73	5048,93	4978,45	4693.43	4699.30	4709.75	4708.30
WHV2 Adrenalin KS	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	453.27	449.70	451.32	451.66
WHV2 Adrenalin RT	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	443.62	443.15	446.83	442.96
WHV2 Adrenalin 40 Grad	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	451.98	462.86	457.62	462.46
WHV2 PPC KS	4804,825	4876,55	4797,175	4842,225	4830.75	4861.25	4859.70	4831.70
WHV2 PPC RT	4700,00	4689,90	k.A.	k.A.	4801.33	4812.45	4814.78	4817.25
WHV2 PPC 40 Grad	4557,13	4561,88	4540.00		4224.40	4186.90	4049.25	4060.40
WHV2 TTC KS	4928,775	5000,55	4901,65	4951,275	4922.73	4951.75	4957.15	4925.03
WHV2 TTC RT	4910,23	4900,70	k.A.	k.A.	4912.95	4921.80	4805.35	4926.98
WHV2 TTC 40 Grad	4852.80	4857.93	4834.00	4863.73	4614.63	4591.03	4470.50	4473.43

11.9 Rohdaten: pH-Wert

Tabelle 11-5: pH-Werte bei Lagerung im Kühlraum, bei Raumtemperatur und bei 40°C zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung, nach einem und nach 6 Monaten

Direkt nach Herstellung	Nach 1 Monat	Nach 6 Monaten	Bezeichnung der Versuche
4,225	4,245	4,295	**Versuch 1 KS**
4,225	4,23	4,295	**Versuch 1 RT**
4,225	4,08	4,22	**Versuch 1 40 Grad**
4,215	4,25	4,30	**Versuch a KS**
4,215	4,245	4,275	**Versuch a RT**
4,215	4,05	4,18	**Versuch a 40 Grad**
4,23	4,245	4,26	**Versuch b KS**
4,23	4,25	4,255	**Versuch b RT**
4,23	4,165	4,055	**Versuch b 40 Grad**
4,25	4,26	4,24	**Versuch ab KS**
4,25	4,265	4,2	**Versuch ab RT**
4,25	4,05	4,045	**Versuch ab 40 Grad**
4,445	4,505	4,51	**Versuch c KS**
4,445	4,455	4,485	**Versuch c RT**
4,445	4,33	4,345	**Versuch c 40 Grad**
4,405	4,46	4,485	**Versuch ac KS**
4,405	4.43	4,455	**Versuch ac RT**
4,405	4,38	4,33	**Versuch ac 40 Grad**
4,445	4,515	4,495	**Versuch bc KS**
4,445	4,465	4,165	**Versuch bc RT**
4,445	4,29	4,235	**Versuch bc 40 Grad**
4,235	4,26	4,325	**Versuch abc KS**
4,235	4,175	4,035	**Versuch abc RT**
4,235	3,82	4,165	**Versuch abc 40 Grad**
4,2	4,245	4,29	**Versuch WHV 1 KS**
4,2	4,245	4,265	**Versuch WHV 1 RT**
4,2	4,23	4,195	**Versuch WHV 1 40 Grad**
4,14	4,03	3,985	**Versuch WHV 2 KS**
4,14	4,15	3,93	**Versuch WHV 2 RT**
4,14	3,98	3,925	**Versuch WHV 2 40 Grad**

11.10 Rohdaten: Farbe und Klarheit

Tabelle 11-6: Farbe und Klarheit bei Lagerung im Kühlraum, bei Raumtemperatur und bei 40°C zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung, nach einem und nach 6 Monaten

