



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Mikrobielle Stabilität unkonservierter Augentropfen mit
Atropinsulfat: Einfluss von Herstellungsbedingungen,
Packmittel und Lagerungstemperatur

verfasst von | submitted by
Johanna Grabner BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Lea Ann Dailey

Mitbetreut von | Co-Supervisor:

Mag. Dr. Victoria Klang Privatdoz.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich während des Erstellens dieser Masterarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderer Dank gilt Mag. Dr. Victoria Klang, die meine Masterarbeit betreut und begutachtet hat. Für die nette Zusammenarbeit, die hilfreichen Anregungen, das Vertrauen in mich und für die besonderen Möglichkeiten möchte ich mich herzlich bedanken.

Weiters gebührt mein Dank Univ.-Prof. Dr. Lea Ann Dailey, Dr. Richard Harvey und Mag. My Vanessa Nguyen Hoang, die mir beim praktischen Arbeiten immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Stefan Brenner und dem Team des chemisch-pharmazeutischen Laboratoriums der Apothekerkammer Wien für die nette Zusammenarbeit und bei der Firma Elpack (Lieboch, AUT), die freundlicherweise die Novelia-Dispenser zur Verfügung gestellt hat, herzlich bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich immer unterstützt hat, und bei meinen Freunden, die mir immer aufmunternd zur Seite gestanden sind.

Abstract

Die magistrale Herstellung von Atropinsulfat-Augentropfen gewinnt zunehmend an Relevanz im Apothekenalltag und ist mittlerweile unverzichtbar geworden, da die Behandlung von pädiatrischer Myopieprogression immer bedeutender wird. Die bei einem langfristigen Therapiekonzept notwendige Konservierung von Ophthalmica ist jedoch häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen wie Irritation und Allergisierung verbunden. Aus diesem Grund wird versucht, auf Konservierungsmittel zu verzichten. Neben der Verwendung von Einzeldosenbehältnissen stellen moderne kontaminationsfreie Mehrdosenbehältnisse mit speziellen Tropf-, Filter- oder Pumpsystemen einen möglichen Lösungsansatz dar. In dieser Arbeit wurde die mikrobielle und chemische Stabilität von unkonservierten Atropinsulfat-Augentropfen (0,01% m/m) nach Anbruch bei täglicher Anwendung untersucht. Dabei wurde der Einfluss von Herstellungsbedingungen, Packmittel und Lagerungstemperatur in Betracht gezogen. Die Ergebnisse zeigten, dass die magistral hergestellten Atropinsulfat-Augentropfen ohne Zusatz von Konservierungsmitteln in sterilen kontaminationsfreien Packmitteln (Novelia®) mikrobielle Stabilität nach Ph.Eur. sowie einen zufriedenstellenden Wirkstoffgehalt über 12 Wochen regelmäßiger Anwendung bei Raumtemperatur (23 °C, 99% Wirkstoffgehalt) und insbesondere bei gekühlter Lagerung (4 °C, 100% Wirkstoffgehalt) aufweisen. Die erhobenen Daten belegen die Sicherheit und Wirksamkeit dieses häufig in der Pädiatrie eingesetzten magistral hergestellten Arzneimittels.

Abstract

The compounding preparation of atropine sulfate eye drops is becoming increasingly relevant in everyday pharmacy practice and has become indispensable for the treatment of pediatric myopia progression. However, the preservation of ophthalmic products, which is necessary in a long-term therapy concept using multi-dose dispensers, is often associated with undesirable effects such as irritation or sensitization. For this reason, attempts are being made to avoid the use of preservatives. In addition to the use of single-dose containers, modern contamination-free multi-dose containers with special drip, filter or pump systems represent a possible solution. In this study, the microbial and chemical stability of unpreserved 0.01% w/w atropine sulfate eye drops was investigated after opening during daily application. The influence of manufacturing conditions, packaging material and storage temperature was taken into consideration. Results showed that preservative-free compounded atropine sulfate eye drops 0.01% w/w in sterile contamination-free packaging (Novelia®) exhibit microbial stability according to Ph.Eur. and satisfying drug content over 12 weeks of regular use for both storage at room temperature (23 °C, 99% drug content) and refrigerated storage (4 °C, 100% drug content). Thus, the presented data confirm the safety and efficacy of this compounded preparation that is frequently used in pediatrics.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Allgemeines.....	1
2.1.	Das Auge als Applikationsort für Arzneistoffe	1
2.2.	Ophthalmologische Arzneiformen	3
2.2.1.	Methoden zur Herstellung steriler Augenzubereitungen nach dem Ph. Eur.....	4
2.2.2.	Verwendete Hilfsstoffe	4
2.2.3.	Verwendete Packmittel	6
2.2.4.	Besonderheiten der magistralen Herstellung von Augentropfen	7
2.2.5.	Hygienerichtlinien	8
2.3.	Atropinsulfat als Wirkstoff in Ophthalmica	8
2.3.1.	Wirkung und Anwendung	9
2.3.2.	Unerwünschte Wirkungen	9
2.4.	Myopie.....	10
2.5.	Mikrobiologische Integritätstests	11
2.5.1.	Mikroflora des Auges	12
3.	Materialien und Methoden	13
3.1.	Verwendete Materialien.....	14
3.2.	Studiendesign.....	14
3.3.	Magistrale Herstellung.....	16
3.4.	Tägliche Anwendungssimulation	17
3.4.1.	Tropfengröße	18
3.5.	Mikrobiologische Analytik	19
3.5.1.	Plattengussverfahren	19
3.5.2.	Direktbeschickung.....	20
3.6.	Chemische Analytik.....	21
3.7.	Kontaminationsstudie TSIT2	22
4.	Ergebnisse	23
4.1.	Ergebnisse des TSIT	29
4.2.	Ergebnisse der chemischen Analytik.....	29
4.2.1.	Aseptisch hergestellte Proben.....	30
4.2.2.	Nicht aseptisch hergestellte Proben (Positivkontrolle)	31
5.	Diskussion	33
6.	Conclusio.....	35

7.	Abbildungsverzeichnis.....	37
8.	Tabellenverzeichnis.....	39
9.	Literaturverzeichnis	39

1. Einleitung und Zielsetzung

Myopie, auch Kurzsichtigkeit genannt, ist eine Fehlsichtigkeit, die bei Betroffenen zu verschwommenem Sehen in der Ferne führt. Die Prävalenz hierfür nimmt stetig zu und im Jahre 2050 könnten bis zu 50% der Weltbevölkerung einen gewissen Grad der Myopie aufweisen. Starke Fälle gehen dabei mit dem Risiko einer irreversiblen Beeinträchtigung des Sehvermögens und Erblindung aufgrund pathologischer Veränderungen der Netzhaut, Aderhaut und Sklera einher (1).

Muskarinische Rezeptorantagonisten wie Atropin und seine Derivate gelten aktuell als effektivste pharmakologische Behandlungsmethode, um das Längenwachstum des Augapfels und somit die Progression der Myopie bei Kindern einzudämmen (2). Es wird vermutet, dass die biologische Wirkung von Atropin ein komplexes Zusammenspiel mit Rezeptoren in verschiedenen Augengeweben auf mehreren Ebenen ist, was zu einer Verringerung des axialen Längenwachstums des Augapfels führt (3).

In dieser Anwendung wird Atropinsulfat niedrigdosiert (0,01% m/m) in wässrigen Augentropfen längerfristig appliziert. Die dabei notwendige Konservierung von Augentropfen ist oft mit unerwünschten lokalen Effekten oder Allergisierung verbunden. Aus diesem Grund wird versucht, auf Konservierungsmittel zu verzichten, ohne die Arzneimittelsicherheit zu gefährden.

Aufgrund der Neuheit dieses Therapiekonzepts ist die Datenlage zur mikrobiellen und chemischen Stabilität von Atropinsulfat in magistral hergestellten Augentropfen zur Daueranwendung begrenzt, insbesondere die Laufzeit nach Anbruch bei täglicher Verwendung („Aufbrauchfrist“) wurde noch nicht exakt bestimmt. Diese kann sich maßgeblich von der Lagerstabilität ungeöffneter Produkte unterscheiden und spielt deswegen eine bedeutende Rolle im Apothekenalltag. Da es sich um eine Langzeitbehandlung handelt, ist eine längere Haltbarkeitsdauer erforderlich, um die Patientenversorgung zu verbessern (4).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Erhebung der chemischen und mikrobiellen Anbruchstabilität von unkonservierten magistral hergestellten 0,01%igen Atropinsulfat-Augentropfen unter Verwendung verschiedener Packmittel und Lagertemperaturen. Die erhobenen Daten sollten als Richtwert zur Festlegung der Aufbrauchfrist dienen.

2. Allgemeines

2.1. Das Auge als Applikationsort für Arzneistoffe

Neben der notwendigen sachgemäßen Anwendung von ophthalmologischen Zubereitungen spielt insbesondere die Anatomie des Auges eine wichtige Rolle bei der Wirkung und systemischen Verfügbarkeit von Arzneistoffen in Ophthalmica.

Die Herausforderung in der Applikation von Wirkstoffen am Auge liegt im geringen Aufnahmevermögen für applizierte flüssige Arzneiformen und in der hohen Abflussrate. Der vordere Augenabschnitt kann nämlich nur ein geringes Volumen aufnehmen, welches außerdem nur kurz auf Horn- und Bindehaut verweilt. Bei der Anwendung wird vermehrt Tränenfilm produziert und dessen Zusammensetzung geändert, sodass oftmals weniger als zehn Prozent des Arzneistoffs an den Wirkort gelangen.

In der knöchernen Augenhöhle liegt der kugelförmige Augapfel gut geschützt mit seinen Augenlidern, wie in Abbildung 1 (7) zu sehen ist. An der Innenseite dieser Lider befindet sich die Binde- und Hornhaut, zwischen ihnen der Bindehautsack. Für Form und Festigkeit des Augapfels ist die weiße Lederhaut (Sclera) zuständig. Unter ihr erstrecken sich Ader- und Netzhaut. Hinter der Hornhaut sind Regenbogenhaut (Iris) mit Pupille und die Linse zu finden. Der Bereich zwischen Hornhaut und Iris wird vordere Augenkammer genannt und ist mit Flüssigkeit gefüllt.

Das Kammerwasser wird vom Ziliarepithel produziert und fließt stetig von der Hinterkammer über Linse, Iris und Pupille in die Vorderkammer und hinaus über den Kammerwinkel. Es ist verantwortlich für den Aufbau des Augeninnendrucks, der höher ist als der Druck in der Umgebung und verantwortlich für die Form des Augapfels.

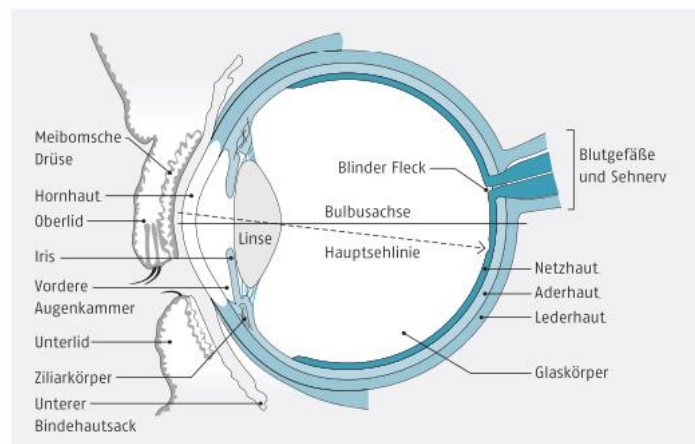


Abb. 1.1 Senkrechter schematischer Schnitt durch den Augapfel und seine Anhangsgebilde

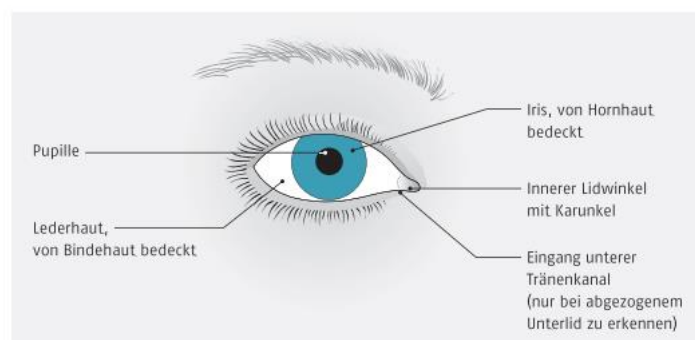


Abb. 1.2 Frontalansicht des Auges

ABBILDUNG 1: Anatomie eines Auges; abgedruckt mit Genehmigung vom Deutschen Apotheker Verlag nach Kircher et al. (7)

Aufgrund der geringen Permeabilität der Hornhaut und des schnellen Abtransports ist die okulare Verfügbarkeit von Wirkstoffen gering. Durch bestimmte Hilfsstoffe und technologische Methoden zur Herstellung von Ophthalmica ist es möglich, die Bioverfügbarkeit zu verändern. Der Anteil an lipophilen Stoffen spielt beispielsweise eine große Rolle, da jene die Aufnahme durch die Hornhaut erleichtern (5-7).

2.2. Ophthalmologische Arzneiformen

Im Europäischen Arzneibuch werden fünf Arten von ophthalmologischen Arzneiformen unterschieden: Augentropfen, Augenbäder, Pulver für Augentropfen und Augenbäder, halbfeste Zubereitungen und Augeninserte. Augentropfen können wässrige oder ölige Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen sein und werden mit einem Tropfeinsatz direkt in das Auge getropft.

Zum Spülen des Auges oder zum Tränken von Augenkompresse werden Augenbäder oder Augenspüllösungen verwendet. Hierbei dienen bestimmte wannenähnliche Vorrichtungen als Anwendungshilfe. Pulver für Augentropfen oder Augenbäder werden bei Bedarf gelöst oder suspendiert.

Zu den halbfesten Zubereitungen gehören sterile Augencremes, -salben und -gele. Die Wirkstoffe sind in einer Grundlage gelöst oder dispergiert und als Fertigprodukte sind sie meist in Tuben abgepackt. Augensalben verlieren jedoch zunehmend an Bedeutung, da sie das Sehvermögen beeinträchtigen und die Compliance gering ist. Daher werden halbfeste Produkte zur Anwendung am Auge häufig abends bzw. nachts als Ergänzung zur täglichen Therapie mit wässrigen Augentropfen bei akuten Anwendungen eingesetzt. Des Weiteren gibt es Augeninserte, die in den Bindehautsack eingelegt werden und den in eine Membran eingebetteten Wirkstoff über einen bestimmten Zeitraum abgeben. Hierbei kommt es jedoch häufig zu Problemen in der Anwendung, die die Nutzbarkeit dieser Arzneiformen in der Praxis einschränken.

Die meisten Augenerkrankungen werden lokal behandelt, jedoch können auch systemische Arzneiformen verabreicht werden. Die Wirkstoffkonzentration am Zielort ist aufgrund der geringen Permeation jedoch meist zu gering. Oftmals handelt es sich bei der Indikation nur um eine lokale Reizung. Bei Trockenheit des Auges können beispielsweise Lidsprays zur Verstärkung der Lipidschicht des Tränenfilms angewendet werden (5-6, 8).

Zu den verbesserten Applikationsarten gehören wässrige Gele. Hydrogele werden drei bis fünf Mal besser resorbiert als wässrige Tropfen und weisen weniger unerwünschte Wirkungen auf. Als Gelbildner werden Carbopol, Cellulosederivate, Hyaluronsäure und Polyvinylalkohol verwendet. Die mukoadhäsive Hyaluronsäure kann Ionenbindungen mit der Muzinschicht der Tränenflüssigkeit eingehen und mit kationischen Wirkstoffen Polymersalze bilden, was die Bioverfügbarkeit erhöht. Somit ist lediglich eine einmalige Anwendung pro Tag erforderlich. Hydrogele enthalten nicht immer einen Wirkstoff und werden auch zur Befeuchtung der Augenoberfläche verwendet.

In situ gebildete Systeme ändern ihre Konsistenz direkt am Auge von flüssig zu gelartig. Dies kann durch Temperatur- oder pH-Änderung oder Ionenaktivierung erfolgen. Poloxamere sind bei Raumtemperatur flüssig und werden beim Kontakt mit dem Auge durch die erhöhte Temperatur gelartig. Celluloseacetatphthalat erreicht durch Neutralisation bei Kontakt mit dem Tränenfilm seine gelartige Konsistenz und Gellangummi geliert in Anwesenheit von Kationen.

Kolloidale Darreichungsformen wie Nanopartikel, Liposomen und Mikroemulsionen werden entwickelt, um eine mögliche Sichtbehinderung beim Auftragen von viskosen Systemen zu verringern. Durch Liposomen ist es möglich, ein kompartimentspezifisches Targeting am Auge zu erreichen. Des Weiteren ist durch die lipo- und hydrophilen Komponenten in Mikroemulsionen eine bessere Permeabilität durch die Hornhaut möglich. Durch den hohen Tensidgehalt ist allerdings ein Reizpotenzial gegeben.

Im Zuge einer HIV-Therapie werden Augenimplantate mit dem Wirkstoff Ganciclovir gegen Zytomegalieretinitis verwendet, um regelmäßige intravitreale Injektionen zu umgehen. Darüber hinaus können Wirkstoffe durch Iontophorese mittels elektrischen Stroms in das Auge gebracht werden. Dies ist beispielsweise mit iodhaltigen Augengewässern möglich (6).

2.2.1. Methoden zur Herstellung steriler Augenzubereitungen nach dem Ph. Eur.

Augenzubereitungen müssen steril sein und infolgedessen aseptisch hergestellt werden. In der Apotheke wird dafür die Entkeimungsfiltration und eine Laminar Air Flow-Arbeitsbank verwendet. Diese Methode ist für wässrige Augentropfen, insbesondere solche mit thermolabilen Inhaltsstoffen, gut geeignet.

Ein anderes Sterilisationsverfahren für wässrige Zubereitungen ist beispielsweise die Dampfsterilisation mit gesättigtem Wasserdampf (Autoklav). Diese kann allerdings nicht für thermolabile Wirkstoffe verwendet werden.

Ölige Augentropfen können auch mittels Filtration entkeimt werden, jedoch ist hierfür ein ölresistenter Filtrationsvorsatz und ein hydrophober Membranfilter notwendig. Des Weiteren ist eine Sterilisation durch trockene Hitze (Trockenschrank) bei 160 °C beziehungsweise 180 °C möglich. Hydrophobe Augensalben werden ebenfalls im Trockenschrank sterilisiert, wohingegen hydrophile Augengele im Autoklav erhitzt werden (6).

2.2.2. Verwendete Hilfsstoffe

Zu den Grundanforderungen an Augenarzneimittel gehören Wirksamkeit, Verträglichkeit, Sterilität und Stabilität. Um diese zu erfüllen, ist es möglich, diverse Hilfsstoffe zu verwenden. Allerdings ist es wichtig, eine genaue Abwägung zwischen Nutzen und Risiken durchzuführen und jene Hilfsstoffe in geringstmöglichen Mengen zu verwenden (6).

Bei der Verwendung von Mehrdosenbehältnissen werden oft Konservierungsmittel eingesetzt, um die Augenarzneien vor mikrobieller Kontamination zu schützen. Bei jeder Anwendung der Patientin/des Patienten werden die Augentropfen durch das Öffnen erneut Keimen ausgesetzt. Eine unhygienische Handhabung (wie beispielsweise das Berühren der Spitze der Tropfflasche mit dem Auge) sorgt für ein zusätzliches Risiko der Verunreinigung.

Wenn der enthaltende Wirkstoff selbst antibiotische oder antimikrobielle Eigenschaften besitzt oder wenn Einzeldosisbehältnisse verwendet werden, kann auf ein Konservierungsmittel verzichtet werden. Ebenso bei öligen Augentropfen, da sich Bakterien in diesem Milieu nicht vermehren können. Nach einer Operation oder Verletzung am Auge darf das Augenarzneimittel nicht konserviert werden. Ebenso zu beachten sind sämtliche Allergien und Unverträglichkeiten gegenüber konservierenden Substanzen.

Bei der Auswahl eines geeigneten Konservierungsmittels muss daher einiges beachtet werden. Zu den erforderlichen Eigenschaften gehören Reizarmut beziehungsweise Reizfreiheit; das Konservierungsmittel darf keine Allergien auslösen. Außerdem sollte es ökologisch unbedenklich, rasch wirksam, kompatibel mit anderen Inhaltsstoffen, in einem großen pH-Bereich wirksam und ausreichend chemisch und thermisch stabil sein. Da es sich um viele Vor- und Nachteile handelt, bedarf es einer genauen Abwägung der Nutzen und Risiken (6, 9-10).

Konservierungsmittel wirken aus unterschiedlichen Gründen konservierend. Benzalkoniumverbindungen stören beispielsweise die Permeabilität der bakteriellen Zellmembran, während Alkohole die Lipidstrukturen jener Membranen verändern. Sie werden unterteilt in kationische und anionische Konservierungsmittel und sind mit gleichgeladenen Substanzen kompatibel. Jedoch sind einige Inkompatibilitäten zu beachten (6).

Das am häufigsten verwendete Konservierungsmittel in ophthalmologischen Formulierungen ist Benzalkoniumchlorid (BAK). Die Konzentration spielt eine wichtige Rolle für die antimikrobielle Wirkung und darf vorgegebene Grenzwerte nicht überschreiten, ist aber auch maßgeblich an der Art und Stärke der unerwünschten Wirkungen beteiligt (11).

Benzalkoniumchlorid wirkt potenziell reizend, allergisierend, epithelschädigend und kann die Wundheilung verzögern (6). Konservanzien in Ophthalmika haben allerdings nicht nur einen sterilisierenden Effekt auf die Wirkstofflösung, sondern können auch zur Stabilität, verbesserten Löslichkeit und zur erhöhten Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes am Zielort beitragen. Durch Benzalkoniumchlorid wird beispielsweise die korneale Permeation verstärkt und das Eindringen des Arzneistoffs in das Auge erleichtert (12).

Um die Stabilität von Arzneizubereitungen zu verbessern und einem oxidativen Zerfall vorzubeugen, können Antioxidantien verwendet werden. Beispiele hierfür sind

Ascorbinsäure oder Natriumhydrogensulfit für hydrophile Systeme, für lipophile Arzneimittel Ascorbinsäureester und Tocopherole.

Metallkomplexbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure binden Metallionen und wirken so synergistisch, indem sie deren oxidationskatalytische Wirkung inhibieren.

In manchen Fällen ist es notwendig, die Viskosität der flüssigen Augenarzneimittel zu erhöhen, um die Kontaktzeit mit der Hornhaut zu verlängern und somit die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs am Auge zu vergrößern. Hier verwendet man unter anderem Polymere wie Hydroxypropylcellulose, Methylcellulose und Hydroxypropylmethylcellulose (6).

2.2.3. Verwendete Packmittel

Grundsätzlich wird zwischen Ein- und Mehrdosenbehältnissen unterschieden. Ophthalmologische Einzeldosenbehältnisse sind meist ampullen- oder pipettenförmig und zum einmaligen Gebrauch gedacht. Mehrdosenbehältnisse können beispielsweise aus Glas oder Kunststoff bestehen. Braunglasfläschchen sind mit einem Gummitropfer versehen, den man leicht zusammendrücken muss, um einen Tropfen freizusetzen. Kunststofffläschchen aus Polyethylen oder Polypropylen mit Tropfeinsatz werden durch leichtes Quetschen der Flasche betätigt. Bei solchen ohne Tropfeinsatz muss zuvor die Verschlusskappe gedreht werden, um eine Tropföffnung zu stanzen.

Außerdem gibt es Verpackungssysteme mit eingebautem Filter, der die Außenluft filtert, um die Flüssigkeit im Inneren vor Mikroorganismen zu schützen (6). Auch die in dieser Studie verwendeten "Novelia®"-Fläschchen (kontaminationsfreie Polypropylen-Gebinde mit patentiertem Tropfersystem) gehören zu dieser Kategorie. Das System der Firma Nemera verwendet ein Entlüftungssystem, um den Druck durch das Betätigen der Flasche auszugleichen. Es kann laut Firmenangaben nach dem Öffnen 60 Tage lang verwendet werden und bietet eine hohe Dosiergenauigkeit. Außerdem wird der Kontakt mit dem Auge minimiert (11).

Ein weiteres spezielles System, das vor mikrobieller Kontamination von außen schützt, ist das „COMOD®“-System. Das Arzneimittel befindet sich hierbei in einem zusammenklappbaren Polyethylenbeutel und durch eine Airless-Pumpe wird verhindert, dass die Luft nach Betätigung von außen einströmt, sodass der Kontakt mit der Umgebungsluft verhindert wird. Außerdem befindet sich in der Nähe der Auslassspitze ein Silberdraht mit biozider Wirkung. Das Druckgleichgewicht wird durch das Eindringen von Luft zwischen dem kollabierenden Beutel und der Behälterwand aufrechterhalten. Nach Anbruch sind die „COMOD®“-Systeme 12 Wochen und die funktionsähnlichen „ABAK®“-Systeme (mikroporöses Pad als Filtersystem) acht Wochen stabil (5-6, 11).

„3K®“-Systeme bestehen aus einer Filtermatrix, die das Eindringen von Luft verhindert, einem Ventil, das den Rückfluss des Produkts verhindert und aus einer Spule mit oligodynamischer Wirkung, die das mikrobielle Wachstum einschränkt.