Direkt nach Herstellung	Nach 1 Monat	Nach 6 Monaten	Bezeichnung der Versuche
gelb, aber i.O.	i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch 1 KS**
	gelb, aber i.O.	i.O.	**Versuch 1 RT**
	i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch 1 40 Grad**
gelb, aber i.O.	gelb, aber i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch a KS**
	gelb, aber i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch a RT**
	gelb, aber i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch a 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch b KS**
	gelb, aber i.O.	n.i.O.	**Versuch b RT**
	gelb, aber i.O.	n.i.O.	**Versuch b 40 Grad**
gelb, aber i.O.	gelb, aber i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch ab KS**
	gelb, aber i.O.	n.i.O.	**Versuch ab RT**
	gelb, aber i.O.	n.i.O.	**Versuch ab 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch c KS**
	i.O.	i.O.	**Versuch c RT**
	i.O.	i.O.	**Versuch c 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch ac KS**
	i.O.	i.O.	**Versuch ac RT**
	i.O.	i.O.	**Versuch ac 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch bc KS**
	i.O.	i.O.	**Versuch bc RT**
	i.O.	n.i.O.	**Versuch bc 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch abc KS**
	i.O.	i.O.	**Versuch abc RT**
	i.O.	n.i.O.	**Versuch abc 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch WHV 1 KS**
	i.O.	i.O.	**Versuch WHV 1 RT**
	i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch WHV 1 40 Grad**
i.O.	i.O.	i.O.	**Versuch WHV 2 KS**
	i.O.	gelb, aber i.O.	**Versuch WHV 2 RT**
	i.O.	n.i.O.	**Versuch WHV 2 40 Grad**

11.11 Rohdaten: Osmolalität

Tabelle 11-7: Osmolalität der Versuche aus dem Faktoren Design zu den Zeitpunkten direkt nach Herstellung und nach 6 Monaten Lagerung bei 2-8ºC, 15-25ºC und bei 40ºC

direkt nach Herstellung	nach 6 Monaten	Osmolalität
283,5	281	**Versuch 1 KS**
	281,5	**Versuch 1 RT**
	284	**Versuch 1 40 Grad**
283,5	281,5	**Versuch a KS**
	282	**Versuch a RT**
	282,5	**Versuch a 40 Grad**
286	280	**Versuch b KS**
	281	**Versuch b RT**
	285	**Versuch b 40 Grad**
285,5	282	**Versuch ab KS**
	284,5	**Versuch ab RT**
	287	**Versuch ab 40 Grad**
289	288	**Versuch c KS**
	290	**Versuch c RT**
	292	**Versuch c 40 Grad**
292,5	287	**Versuch ac KS**
	291,5	**Versuch ac RT**
	293	**Versuch ac 40 Grad**
293,5	289	**Versuch bc KS**
	288	**Versuch bc RT**
	292	**Versuch bc 40 Grad**
294	294	**Versuch abc KS**
	288	**Versuch abc RT**
	292,5	**Versuch abc 40 Grad**
285	283,5	**Versuch WHV 1 KS**
	283,5	**Versuch WHV 1 RT**
	287,5	**Versuch WHV 1 40 Grad**
299	285	**Versuch WHV 2 KS**
	297	**Versuch WHV 2 RT**
	299	**Versuch WHV 2 40 Grad**

12 Excel Tabellen

Tabelle 12-1: Resultate Faktoren Design Adrenalin direkt nach Herstellung

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute Adrenalin %
1	-	-	-	+	+	+		100,15
a	+	-	-	-	-	+	+	94,45
b	-	+	-	-	+	-	+	98,81
ab	+	+	-	+	-	-	-	93,79
c	-	-	+	+	-	-	+	98,90
ac	+	-	+	-	+	-	-	94,98
bc	-	+	+	-	-	+	-	96,74
abc	+	+	+	+	+	+	+	94,28
4-facher Effekt	-17,1	-4,86	-2,3	2,14	4,34	-0,86	0,78	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								98,35
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								92,75
1-facher Effekt	-4,275	-1,215	-0,575	0,535	1,085	-0,215	0,195	
Quadratsumme	18,28	1,48	0,33	0,29	1,18	0,05	0,04	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	480,62	38,82	8,69	7,53	30,96	1,22	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**ja**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1 Differenz WHV 2	1,8 1,53	3,24 2,3409	1,62 1,17045	1,395225				
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	13,10	1,06	0,24	0,21	0,84	0,03	0,03	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-2: Resultate Faktoren Design PPC direkt nach Herstellung

	Faktoren			**Wechselwirkungen**				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute PPC %
1	-	-	-	+	+	+	-	99,66
a	+	-	-	-	-	+	+	97,82
b	-	+	-	-	+	-	+	99,47
ab	+	+	-	+	-	-	-	97,99
c	-	-	+	+	-	-	+	98,48
ac	+	-	+	-	+	-	-	97,03
bc	-	+	+	-	-	+	-	99,45
abc	+	+	+	+	+	+	+	99,76
4-facher Effekt	-4,46	3,68	-0,22	2,12	2,18	3,72	1,4	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								101,72
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								94,57
1-facher Effekt	-1,12	0,92	-0,05	0,53	0,55	0,93	0,35	
Quadratsumme	1,24	0,85	0,00	0,28	0,30	0,86	0,12	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	10,15	6,91	0,02	2,29	2,42	7,06	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	-2,06	4,2436	2,1218	7,794925				
Differenz WHV 2	5,19	26,9361	13,46805					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,16	0,11	0,00	0,04	0,04	0,11	0,02	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-3: Resultate Faktoren Design TTC direkt nach Herstellung