Der Aufbau des „OSD®“-Systems von Aptar Pharma verhindert ebenfalls das Zurückfließen des Produkts, indem sich die Spitze unmittelbar nach Abgabe der Formulierung wieder schließt und die Luft filtriert wird (11).

2.2.4. Besonderheiten der magistralen Herstellung von Augentropfen

Da das Auge ein sehr empfindliches Organ ist und über den Sehnerv in direkter Verbindung zum Gehirn steht, gelten strenge Regeln zur Herstellung von Arzneiformen zur Anwendung am Auge. Zu den wichtigsten Anforderungen gehören die Sterilität und Verträglichkeit der Augentropfen (10).

Zur Herstellung wässriger Augentropfen wird Wasser für Injektionszwecke als Lösungsmittel verwendet und es werden maximal 10 ml abgefüllt. Vor der eigentlichen Produktion werden Überlegungen zum Thema Dosierung, Applikationsart, Art und Menge der Ausgangsstoffe, Haltbarkeit, Auswahl der Hilfsstoffe und Sterilisationsmethode getätigt (9).

Es ist wichtig, dass der pH-Wert und die Tonizität mit geeigneten Hilfsmitteln angeglichen wird. Da der pH-Wert des Stabilitätsoptimums vieler Arzneistoffe, der Wirksamkeit und der besten Verträglichkeit oft variieren, wird ein Kompromiss getroffen und die Augentropfen auf einen euhydrischen pH-Wert eingestellt. Das bedeutet, dass Augentropfen einen pH-Wert von circa 6,5-8,5 aufweisen sollten.

Augentropfen müssen isotonisch mit der Tränenflüssigkeit sein, also annäherungsweise einen physiologischen osmotischen Druck besitzen, um den Konzentrationsunterschied auf beiden Seiten des Hornhautepithels so gering wie möglich zu halten. Die Berechnung der Menge der zu Isotonisierung benötigten Hilfsstoffe, ist über verschiedene Methoden möglich. Durch Nutzung der Gefrierpunktserniedrigung der Inhaltsstoffe ist es möglich, die Menge der benötigten Hilfsstoffe zu ermitteln. Die hierzu benötigten Richtwerte sind im Österreichischen Arzneibuch zu finden. Hier sind auch die isotonen Konzentrationen gängiger Arzneistoffe gelistet, über welche die notwendige Wassermenge zur Isotonisierung der geforderten Wirkstoffmenge berechenbar ist. Wenn die Konzentration des Arzneistoffs allerdings geringer als 0,005 molar ist, kann direkt mit isotoner Kochsalzlösung gearbeitet werden.

Um Keimfreiheit des Produkts zu gewährleisten, wird unter aseptischen Bedingungen gearbeitet. In der Apotheke bedeutet dies, dass vorzugsweise in einer sterilen Werkbank (Laminar Air Flow-Arbeitsbank) gearbeitet wird. Die hergestellte Flüssigkeit wird durch einen Entkeimungsfilter in ein steriles Gefäß filtriert. Der Membranfilter besitzt einen Porendurchmesser von 0,22 µm. Die hierfür benötigten Materialien wie Fertigspritze, Nadel und Filtereinheit sind sterile Einmalartikel.

Die Funktionstüchtigkeit und intakte Beschaffenheit der Filtereinheit nach Verwendung ist mittels Blasendrucktest (Bubble point test) zu überprüfen. Mit der Spritze wird Luft aufgezogen, der Filter angebracht und die Luft wird durch den Filteraufsatz in ein Becherglas mit Wasser filtriert. Wichtig ist hierbei ein spürbarer Widerstand, sowie kein sichtbarer kontinuierlicher Luftstrom vor Erreichen der 2 ml-Marke (6, 10).

2.2.5. Hygienerichtlinien

Neben der korrekten aseptischen Arbeitsweise spielt auch die Einhaltung bestimmter Hygienerichtlinien eine große Rolle bei der Herstellung magistraler Augentropfen.

Dazu gehört einerseits die richtige Hygiene am Arbeitsplatz, wie regelmäßiges Desinfizieren der Oberflächen oder die richtige Verwendung einer sterilen Werkbank, aber auch Personalhygiene: das Tragen eines sauberen Labormantels und steriler Einmalhandschuhe, das Ablegen von Schmuck an den Händen, das gründliche Waschen und Desinfizieren der Hände, das Zusammenbinden langer Haare und eventuell das Tragen eines Mundschutzes oder von Schuhüberzügen. Außerdem sollte die Herstellung zügig und von gesundem Personal erfolgen und nicht unterbrochen werden (13).

2.3. Atropinsulfat als Wirkstoff in Ophthalmica

Atropinsulfat wird in der Ophthalmologie zu diagnostischen sowie therapeutischen Zwecken in der Funktion eines Mydriatikums eingesetzt. Die chemische Struktur dieses Alkaloids ist in Abbildung 2 (14) dargestellt.

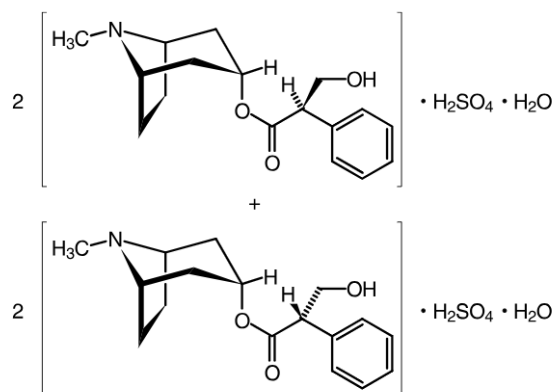


ABBILDUNG 2: Struktur von Atropinsulfat (14)

Atropinsulfat (Summenformel $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$, relative Molekülmasse: 695 g/mol) ist ein weißes, kristallines Pulver bzw. in Form farbloser Kristalle vorliegend. Es ist sehr gut wasserlöslich sowie gut löslich in 96% Ethanol (14).

Atropin ist ein Esteralkaloid und entsteht durch Razemisierung aus dem Tropanalkaloid L-Hyoscyamin. Atropin ist neben Scopolamin in verschiedenen

Solanaceen-Gewächsen wie *Atropa Belladonna* (Tollkirsche), *Hyoscyamus niger* (Bilsenkraut) und *Datura stramonium* (Stechapfel) enthalten (15).

2.3.1. Wirkung und Anwendung

Atropin bzw. Atropinsulfat ist ein nicht selektiver muskarinischer Rezeptor-Antagonist. Die Wirkung von Acetylcholin, ein Transmitter des Parasympathikus, wird kompetitiv an den Muskarin-Rezeptoren gehemmt. Die Bildung und Freisetzung von Acetylcholin selbst sind jedoch nicht betroffen. Es kommt zur Hemmung von Parasympathikus-vermittelten Funktionen wie beispielsweise der Sekretion von Speichel und Magensaft, sowie zu einer Erhöhung der Herzfrequenz. Am Auge kommt es zu einer Erweiterung der Pupillen und Akkommodationslähmung.

Zu den generellen Anwendungsgebieten von Atropin gehören Bradykardie und Intoxikationen mit Insektiziden, Alkylphosphaten (Cholinesterasehemmstoffe) und Carbamaten. Außerdem wird es verwendet, um Spasmen bei abdominellen Koliken oder bei Asthma bronchiale zu reduzieren (16).

In der Ophthalmologie wird Atropin bei einer Entzündung der Iris (Iritis), zur postoperativen Kataraktbehandlung und in der Diagnostik zur Pupillenerweiterung eingesetzt (6,16), zudem bei Zykloplegie, Amblyopie und Strabismus (4).

Augentropfen mit Atropinsulfat werden unter anderem zur Eindämmung der Fortschreitung von Myopie bei Kindern eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt, jedoch verhindert Atropin die Dehnung und das Verdünnen der Sklera und somit das Wachstum des Augapfels (1, 17). Man geht davon aus, dass Atropin das Signal für das axiale Längenwachstum über den M1- und M4- muskarinischen Rezeptor blockiert. Diese Rezeptoren sind in Hornhaut, Ziliarkörper und -muskeln, im Linsenepithel und im retinalem Pigmentepithel, in der Netzhaut, Aderhaut und Sklera zu finden (18).

In Tiermodellen hat sich gezeigt, dass Atropin das Dickenwachstum der Aderhaut von Hühnern begünstigt, die Kontrastempfindlichkeit erhöht und zu einer Dopaminfreisetzung an der Netzhaut führt (19).

Aufgrund der vielen unerwünschten Wirkungen wurde auf das Einsetzen von Atropin bei der Behandlung von Myopie lange Zeit verzichtet. Jedoch wurde herausgefunden, dass es auch in einer sehr geringen Dosierung (0,01%) wirksam ist und die unerwünschten Wirkungen hier akzeptabel sind (19).

2.3.2. Unerwünschte Wirkungen

Zu den möglichen unerwünschten Wirkungen von Atropin bzw. Atropinsulfat zählen Lichtempfindlichkeit, Pupillenweite, Mundtrockenheit, Unruhe, Reizbarkeit, Delirium, Tachykardie und Flush. Allerdings sind diese bei einer verwendeten Konzentration von 0,01 % am Auge nicht zu erwarten (18).

Im Vergleich zu anderen Mydriatika ist Atropin selten ein Auslöser von kontaktallergischen Reaktionen (20). Diese würden sich in Form einer Konjunktivitis oder Hautausschlägen zeigen (16).

Eine Atropinbehandlung am Auge kann außerdem zu Akkommodationsstörungen und Mydriasis führen. Es wird empfohlen, eine Sonnenbrille zu tragen. Die Augentropfen müssen außerhalb der Reichweite von Kindern aufbewahrt werden, da das Einnehmen aufgrund der Toxizität schwere Folgen haben kann (17). Die meisten Vergiftungsfälle durch Atropin passieren jedoch durch den Verzehr von Tollkirsche und Stechapfel, und weniger durch die versehentliche Einnahme von atropinhaltigen Arzneimitteln. Zu den typischen Symptomen einer Atropinvergiftung zählen Schluckbeschwerden, Rötung des Gesichts, Tachykardie, Mydriasis und Trockenheit der Schleimhäute. In schweren Fällen kann es zu Hyperthermie, Halluzinationen, Krämpfen, Bewusstlosigkeit und Tod durch zentrale Atemlähmung kommen (15). Eine Vergiftung wird üblicherweise mit dem Antidot Physostigmin intravenös behandelt (16).

Zu den Kontraindikationen bei einer Behandlung mit Atropinsulfat gehören Stenosen im Magen-Darm-Bereich, Prostatahypertrophie, Megakolon, paralytischer Ileus, Myasthenia gravis und schwere Zerebralsklerose. Es sind keine embryotoxischen Wirkungen bekannt.

Durch bestimmte Arzneimittel wie Procain, Amantadin, trizyklische Antidepressiva, Chinidin, Neuroleptika, Antiparkinsonika und Antihistaminika kann es zu einer Verstärkung der parasympholytischen Wirkung kommen (16).

2.4. Myopie

Myopie, auch Kurzsichtigkeit genannt, ist eine Fehlsichtigkeit, bei der aufgrund des zu langen Bulbus das Licht vor der Netzhaut gebrochen wird und dazu führt, dass Betroffene in der Ferne verschwommen sehen. Es wird geschätzt, dass aktuell (Stand 2020) 1,4 Milliarden Menschen weltweit an besagter Krankheit leiden und 2050 sogar bis zu 4,7 Milliarden betroffen sein könnten. Dabei spielen einige Risikofaktoren eine Rolle: ständiges Arbeiten mit Bildschirmen und anderen nahen Objekten (wie zum Beispiel am Computer oder lesend) oder zu wenig körperliche Bewegung (2-3). Starke Myopie kann zu Folgekrankheiten wie Glaukom, Netzhautablösung oder Makuladegeneration führen (21).

Insbesondere in Ostasien nimmt die Zahl der Betroffenen stark zu, weswegen die Behandlung mit 0,01% Atropinsulfat-Augentropfen weit verbreitet ist. Im Zuge einer nicht medikamentösen Behandlung wird versucht, das Arbeiten in der Nähe (beispielsweise Bildschirmarbeiten) zu reduzieren und Kinder vermehrt dem Sonnenlicht auszusetzen, wodurch Dopamin in der Netzhaut freigesetzt wird, was das Längenwachstum des Augapfels reduziert (17).

Die derzeitigen therapeutischen Optionen haben allerdings ihre Grenzen. So kann beispielsweise die Orthokeratologie (Umformung der Hornhaut durch eine harte,

hydrophile Kontaktlinse, die nachts getragen wird) das Fortschreiten der Krankheit nicht ganz stoppen, denn nach Beendigung dieser Therapie kehrt sie wieder zu ihrem Ausgangszustand zurück (3).

Als neuer Ansatz sollen 0,01%ige Atropinsulfat-Augentropfen wesentlich dazu beitragen, die Myopieprogression zu vermindern. Im Vergleich zu 0,1%igen und 0,5%igen Augentropfen sollen sie zu weniger unerwünschten anderen Wirkungen führen. Niedrigdosierte Atropinsulfat-Augentropfen (0,01%, 0,025%, 0,05%) könnten die Myopieprogression um 50% verlangsamen, ohne dabei klinisch relevante Nebenwirkungen hervorzurufen (1). Außerdem wurde festgestellt, dass es bei höherkonzentrierteren Atropinsulfat-Augentropfen vermehrt zu einem Rebound-Effekt nach Absetzen der Behandlung kommen kann (22).

2.5. Mikrobiologische Integritätstests

In den 1990er-Jahren wurde der sogenannte „Wiedemann-Test“ entwickelt, um die mikrobielle Stabilität von „3K®“- und „COMOD®“- Augentropfen-Systemen zu untersuchen, bei denen antimikrobielle Silberionen in den Flascheninhalt abgegeben werden. Bei diesem Test wird das System mehrfach einer Bakteriensuspension von *Pseudomonas aeruginosa* ausgesetzt. Diese gramnegativen Bakterien wurden ausgewählt, da sie unter anderem Auslöser von Entzündungen am menschlichen Auge und bakterieller Keratitis sind. Als Testmedium wird Kochsalzlösung verwendet. Die Flasche wird innerhalb von vier Tagen acht Mal in die Suspension getaucht, wieder entfernt und zur Entnahme von Tropfen betätigt. Die Proben werden bei Raumtemperatur gelagert und zur Testung wird bei 32 °C inkubiert.

Das Unternehmen AptarGroup entwickelte für ihre konservierungsmittelfreien Mehrdosenbehälter „Ophthalmic Squeeze Dispenser OSD“ den „tip seal integrity test (TSIT)“, um die Überlebenszeit der Keime an der Öffnung der Flasche festzustellen, sowie das Ausmaß ihres Eindringens in die applizierte Dosis. Hierbei wird ebenfalls die oben genannte Bakteriensuspension verwendet, jedoch wird die Spitze des Packmittels hineingehalten und in der Flüssigkeit betätigt. Dieser Vorgang wird zehn Mal innerhalb von fünf Tagen wiederholt und findet bei 32 °C statt (23).

Beim nachfolgend entwickelten neuen „tip seal integrity test (TSIT 2.0)“ wird eine Bakteriensuspension aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* verwendet, um eine realitätsgetreuere Situation zu schaffen. Die Spitze wird in die Flüssigkeit getaucht und zehn Mal innerhalb von vier Tagen betätigt. Anschließend werden die Proben drei bis fünf Tage bei 30-35 °C inkubiert und visuell ausgewertet. Optional kann eine mikrobielle Stabilitätsprüfung mittels Ausplattieren durchgeführt werden (23).

In Abbildung 3 (11) wird der Versuchsaufbau des Wiedemann-Tests, des Tip Seal Integrity Test und des TSIT 2.0 dargestellt.

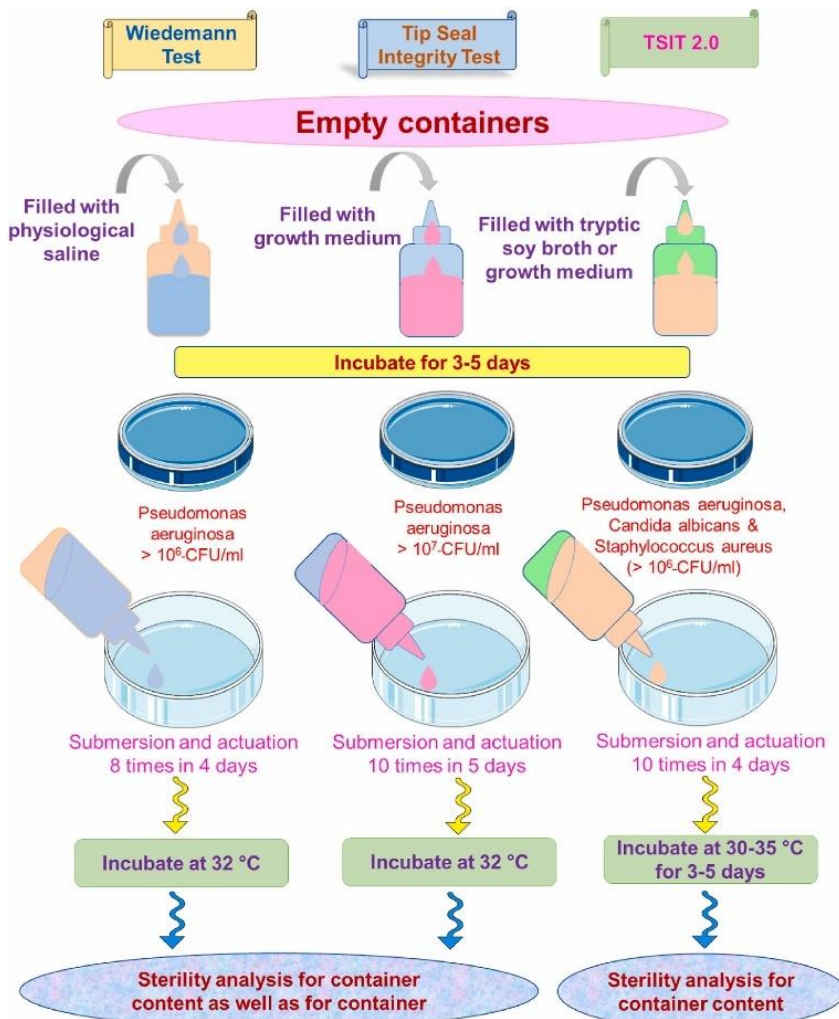


ABBILDUNG 3: Schematische Darstellung mikrobiologischer Integritätstests; abgedruckt mit Genehmigung von Elsevier nach Vasdev et al. (11)

2.5.1. Mikroflora des Auges

Die Mikroflora des äußeren Augenbereichs gleicht beinahe der Hautflora. Zu finden sind grampositive Bakterien wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Corynebakterien*, *Propionibakterien*, *Peptostreptokokken*, *Streptokokken* und *Actinomyceten*, sowie gramnegative Bakterien wie *Neisseria*, *Haemophilus* und *Proteus*.

Im Gegensatz zur Haut kommt es fast ausschließlich bei nicht intaktem Abwehrsystem (beispielsweise ausgelöst durch eine immunsuppressive Therapie oder posttraumatisch/postoperativ) zu Infektionen im äußeren Auge.

Im inneren Augenbereich befinden sich unter physiologischen Bedingungen keine Erreger. Jedoch können intraokulare Infektionen durch exogene oder endogene Einflüsse hervorgerufen werden (24).

3. Materialien und Methoden

Im Zuge dieser Arbeit wurden Augentropfen mit 0,01% Atropinsulfat ohne Konservierungsmittel hergestellt. Dabei wurden zwei verschiedene Arten von Mehrdosenbehältnissen verwendet und die Lagerung der Proben fand im Kühlschrank und bei Raumtemperatur statt, um den Einfluss von Packmittel und Raumtemperatur auf die Haltbarkeit der Proben nach Anbruch („Aufbrauchfrist“ nach Anbruch) zu untersuchen.

Über einen Zeitraum von 12 Wochen wurde eine tägliche Anwendungssimulation werktags (Mo-Fr) durchgeführt. Währenddessen wurde regelmäßig die mikrobielle und chemische Stabilität überprüft und eine visuelle Kontrolle durchgeführt.

In der untenstehenden Abbildung ist der Ablauf dieses Versuchs grafisch dargestellt (Abbildung 4).

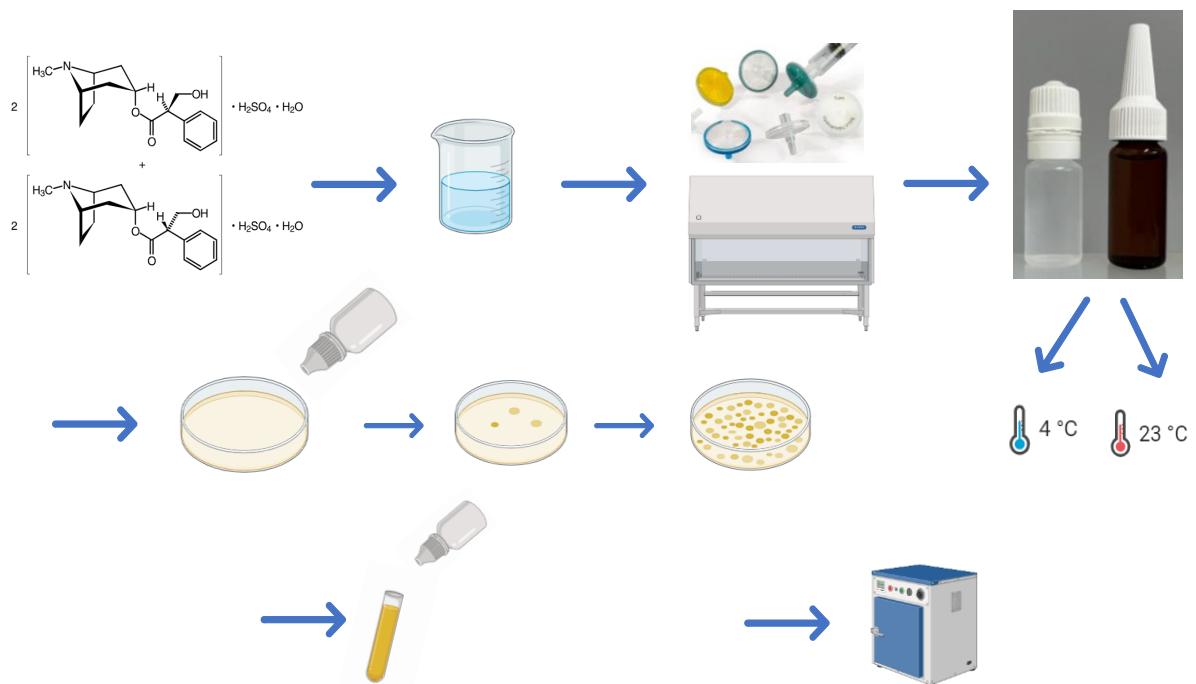


ABBILDUNG 4: Aufbau des Versuchs: mikrobielle Stabilität von Atropinsulfat-Augentropfen; erstellt mit www.biorender.com

3.1. Verwendete Materialien

Atropinsulfat (Atropinum sulfuricum) wurde von Dr. Stefan Brenner, Leiter des chemisch-pharmazeutischen Laboratoriums der Apothekerkammer Wien, zur Verfügung gestellt (Charge 23J00876; Hersteller: Gall-Koller GmbH; Lagerung bei 2-8 °C).

Für die Herstellung der Augentropfen wurde Aqua ad iniectabilia der Firma Braun (Pharmazeutischer Unternehmer B. Braun Melsungen AG, Deutschland), Chargennummer 230838091, verwendet.

Zudem wurde 0,9%ige sterile und endotoxinfreie Natriumchlorid-Spüllösung der Firma Fresenius Kabi AG, Bad Homburg (Chargennummer 13SDP163), verwendet.

Für die mikrobiologische Analytik wurden CASO-Agar bestehend aus Fleisch- und Caseinpepton, Glucose-Monohydrat, und Agar (Charge 432321102; Hersteller: Carl Roth GmbH + Co. KG; Lagerung bei 15-25 °C; ISO 9308, ISO 11133, ISO 11930, ISO 18415, ISO 18416, ISO 21149, ISO 21150, ISO 22717, ISO 22718) und Sabouraud- 4 %- Glucose-Agar bestehend aus Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat), Pepton aus Soja (Papainhydrolysat), Natriumchlorid und Agar (Charge 363341806; Hersteller: Carl Roth GmbH + Co. KG; Lagerung bei 15-25 °C; ISO 11133, ISO 16212) verwendet.

Außerdem wurde der LB-Agar (Lennox) bestehend aus Trypton, Hefeextrakt, Natriumchlorid und Agar-Agar (Charge 221308475; Hersteller: Carl Roth GmbH + Co. KG; Lagerung bei 15-25 °C) verwendet.

Für die Prüfung auf Sterilität (Prüfung 2.6.1 Ph.Eur.) wurden CASO-Bouillon (Ph.Eur., USP, ISO 10273, ISO 11133, ISO 21871, für die Mikrobiologie) bestehend aus Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat), Pepton aus Soja (Papainhydrolysat), Kaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid und Glucose-Monohydrat verwendet (Charge 343341189; Hersteller: Carl Roth GmbH + Co. KG; Lagerung bei 15-25 °C).