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute TTC %
1	-	-	-	+	+	+	-	99,84
a	+	-	-	-	-	+	+	98,91
b	-	+	-	-	+	-	+	99,57
ab	+	+	-	+	-	-	-	97,91
c	-	-	+	+	-	-	+	98,55
ac	+	-	+	-	+	-	-	98,41
bc	-	+	+	-	-	+	-	99,46
abc	+	+	+	+	+	+	+	99,70
4-facher Effekt	-2,49	0,93	-0,11	-0,35	2,69	3,47	1,11	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								101,60
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								96,58
1-facher Effekt	-0,62	0,2325	-0,03	-0,09	0,6725	0,87	0,2775	
Quadratsumme	0,39	0,05	0,00	0,01	0,45	0,75	0,08	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	5,03	0,70	0,01	0,10	5,87	9,77	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	-1,76	3,0976	1,5488	3,208				
Differenz WHV 2	3,12	9,7344	4,8672					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,12	0,02	0,00	0,00	0,14	0,23	0,02	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-4: Resultate Faktoren Design Adrenalin 6 Monate Kühlraum

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute Adrenalin %
1	-	-	-	+	+	+	-	98,74
a	+	-	-	-	-	+	+	95,06
b	-	+	-	-	+	-	+	98,05
ab	+	+	-	+	-	-	-	91,78
c	-	-	+	+	-	-	+	99,67
ac	+	-	+	-	+	-	-	95,43
bc	-	+	+	-	-	+	-	97,73
abc	+	+	+	+	+	+	+	91,85
4-facher Effekt	-20,07	-9,49	1,05	-4,23	-0,17	-1,55	0,95	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								99,08
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								90,21
1-facher Effekt	-5,02	-2,37	0,26	-1,06	-0,04	-0,39	0,24	
Quadratsumme	25,18	5,62	0,07	1,12	0,0016	0,15	0,06	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	419,67	93,67	1,12	18,73	0,03	2,54	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**ja**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	-0,34	0,1156	0,0578	0,7013				
Differenz WHV 2	1,64	2,6896	1,3448					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	35,90	8,01	0,10	1,59	0,002	0,22	0,09	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**ja**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-5: Resultate Faktoren Design PPC 6 Monate Kühlraum

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute PPC %
1	-	-	-	+	+	+	-	99,27
a	+	-	-	-	-	+	+	96,24
b	-	+	-	-	+	-	+	97,45
ab	+	+	-	+	-	-	-	92,28
c	-	-	+	+	-	-	+	100,04
ac	+	-	+	-	+	-	-	97,38
bc	-	+	+	-	-	+	-	99,16
abc	+	+	+	+	+	+	+	96,01
4-facher Effekt	-14,01	-8,03	7,35	-2,63	2,39	3,53	1,65	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								99,07
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								96,86
1-facher Effekt	-3,50	-2,01	1,84	-0,66	0,60	0,88	0,41	
Quadratsumme	12,27	4,03	3,38	0,43	0,36	0,78	0,17	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	72,10	23,68	19,84	2,54	2,10	4,58	1	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	0,2	0,04	0,02	0,190625				
Differenz WHV 2	-0,85	0,7225	0,36125					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	64,35	21,14	17,71	2,27	1,87	4,09	1,12	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**ja**	**ja**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-6: Resultate Faktoren Design TTC 6 Monate Kühlraum