Für die chemische Analytik wurde Atropinsulfat-Monohydrat (USP, 500 mg, CAS-Nr. 5908-99-6, Kat.-Nr. 1045009) von der Firma Sigma Aldrich/Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Alle anderen Reagenzien waren von pharmazeutischer Qualität und wurden wie angegeben verwendet.

3.2. Studiendesign

Für die Untersuchung der Anbruchstabilität der unkonservierten 0,01%igen Atropinsulfat-Augentropfen unter Verwendung verschiedener Packmittel, Lagertemperaturen und Herstellungsbedingungen wurden zunächst drei Chargen zu je acht Stück Augentropfen à 10 ml hergestellt. Die Hälfte der Proben wurden unter aseptischen Bedingungen in der Laminar Air Flow-Werkbank und die andere Hälfte als Positivkontrolle unter nicht aseptischen Bedingungen hergestellt. Diese wurden jeweils in zwei verschiedene Packmittel abgefüllt: Sterile Einweg-Braunglasflaschen (10 mL, Klasse I) mit sterilen Einweg-Tropfkonen aus Brombutylkautschuk (Herba Chemosan

Apotheker AG, Wien, Österreich) sowie kontaminationsfreie Kunststoff-Gebinde mit patentiertem Tropfersystem (Novelia®, Nemera, Frankreich).

Jeweils die Hälfte der Novelia®- und der Braunglas-Proben wurden bei Raumtemperatur ($23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) sowie im Kühlschrank ($4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) vertikal gelagert; während der Lagerung wurde die tägliche Anwendung („daily dripping“) simuliert. Die untenstehende Grafik (Abbildung 5) veranschaulicht den Aufbau dieser Studie.

Um die mikrobielle Stabilität zu überprüfen, wurden regelmäßig Stabilitätstests mittels Ausplattieren durchgeführt. Nach vorgegebener Inkubationszeit und -temperatur wurden die Platten visuell ausgewertet. Zusätzlich wurden ausgewählte Proben mittels Prüfung 2.6.1 Ph.Eur. (Prüfung auf Sterilität) beurteilt und mittels HPLC auf ihren Wirkstoffgehalt überprüft, um die chemische Stabilität des Wirkstoffs zu evaluieren.

Sämtliche Versuche erfolgten mit drei Replikaten (n=3 Chargen); die Herstellung erfolgte jeweils aus einer separaten Wirkstoff-Stammlösung (1:100) pro Charge.

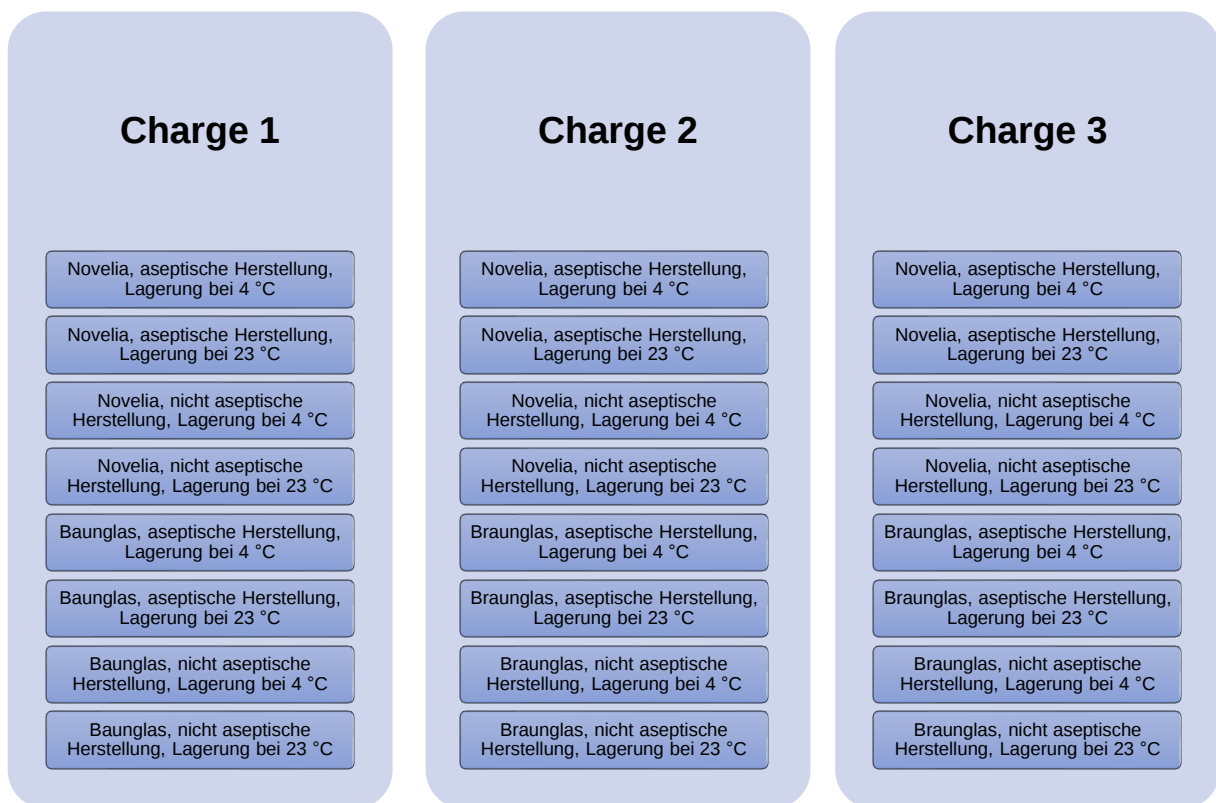


ABBILDUNG 5: Überblick Studiendesign

Die Etiketten wurden wie in untenstehender Tabelle dargestellt beschriftet (Tabelle 1).

TABELLE 1: *Etikettenbeschriftung der Atropinsulfat-Augentropfenflaschen*

Charge 1							
1	1	1	1	1	1	1	1
AN	AN	AB	AB	N	N	B	B
8	23	8	23	8	23	8	23
Charge 2							
2	2	2	2	2	2	2	2
AN	AN	AB	AB	N	N	B	B
8	23	8	23	8	23	8	23
Charge 3							
3	3	3	3	3	3	3	3
AN	AN	AB	AB	N	N	B	B
8	23	8	23	8	23	8	23
A = aseptische Herstellung, N = Novelia®, B = Braunglas, 8 = Lagerung im Kühlschrank (4 °C), 23 = Lagerung bei Raumtemperatur (23 °C)							

3.3. Magistrale Herstellung

Für die Herstellung einer Charge (8 Stück) der 0,01%igen Atropinsulfat-Augentropfen wurde zunächst eine 1%ige Stammlösung zubereitet. Für 10 g dieser Stammlösung wurde 0,1 g Wirkstoff (Atropinsulfat) eingewogen und mit Wasser für Injektionszwecke (aqua ad iniectionabilia) mittels Spritze auf 10 g aufgefüllt. Die Lösung wurde geschwenkt, mit einem Glasstab umgerührt und wenige Minuten stehen gelassen, um sicherzustellen, dass die Substanz vollständig gelöst war.

Um 100 g der 0,01%igen Augentropfen herzustellen wurde anschließend 1 g der Stammlösung in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Mit einer sterilen und

pyrogenfreien 0,9%igen NaCl-Lösung wurde auf 100 g aufgefüllt und die Mischung geschwenkt und durchgerührt.

Das Abfüllen der Augentropfen in die vorgesehen Augentropfenflaschen wurde in einer Laminar Air Flow-Werkbank (MSC Advantage 1.5, Serial no. 43097258, Thermo Electron LED GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die hierfür benötigten Materialien wurden zunächst zurechtgelegt und mit Ethanol abgesprüht, bevor sie in die Laminar Air Flow-Werkbank gebracht wurden: zwei steril verpackte Novelia®-Gefäße, vier steril verpackte Braunglasfläschchen, vier steril verpackte Tropfkonusse, eine Spritze (Omnifix Luer Lock Solo 20 ml der Firma Braun Melsungen AG), einen Sterilfilter (Ahlstrom ReliaPrep Syringe Filter single use non-pyrogenic, LOT No: 01382103) und den Erlenmeyerkolben mit 100 g Augentropfenlösung.

Beim aseptischen Arbeiten ist es wichtig, Einmalhandschuhe und sterile Ärmelüberzüge zu tragen (VWR Cleanroom Tapered Sleeves, VWR, Deutschland). Die Hände, Flächen und Materialien müssen außerdem ausreichend mit Ethanol desinfiziert werden.

Das Abfüllen der Augentropfen in der Laminar Air Flow-Werkbank in die entsprechenden Behältnisse erfolgt mittels Sterilfiltration. Zunächst wurden die Behältnisse aus der Verpackung entfernt und an das hintere Ende der Arbeitsfläche geschoben. Um Verunreinigungen zu vermeiden, darf nicht oberhalb der Öffnungen der Packmittel gearbeitet werden. Anschließend wurden 10 ml der Augentropfen mit der Spritze aufgezogen und der Sterilfilter aufgesetzt. Hier ist zu beachten, dass der Filter nur außen durch die Verpackung berührt und gerade aufgesetzt wird. Nun wurde die Flüssigkeit in der Spritze durch den Filter in das Gefäß gedrückt und jenes sofort mit dem zugehörigen Deckel verschlossen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle Flaschen befüllt waren.

Die nicht aseptisch hergestellten Proben (zwei Proben in Novelia® und zwei in Braunglas) wurden außerhalb der Laminar Air Flow-Werkbank, auf freier, desinfizierter Fläche mittels Sterilfiltration bei Raumtemperatur befüllt, um eine nicht ordnungsgemäße Arbeitsweise und ihre Folgen zu simulieren.

Abschließend wurde die Funktionstüchtigkeit des Filters mittels „Bubble Point Test“ überprüft. Die Spritze wurde mit Luft aufgezogen und der zuvor verwendete Sterilfilter sowie eine Nadel aufgesteckt. Diese wurde in ein Gefäß mit Wasser getaucht und die Spritze wurde betätigt. Die Integrität der Filtereinheit wurde bestätigt, da erst bei circa 2 ml (bzw. Komprimierung der Luftsäule auf ein Fünftel) ein kontinuierlicher Luftblasenstrom entstand.

Der Vorgang wurde für Charge 2 und 3 wiederholt.

3.4. Tägliche Anwendungssimulation

Atropinsulfat-Augentropfen werden im Zuge einer Behandlung täglich angewendet, indem sie direkt ins Auge eingetropft werden. Um diesen Patientengebrauch zu simulieren, wurden täglich (an Werktagen) zwei Tropfen aus jeder Flasche bei

Raumtemperatur in ein Sammelgefäß abgegeben. Die Tropfen wurden aus der Flasche gedrückt; somit wurde die Öffnung der Augentropfenflaschen belüftet und den Keimen in der Umgebungsluft ausgesetzt. Nicht Teil der Simulation war das Berühren von potenziell kontaminierten Oberflächen.

Die Augentropfen-Abgabegefäße, welche 28 Tage nach Anbruch auf chemische Stabilität des Wirkstoffs und Sterilität des Inhalts überprüft wurden, wurden somit jeweils 20x betätigt. Wenn man davon ausgeht, dass ein wässriger Tropfen 0,05 g wiegt, wurden dadurch 2 g Produkt verbraucht. Die Abgabegefäße, die 56 Tage nach Anbruch auf Stabilität und Sterilität überprüft wurden, wurden somit 40x betätigt und es wurden dadurch 4 g Produkt verbraucht. Die Gebinde, die 84 Tage nach Anbruch auf Stabilität und Sterilität überprüft wurden, wurden somit 60x betätigt und dadurch 6 g Produkt verbraucht. Es zeigte sich jedoch, dass diese hypothetischen Werte in der Praxis abwichen.

3.4.1. Tropfengröße

Um die Reproduzierbarkeit der Tropfengröße nach Abgabe aus den verschiedenen Packmitteln zu überprüfen, wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen die tägliche Anwendungssimulation („daily dripping“) auf der Waage vollzogen. Dabei wurden die Novelia®-Gefäße mittels Quetschen der Flasche und die Braunglasflaschen mittels Schütteln betätigt. Aus den 12 Proben pro Packmittel wurden an drei Tagen je zwei Tropfen getropft, das ergibt 72 Tropfen pro Packmittel und eine Gesamtzahl von 144 Tropfen.

In der untenstehenden Grafik (Abbildung 6) ist zu sehen, dass die Tropfengröße der Braunglasflaschen stärker variierte als die aus Novelia®-Flaschen. Bei $n=144$ Tropfen lag der Mittelwert der Novelia®-Tropfengröße bei 0,0341 g und die Standardabweichung bei 0,0048 g. Im Vergleich dazu lag der Mittelwert des Tropfengewichts der Braunglasflaschen bei 0,0163 g und die Standardabweichung bei 0,0087 g, also um einiges höher.

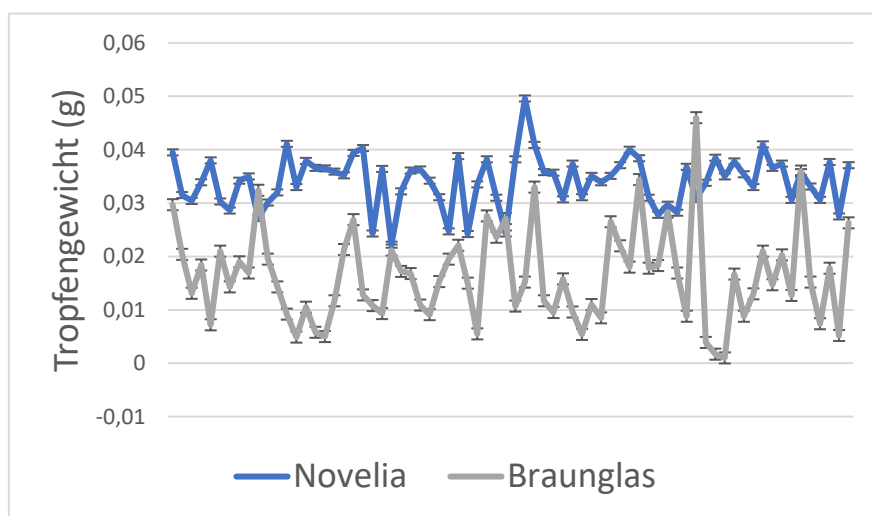


ABBILDUNG 6: Vergleich des Tropfengewichts in Novelia®-Packmittel und im Braunglas ($n=144$, $MW \pm SD$)

3.5. Mikrobiologische Analytik

Um die Anbruchstabilität der Augentropfen zu überprüfen, wurden sowohl mikrobiologische Stabilitätsprüfungen mittels Ausplattieren als auch Sterilitätsprüfungen nach Ph. Eur. (Prüfung 2.6.1., Direktbeschickungsmethode) durchgeführt.

3.5.1. Plattengussverfahren

Die Stabilitätsprüfung via Plattengussverfahren wurde 7, 14, 21 und 28 Tage nach Anbruch mit jeweils allen 24 Proben durchgeführt.

Es wurde CASO-Agar als Nährmedium für Bakterien und Sabouraud 4% Glucose-Agar als Nährmedium für Pilze verwendet. Aufgrund von Verunreinigungen im CASO-Agar-Pulver wurde nach 14 Tagen auf LB-Agar gewechselt. Als positive Referenzprobe wurde Leitungswasser (Josef-Holaubek-Platz 2, 1090 Wien, Österreich) und als negative Referenzprobe Wasser für Injektionszwecke verwendet.

Das benötigte Agar-Pulver wurde in eine Flasche eingewogen und mit der entsprechenden Menge destilliertem Wasser aufgefüllt. Für den CASO-Agar wurde 40 g/L benötigt. Jede der 26 Platten wurde mit 20-25 ml befüllt; es wurden 28 g/700 ml hergestellt. Für den SAB-Agar wurde 65 g/L benötigt; es wurden 45,5 g/700 ml hergestellt. Für den LB-Agar wurde 35 g/L benötigt; es wurden 24,5 g/700 ml hergestellt.

Danach wurde der Agar mit dem Autoklaviergerät (Hiclave HV-58L, HMC Europe GmbH, Labor- & Sterilisationstechnik) autoklaviert.

In der Zwischenzeit wurden die Materialien vorbereitet: Augentropfen-Proben, ein Eppendorf-Vial gefüllt mit 2 ml Leitungswasser, 25 autoklavierte Eppendorf-Vials, Wasser für Injektionszwecke mit Spritze und Nadel und 26 Petrischalen pro Agar (in Summe 52 Petrischalen). Alles wurde mit Ethanol besprüht, bevor es in die Laminar Air Flow-Arbeitsbank gebracht wurde.

Die Petrischalen wurden auf der Unterseite beschriftet. Es wurden 23 Tropfen (ca. 0,9 ml) jeder Probe in ein Eppendorf-Vial getropft und anschließend exakt 0,9 ml mittels Eppendorf-Pipette in die Petrischalen überführt. Diese wurden gestapelt.

Der fertige, flüssige Agar in der Glasflasche wurde ebenfalls außen mit Ethanol besprüht und in die Laminar Air Flow-Arbeitsbank gebracht. Die Platten wurden im Stapel mit 20-25 ml Agar wie in Abbildung 7 abgebildet gegossen (25). Anschließend wurden die Petrischalen leicht geschwenkt und halb geöffnet nebeneinander platziert, bis der Agar erstarrt war.



ABBILDUNG 7: Gießen von Agar-Platten im Stapel; abgedruckt mit Genehmigung von Springer Verlag nach Steinbüchel et al. (25)

Die Schalen mit erstarrtem CASO- beziehungsweise LB-Agar wurden verkehrt (auf den Kopf gestellt) bei 30-35 °C drei Tage inkubiert (Trockenschrank Typ UE500 der Firma Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland) und jene mit SAB-Agar sechs Tage bei 20-25 °C (Wärmeschrank Typ 1811530000202 No. #940562 der Firma Binder GmbH, Knittelfeld, Österreich).

Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Platten visuell ausgewertet und die Kolonien gezählt.

3.5.2. Direktbeschickung

Zusätzlich zu dem Plattengussverfahren wurden bei separat hergestellten Proben jeweils 28, 56 und 84 Tage nach Anbruch und täglicher Nutzung unabhängige Sterilitätsprüfungen (Prüfung 2.6.1, Ph.Eur.) durchgeführt. Die Versuche wurden an unabhängigen Proben nebeneinander durchgeführt, da ausreichende Mengen an Augentropfen für die Anwendungssimulation sowie die Durchführung der Stabilitätstests benötigt wurde und daher eine fortlaufende Analytik aufgrund des begrenzten Volumens nicht möglich war.

Im Zuge dieser Versuche wurde zuerst die passende Menge CASO-Bouillon (flüssiges Nährmedium) eingewogen und in destilliertem Wasser gelöst. Es wurde 30 g für 1 L Medium benötigt. Für 24 Proben, einer positiven Referenz, einer negativen Referenz wurden 260 ml Medium benötigt. Es wurden also 9 g Bouillon eingewogen und 300 ml Wasser hinzugefügt.

Anschließend wurden jeweils 10 ml der Bouillon in Epruvetten überführt und mit einem Aluminiumdeckel verschlossen. Diese wurden in Bechergläser gestellt und leicht geöffnet mit dem Programm für Flüssigkeiten autoklaviert.

Während der Autoklavierzeit wurden jeweils 1 ml der Proben unter der Laminar Air Flow-Arbeitsbank in Eppendorf-Vials überführt und 1 ml Wasser für Injektionszwecke als negative und 1 ml Leitungswasser als positive Referenzprobe vorbereitet.

Nach kurzer Abkühlzeit wurden die mit CASO-Bouillon befüllten Epruvetten in die Laminar Air Flow-Arbeitsbank gebracht und in jede 1 ml Probe eingebracht.

Anschließend wurden die Epruvetten bei 30-35 °C 14 Tage lang inkubiert (Trockenschrank Typ UE500 der Firma Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland). An Tag 1, 3, 7 und 14 wurde eine visuelle Kontrolle durchgeführt. Ein positives Ergebnis, also eine Kontamination, wurde durch Trübung sichtbar (Abbildung 8 und 9).



ABBILDUNG 8: Lagerung der Proben in Bechergläsern während Inkubation



ABBILDUNG 9: Inkubation der Proben im Wärmeschrank

3.6. Chemische Analytik

Die chemische Analytik wurde von Dr. Stefan Brenner, Leiter des chemisch-pharmazeutisches Laboratoriums der Apothekerkammer Wien (Spitalgasse 31, 1090 Wien), durchgeführt.

Der Atropinsulfatgehalt in den hergestellten Augentropfen wurde während der Lagerung aller Proben mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) überwacht. Es wurde ein angepasstes Protokoll gemäß den Richtlinien der USP-Monographie für Atropinsulfat-Augentropfen verwendet. Die Proben wurden mit einem Shimadzu HPLC-Gerät mit Diodenarraydetektion analysiert (2 x SHIMADZU Entgasungseinheit DGU-20A5R, 1 x SHIMADZU Entgasungseinheit DGU-20A3R, SHIMADZU LC-30AD Pumpe A, SHIMADZU LC-30AD Pumpe B, SHIMADZU Kommunikationsbusmodul, SHIMADZU SIL-30AC Autosampler, SHIMADZU RF-20A XS-Fluoreszenzdetektor, SHIMADZU SPD-M20A Diodenarray Detektor, SHIMADZU CTO-30A Säulenofen, Shimadzu Ges. m.b.H., Korneuburg, Österreich). Als stationäre Phase wurde eine Cyanphasen-Säule im Umkehrphasenmodus (Luna CN, 100 mm x 4,6 mm x 3 µm, Phenomenex Ltd., Torrance, USA) verwendet. Die mobile Phase bestand aus Methanol/Natriumacetat-Puffer pH 4,5 (11:89 v/v; Pufferzusammensetzung: 6,8 g Natriumacetat-Trihydrat, 3,5 mL Triethylamin, 6,6 mL

Eisessig pro 1 L destilliertes Wasser). Nach der Entgasung wurden die Proben bei einer Flussrate von 1,2 mL/min und einer Ofentemperatur von 40 °C injiziert; das Injektionsvolumen wurde auf 50 µl eingestellt. Die Chromatogramme wurden bei 225 ± 8 nm ausgewertet. Die Peakflächen (AUC) wurden mit dem Chromeleon 7 Chromatographiedatensystem (Thermo Scientific Chromeleon Version 7.2. 10 ES) erhalten. Die Proben wurden auf den Gehalt an Atropinsulfat und den Gehalt an bekannten Abbauprodukten Tropensäure (3-Hydroxy-2-phenylpropansäure), Atropinsäure (2-Phenylacrylsäure) und Apotropin ((1R,3r,5S)-8-Methyl-8-azabicyclo(3.2.1)octan-3-yl-2-phenylacrylat) untersucht. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung von Referenzlösungen in einem Kalibrierungsbereich von 40 µg/mL – 120 µg/mL.

3.7. Kontaminationsstudie TSIT2

Um die mikrobielle Integrität der beiden Packmittel zu testen, wurde eine Kontaminationsstudie („microbial tip seal challenge test“ oder „tip seal integrity test 2.0“) durchgeführt.

Hierfür wurden 3 g des CASO-Bouillon Pulvers (Nährmedium) eingewogen, mit 100 ml destilliertem Wasser befüllt (30 g/L benötigt also 3 g/100 ml) und anschließend mit dem Programm für Flüssigkeiten autoklaviert.

Nach kurzer Abkühlzeit wurden drei Novelia®-Flaschen und fünf Braunglas-Flaschen unter aseptischen Bedingungen in der sterilen Werkbank mit jeweils 10 ml CASO-Bouillon (Nährmedium) befüllt. Zusätzlich dazu wurde jeweils eine der beiden Packmittel mit 9 ml Bouillon und 1 ml Leitungswasser als positive Referenz befüllt.

Die Hälfte der Proben wurde im Kühlschrank (4 °C ± 1 °C) und die andere Hälfte Novelia® bei Raumtemperatur (23 °C ± 2 °C) gelagert. Außerdem wurden die Braunglas-Proben in Art der Anwendung geteilt. Zwei von ihnen wurden durch Schütteln betätigt und die anderen beiden durch Drücken des sterilen Tropfkonus.

Der TSIT 2.0 ist in Kontaminations- und Inkubationsphase geteilt. Die Kontaminationsphase dauert vier Tage. An Tag 1-3 wurde die Challenge drei Mal täglich mit einem Abstand von drei Stunden durchgeführt (Abbildung 10 und 11). Hierbei wurde die Spitze jeder Augentropfen-Flasche in eine Petri-Schale mit circa 40 ml Leitungswasser getaucht und 2x betätigt. Das Leitungswasser diente stellvertretend als Bakteriensuspension. An Tag 4 wurde diese Challenge nur 1x durchgeführt und die Proben zusammen mit den positiven Referenzen anschließend drei Tage bei 30-35 °C inkubiert.



ABBILDUNG 10: Durchführung des „tip seal integrity test“



ABBILDUNG 11: Vorbereitung des „tip seal integrity test“

Die negative Referenzproben (nur CASO-Bouillon, steril abgefüllt und im Kühlschrank gelagert) wurden nicht geöffnet und betätigt.