	Faktoren			**Wechselwirkungen**				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute TTC %
1	-	-	-	+	+	+	-	99,55
a	+	-	-	-	-	+	+	98,01
b	-	+	-	-	+	-	+	99,11
ab	+	+	-	+	-	-	-	97,16
c	-	-	+	+	-	-	+	100,24
ac	+	-	+	-	+	-	-	99,30
bc	-	+	+	-	-	+	-	99,30
abc	+	+	+	+	+	+	+	98,39
4-facher Effekt	-5,34	-3,14	3,4	-0,38	1,64	-0,56	0,44	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								99,39
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								98,75
1-facher Effekt	-1,34	-0,78	0,85	-0,10	0,41	-0,14	0,11	
Quadratsumme	1,78	0,62	0,72	0,01	0,17	0,02	0,01	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	147,29	50,93	59,71	0,75	13,89	1,62	1	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	0,16	0,0256	0,0128	0,0388				
Differenz WHV 2	-0,36	0,1296	0,0648					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	45,93	15,88	18,62	0,23	4,33	0,51	0,31	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**ja**	**nein**	**ja**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-7: Resultate Faktoren Design Adrenalin 6 Monate Raumtemperatur

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute Adrenalin %
1	-	-	-	+	+	+	-	101,43
a	+	-	-	-	-	+	+	94,98
b	-	+	-	-	+	-	+	94,24
ab	+	+	-	+	-	-	-	93,40
c	-	-	+	+	-	-	+	101,12
ac	+	-	+	-	+	-	-	95,26
bc	-	+	+	-	-	+	-	98,64
abc	+	+	+	+	+	+	+	99,26
4-facher Effekt	-12,53	-7,25	10,23	12,09	2,05	10,29	0,87	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								98,99
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								88,74
1-facher Effekt	-3,13	-1,81	2,56	3,02	0,51	2,57	0,22	
Quadratsumme	9,81	3,29	6,54	9,14	0,26	6,62	0,05	
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	207,43	69,44	138,27	193,11	5,55	139,89	1	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**ja**	**nein**	**nein**	**ja**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
WHV 1	2,44	5,9536	2,9768	29,156				
WHV 2	10,52	110,6704	55,3352					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,34	0,11	0,22	0,31	0,01	0,23	0,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-8: Resultate Faktoren Design PPC 6 Monate Raumtemperatur

	Faktoren			**Wechselwirkungen**				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute PPC %
1	-	-	-	+	+	+	-	97,04
a	+	-	-	-	-	+	+	96,20
b	-	+	-	-	+	-	+	88,91
ab	+	+	-	+	-	-	-	88,25
c	-	-	+	+	-	-	+	97,70
ac	+	-	+	-	+	-	-	96,34
bc	-	+	+	-	-	+	-	99,10
abc	+	+	+	+	+	+	+	98,72
4-facher Effekt	-3,24	-12,30	21,46	1,16	-0,24	19,86	0,80	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								98,14
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								96,17
1-facher Effekt	-0,81	-3,08	5,37	0,29	-0,06	4,97	0,2	
Quadratsumme	0,66	9,46	28,78	0,08	0,0036	24,65	0,0400	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	16,40	236,39	719,58	2,10	0,09	616,28	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**ja**	**ja**	**nein**	**nein**	**ja**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	-1,1	1,21	0,605	1,928125				
Differenz WHV 2	2,55	6,5025	3,25125					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,34	4,90	14,93	0,04	0,00	12,79	0,02	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-9: Resultate Faktoren Design TTC 6 Monate Raumtemperatur

	Faktoren			**Wechselwirkungen**				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute TTC %
1	-	-	-	+	+	+	-	98,82
a	+	-	-	-	-	+	+	99,00
b	-	+	-	-	+	-	+	97,41
ab	+	+	-	+	-	-	-	96,10
c	-	-	+	+	-	-	+	98,70
ac	+	-	+	-	+	-	-	98,81
bc	-	+	+	-	-	+	-	99,78
abc	+	+	+	+	+	+	+	99,66
4-facher Effekt	-1,14	-2,38	5,62	-1,72	1,12	6,24	1,26	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								99,97
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								98,38
1-facher Effekt	-0,29	-0,59	1,40	-0,43	0,28	1,56	0,32	
Quadratsumme	0,08	0,35	1,97	0,18	0,08	2,43	0,10	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$		
	0,82	3,57	19,89	1,86	0,79	24,53	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	-1,15	1,3225	0,66125	0,740225				
Differenz WHV 2	1,28	1,6384	0,8192					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,11	0,48	2,67	0,25	0,11	3,29	0,13	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-10: Resultate Faktoren Design Adrenalin 6 Monate 40ºC