4. Ergebnisse

Die visuelle Auswertung der Platten nach dem Ausgussverfahren zeigten folgenden Ergebnisse: in den ersten 14 Tagen nach Herstellung und Anbruch blieben sämtliche Proben unabhängig von Lagerungstemperatur und Packmittel während der Anwendung kontaminationsfrei.

Die ersten Unterschiede zeigten sich ab Tag 21: im Braunglas war unabhängig von der Lagertemperatur Kontamination feststellbar (Tag 21: 41,7% aller Proben beziehungsweise fünf von 12 Proben). Genauer gesagt waren zwei Proben auf dem Nährboden für Bakterien kontaminiert und vier auf dem Nährboden für Pilze, wobei eine der Proben (2B23, Lagerung bei Raumtemperatur) auf beiden ein Wachstum zeigte (Abbildung 12 und 13). Drei der fünf kontaminierten Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert und zwei im Kühlschrank.

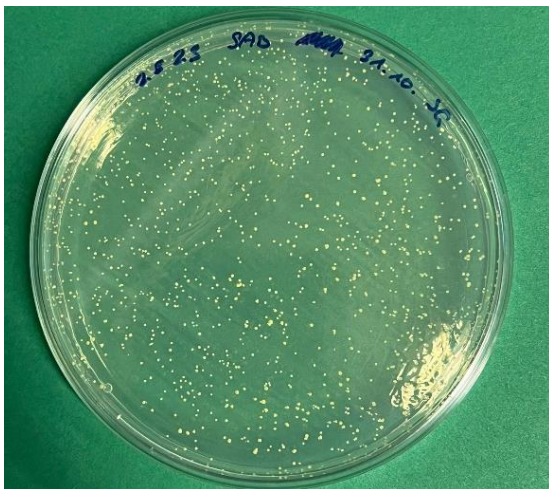


ABBILDUNG 12: Probe 2B23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) auf dem Nährboden für Pilze

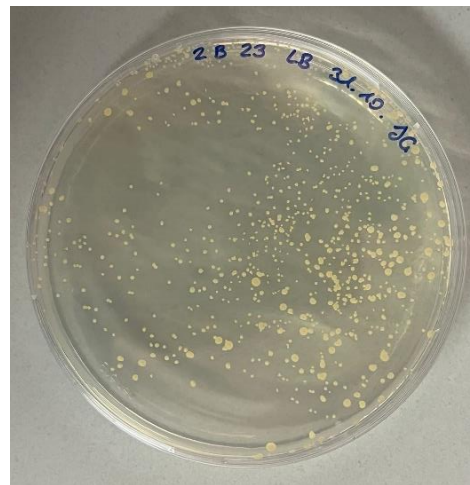


ABBILDUNG 13: Probe 2B23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) auf dem Nährboden für Bakterien

Ab Tag 28 waren 9 der 12 Proben im Braunglas, also 75%, kontaminiert. Davon wiesen fünf Proben Wachstum auf dem Nährboden für Bakterien und acht Proben Wachstum auf dem Nährboden für Pilze auf, wobei sich vier überschneiden. Die meisten koloniekoloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) zeigten 2AB23 und 3AB23 (aseptische Herstellung, Lagerung bei Raumtemperatur) (Abbildung 14 und 15).



ABBILDUNG 14: Proben 2AB23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) und 3AB23 (Charge 3, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) auf Nährboden für Pilze

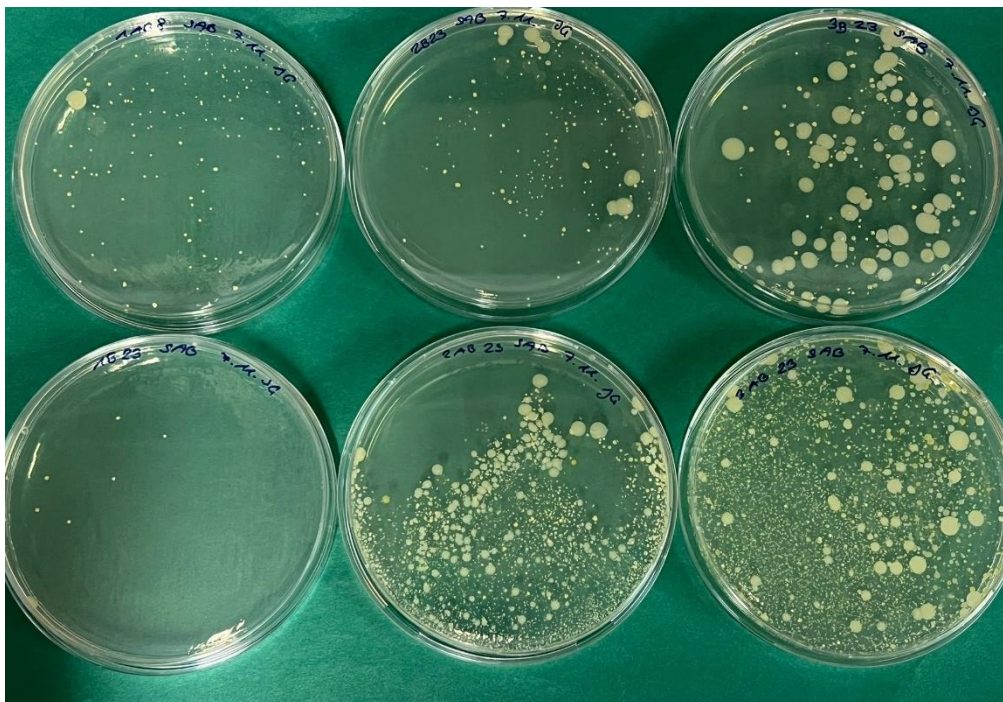


ABBILDUNG 15: Proben 1AB8 (Charge 1, Braunglas, Lagerung im Kühlschrank; oben links), 2B23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung im Kühlschrank; oben Mitte), 3B23 (Charge 3, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur; oben rechts), 1B23 (Charge 1, Braunglas Lagerung bei Raumtemperatur; unten links), 2AB23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur; unten Mitte), 3AB23 (Charge 3, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur; unten rechts) auf Nährboden für Pilze

Insgesamt waren also zehn der zwölf Proben im Braunglas (83,3%) kontaminiert. Davon wurden 50% (fünf Proben) im Kühlschrank gelagert. 40% der zehn kontaminierten Proben im Braunglas wurden aseptisch hergestellt. Folglich ist kein direkter Zusammenhang zwischen Lagerungstemperatur und Keimbelastung herstellbar. Es waren zwar mehr Proben (60%) kontaminiert, die unter nicht aseptischen Bedingungen hergestellt wurden, jedoch konnte auch hier bei der Stärke der Keimbelastung kein Zusammenhang hergestellt werden.

In Novelia®-Packmitteln war nach 3 und nach 4 Wochen Anwendung unabhängig von Lagerungstemperatur, Packmittel und Herstellungsbedingungen keine Kontamination feststellbar (0 %).

Die Tabelle auf der folgenden Seite (Tabelle 2) veranschaulicht den Grad der Kontamination der Proben 7, 14, 21 und 28 Tage nach Anbruch. Die gezählten Kolonien werden in „koloniebildende Einheiten pro Milliliter“ angegeben (KBE/ml).

TABELLE 2: Ergebnisse der Untersuchung auf mikrobielle Stabilität mittels Ausplattieren

	7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
1-AN 23	-	-	-	-
1-AN 8	-	-	-	-
1-N 23	-	-	-	-
1-N 8	-	-	-	-
1-B 23	-	-	-	+
1-B 8	-	-	+	-
1-AB 23	-	-	-	-
1-AB 8	-	-	-	++
2-AN 23	-	-	-	-
2-AN 8	-	-	-	-
2-N 23	-	-	-	-
2-N 8	-	-	-	-
2-B 23	-	-	+++	++
2-B 8	-	-	-	+
2-AB 23	-	-	+	+++
2-AB 8	--	-	-	-
3-AN 23	-	-	-	-
3-AN 8	-	-	-	-
3-N 23	-	-	-	-
3-N 8	-	-	-	-
3-B 23	-	-	-	++
3-B 8	-	-	+	+
3-AB 23	-	-	+	+++
3-AB 8	-	-	-	+
1, 2, 3 = Bezeichnung der Charge; A = aseptische Herstellung; N = Novelia®; B = Braunglas; 23 = Lagerung bei Raumtemperatur; 8 = Lagerung im Kühlschrank + (1-30 KBE/ml), ++ (30-200 KBE/ml), +++ (200 - ∞ KBE/ml)				

Die Sterilitätsprüfung mittels Direktbeschickungsmethode zeigte ähnliche Ergebnisse. Die Kulturen wurden mehrfach während und nach der Inkubationszeit makroskopisch auf sichtbares Wachstum von Mikroorganismen überprüft.

Bei den Proben, die vier Wochen nach Herstellung und Anbruch auf mikrobielle Stabilität untersucht wurden, zeigte sich bereits am dritten Inkubationstag eine Trübung bei drei der Braunglas-Proben (Abbildung 16). Ab dem vierten Tag der Inkubation waren fünf von 12 (41,7 %) der Braunglas-Proben kontaminiert. (Abbildung 17). Von diesen fünf Proben wurden vier bei Raumtemperatur gelagert (80 %).

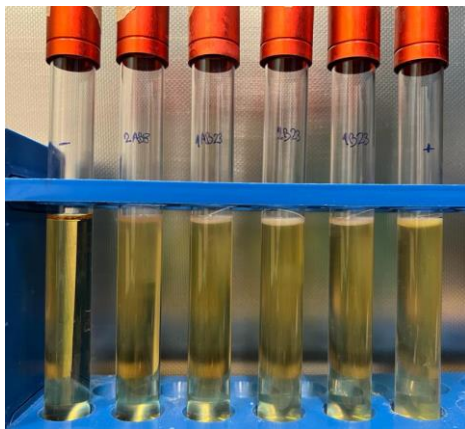


ABBILDUNG 16: Braunglas-Proben nach 4 Wochen Anwendung; Tag 3 der Inkubation

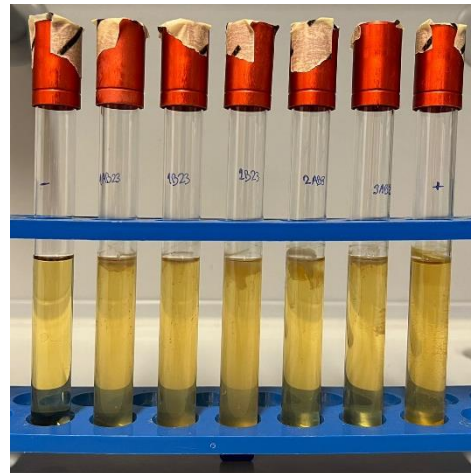


ABBILDUNG 17: Braunglas-Proben nach 4 Wochen Anwendung; Tag 15 der Inkubation

Dies deutet darauf hin, dass eine Lagerung bei Raumtemperatur für mehr Keimbelastung sorgt. Allerdings spielt dieser Zusammenhang bei längerer Anwendungsdauer keine Rolle mehr.

Die acht- und 12-wöchigen Proben zeigten dieselben Ergebnisse. Bereits nach einem Tag der Inkubation wiesen 100% der Braunglas-Proben eine Keimbelastung auf (Abbildung 18 und 19).



ABBILDUNG 18: Braunglas-Proben nach 8 Wochen Anwendung; Tag 14 der Inkubation



ABBILDUNG 19: Braunglas-Proben nach 12 Wochen Anwendung; Tag 14 der Inkubation

Im Gegensatz dazu blieben auch bei dieser Methode alle Proben im Novelia®-Gebinde über einen Anwendungszeitraum von 28, 56 und 84 Tagen kontaminationsfrei (Abbildung 20).

Es wurde kein Keimwachstum festgestellt und somit entsprechen diese Proben der Prüfung auf Sterilität nach europäischem Arzneibuch.