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute Adrenalin %
1	-	-	-	+	+	+	-	85,23
a	+	-	-	-	-	+	+	83,39
b	-	+	-	-	+	-	+	78,23
ab	+	+	-	+	-	-	-	74,61
c	-	-	+	+	-	-	+	87,88
ac	+	-	+	-	+	-	-	86,40
bc	-	+	+	-	-	+	-	87,72
abc	+	+	+	+	+	+	+	81,58
4-facher Effekt	-13,08	-20,76	22,12	-6,44	-2,16	10,8	-2,88	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								94,16
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								91,65
1-facher Effekt	-3,27	-5,19	5,53	-1,61	-0,54	2,7	-0,72	
Quadratsumme	10,69	26,94	30,58	2,59	0,29	7,29	0,52	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$	$(ABC)^2/(ABC)^2$	
	20,63	51,96	58,99	5,00	0,56	14,06	1,00	
nein	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**		
Differenz WHV 1 Differenz WHV 2	-8,93 -10,07	79,7449 101,4049	39,87245 50,70245	45,28745				
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,24	0,59	0,68	0,06	0,01	0,16	0,01	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-11: Resultate Faktoren Design PPC 6 Monate 40ºC

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute PPC %
1	-	-	-	+	+	+	-	87,68
a	+	-	-	-	-	+	+	85,92
b	-	+	-	-	+	-	+	77,18
ab	+	+	-	+	-	-	-	76,31
c	-	-	+	+	-	-	+	87,69
ac	+	-	+	-	+	-	-	84,82
bc	-	+	+	-	-	+	-	88,74
abc	+	+	+	+	+	+	+	87,97
4-facher Effekt	-6,27	-15,91	22,13	2,99	-1,01	24,31	1,21	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								86,53
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								82,58
1-facher Effekt	-1,5675	-3,9775	5,5325	0,7475	-0,2525	6,0775	0,3025	
Quadratsumme	2,46	15,82	30,61	0,56	0,06	36,94	0,09	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$	$(ABC)^2/(ABC)^2$	
	26,85	172,89	334,50	6,11	0,70	403,64	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**ja**	**ja**	**nein**	**nein**	**ja**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	1,15	1,3225	0,66125	7,59365				
Differenz WHV 2	5,39	29,0521	14,52605					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,32	2,08	4,03	0,07	0,01	4,86	0,01	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	

Tabelle 12-12: Resultate Faktoren Design TTC 6 Monate 40ºC

	Faktoren			Wechselwirkungen				
Bezeichnung der Versuche	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Ausbeute TTC %
1	-	-	-	+	+	+	-	95,55
a	+	-	-	-	-	+	+	94,15
b	-	+	-	-	+	-	+	91,29
ab	+	+	-	+	-	-	-	90,05
c	-	-	+	+	-	-	+	94,89
ac	+	-	+	-	+	-	-	93,10
bc	-	+	+	-	-	+	-	96,03
abc	+	+	+	+	+	+	+	95,38
4-facher Effekt	-5,08	-4,94	8,36	1,3	0,2	11,78	0,98	
Wiederholversuch 1 (Versuch1)								94,42
Wiederholversuch 2 (Versuch abc)								90,72
1-facher Effekt	-1,27	-1,235	2,09	0,325	0,05	2,945	0,245	
Quadratsumme	1,61	1,53	4,37	0,11	0,0025	8,67	0,06	
F-Test mit ABC								
Prüfgrösse F_b	$A^2/(ABC)^2$	$B^2/(ABC)^2$	$C^2/(ABC)^2$	$(AB)^2/(ABC)^2$	$(AC)^2/(ABC)^2$	$(BC)^2/(ABC)^2$	$(ABC)^2/(ABC)^2$	
	26,87	25,41	72,77	1,76	0,04	144,49	1,00	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	
F-Test mit WHV								
Differenz WHV 1	1,13	1,2769	0,63845	5,748125				
Differenz WHV 2	4,66	21,7156	10,8578					
Prüfgrösse F_b	$A^2/(WHV)^2$	$B^2/(WHV)^2$	$C^2/(WHV)^2$	$(AB)^2/(WHV)^2$	$(AC)^2/(WHV)^2$	$(BC)^2/(WHV)^2$	$(ABC)^2/(WHV)^2$	
	0,28	0,27	0,76	0,02	0,00	1,51	0,01	
Signifikanz (Ja wenn $F_b > F_{Tab}$)	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	**nein**	