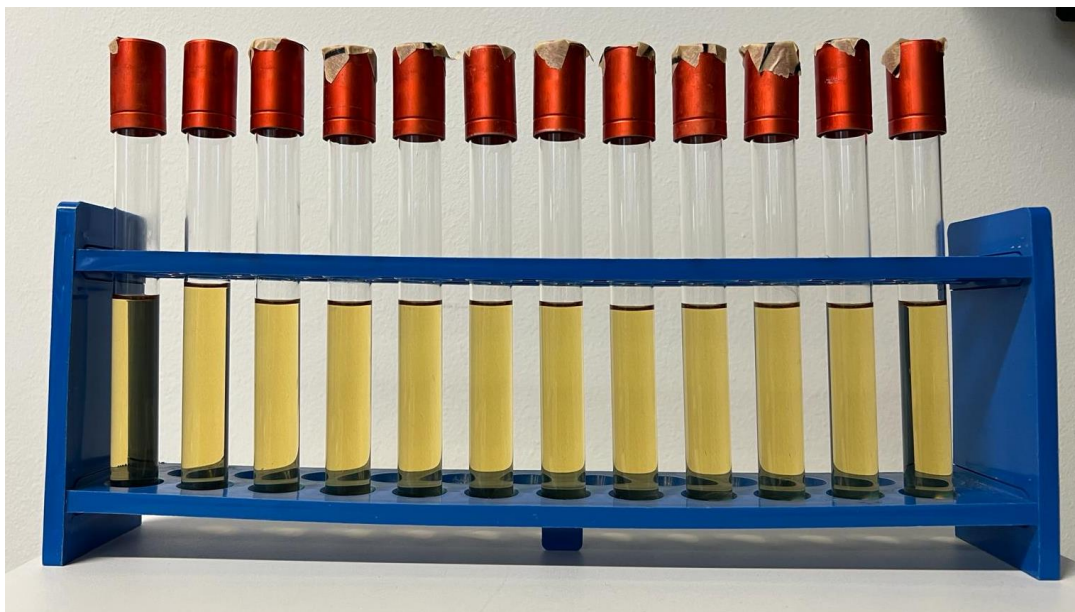


ABBILDUNG 20: Novelia®-Proben nach 12 Wochen Anwendung; Tag 14 der Inkubation

4.1. Ergebnisse des TSIT

Nach drei Tagen Inkubation war die positive Referenzprobe im Novelia®-Packmittel deutlich getrübt, während die anderen beiden Novelia®-Proben (gelagert bei Raumtemperatur und im Kühlschrank) so klar wie die negativen Referenzproben (gelagert im Kühlschrank) blieben (Abbildung 21).



ABBILDUNG 21: Novelia®-Proben während des „tip seal integrity test“. Von links nach rechts: negative Referenz, Probe gelagert bei 4 °C, Probe gelagert bei 23 °C, positive Referenz (trüb).

In den Braunglas-Proben war die Trübung schlecht erkennbar. Sowohl in den Gebinden, die nur geschüttelt wurden, als auch in den Gebinden, bei denen der Konus betätigt worden war, waren Flocken zu sehen. Diese unterschieden sich deutlich von der negativen Referenz.

Die Ergebnisse blieben an Tag vier und fünf der Inkubation unverändert.

Folglich waren 0% der Novelia®-Proben und 100% der Braunglas-Proben durch die Kontaminationsstudie TSIT2 mit 10x Challenge kontaminiert.

4.2. Ergebnisse der chemischen Analytik

Der Gehalt an Atropinsulfat in den wässrigen Augentropfen wurde bei den Chargen, welche für die Direktbeschickungsmethode verwendet wurden, während des jeweiligen Anwendungszeitraums von 4, 8 beziehungsweise 12 Wochen mittels HPLC (Shimadzu, Japan) untersucht, um die chemische Stabilität des Wirkstoffs zu untersuchen.

Aufgrund der Anwendungssimulation wurde auf die Messung des Startgehaltes verzichtet; der Startwert wurde im Sinne des SOP mit 0,01% Atropinsulfat als 100%-Richtwert definiert.

Die dargestellten Chargen wurden mit jeweils derselben Stammlösung hergestellt, es handelt sich also um dasselbe Produkt in verschiedenen Packmitteln. Die dargestellten Mittelwerte ergaben sich durch die Mittelung der Werte der drei Chargen und sind

daher für die verschiedenen Packmittel und Lagerungsbedingungen vergleichbar, da es sich um dasselbe Produkt handelt.

In Abbildung 22-27 ist der ermittelte Wirkstoffgehalt nach Anwendung über 4 Wochen (Abbildung 22 und 25), 8 Wochen (Abbildung 23 und 26) beziehungsweise 12 Wochen (Abbildung 24 und 27) dargestellt.

4.2.1. Aseptisch hergestellte Proben

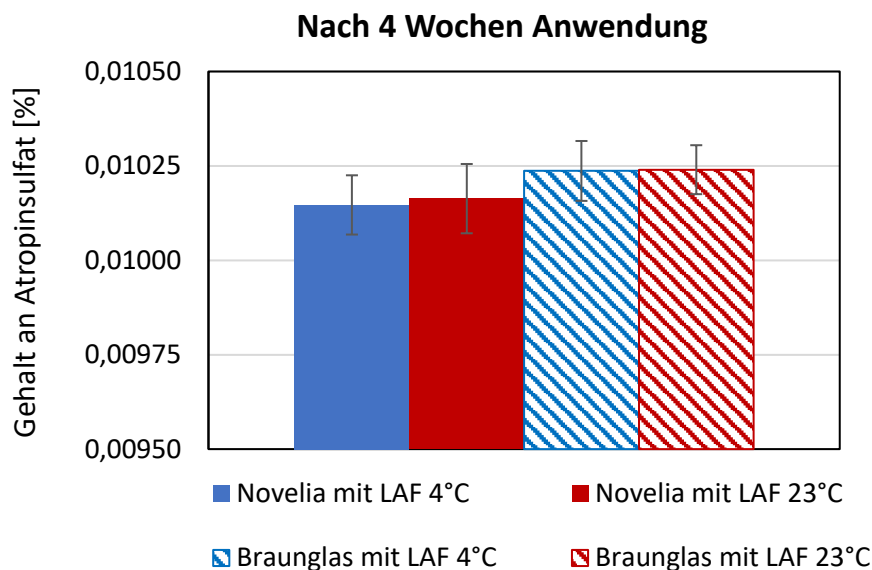


ABBILDUNG 22: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 4 Wochen täglicher Anwendung nach aseptischer Herstellung ($n=3$, $MW \pm SD$).

Bei Produkten mit aseptischer Herstellung war nach vier Wochen Anwendung keinerlei Unterschied im Wirkstoffgehalt feststellbar (Abbildung 22, $p>0,05$, gepaarter t-Test). Bei jenen Proben, die über acht Wochen verwendet wurden, war bei den Proben im Braunglas ein geringerer Gehalt feststellbar (Abbildung 23, $p<0,05$, gepaarter t-Test), bei dem es sich jedoch um eine methodische Schwankung handeln dürfte. Bei Produkten, die über zwölf Wochen verwendet wurden, war dieser Packmittel-Effekt nicht exakt reproduzierbar. Nach 12 Wochen Anwendung war der Wirkstoffgehalt in beiden Packmitteln (Braunglas und Novelia®) nach Lagerung bei 4 °C etwas höher als bei 23 °C Lagertemperatur (Abbildung 24, gepaarter t-Test, Signifikanz aber nur für Novelia®).

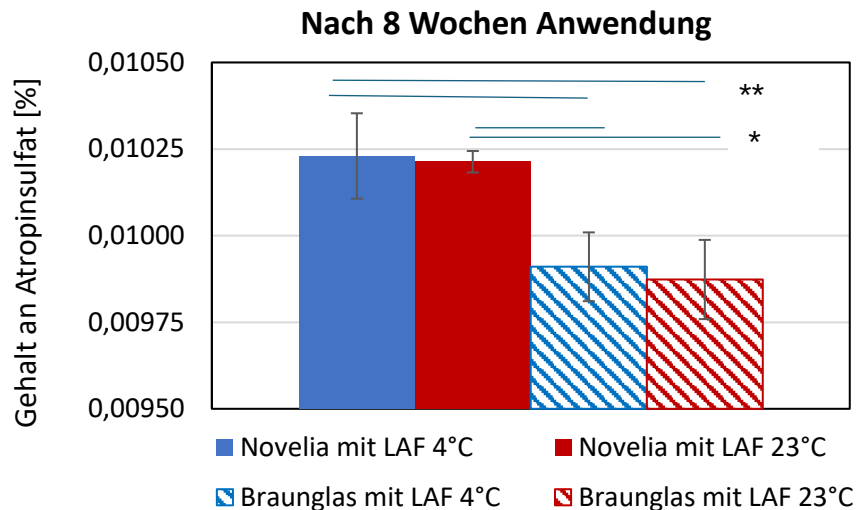


ABBILDUNG 23: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 8 Wochen täglicher Anwendung nach aseptischer Herstellung ($n=3$, $MW \pm SD$).

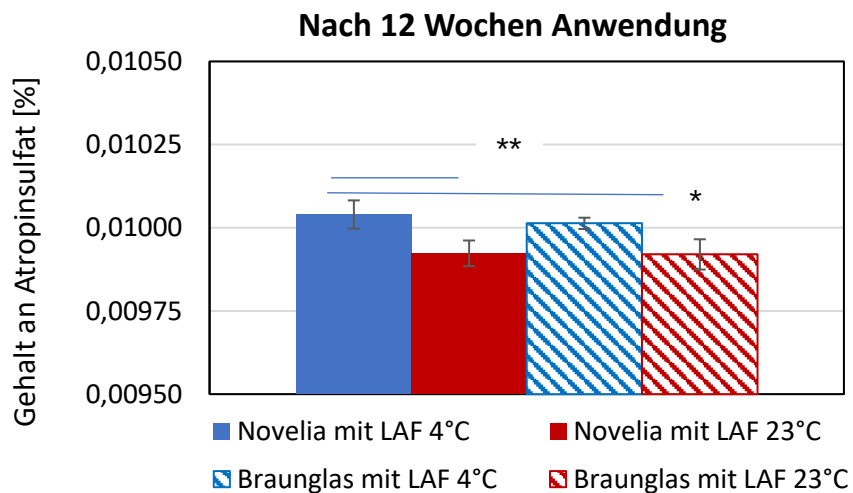


ABBILDUNG 24: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 12 Wochen täglicher Anwendung nach aseptischer Herstellung ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.2.2. Nicht aseptisch hergestellte Proben (Positivkontrolle)

Die analytische Vorgehensweise wurde beibehalten und wie in Punkt 4.2.1. für die aseptisch hergestellten Proben beschrieben durchgeführt. Jedoch wurden die nicht aseptisch hergestellten Proben außerhalb des LAF hergestellt; ansonsten blieb das SOP gleich und es wurde ein Sterilfilter benutzt.

Es sollte an dieser Stelle betont werden, dass die unsteril hergestellten Proben aus exakt derselben Stammlösung hergestellt wurden wie die steril hergestellten; die gezeigten Mittelwerte sind daher ebenfalls mit den oben gezeigten Proben jeweils nach 4, 8 und 12 Wochen vergleichbar.

Nach 4 Wochen Anwendung zeigte sich hier ebenfalls, dass der Wirkstoffgehalt weitgehend stabil war; eine einzelne statistische Abweichung für höhere Werte in Braunglas bei 4 °C wurde als Zufallsbefund bzw. analytische Abweichung eingeordnet (Abbildung 25).

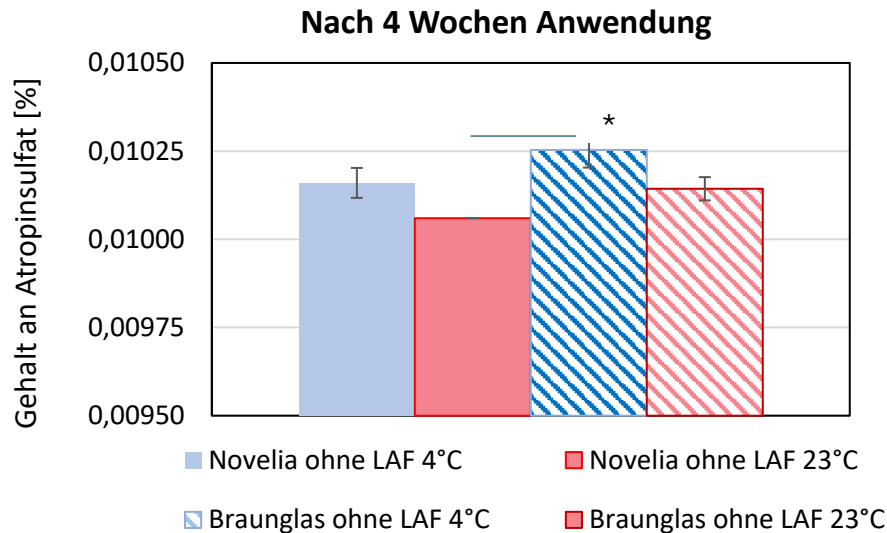


ABBILDUNG 25: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 4 Wochen täglicher Anwendung ohne aseptische Herstellung ($n=3$, $MW \pm SD$).

Nach 8 Wochen Anwendung war wie bei den aseptisch hergestellten Proben ein Trend zu höherem Wirkstoffgehalt in Novelia® zu sehen (Abbildung 26, $p<0,01$, gepaarter t-Test), sowie ein etwas stärkerer Trend zum Einfluss der Lagertemperatur, jedoch mit $p>0,05$.

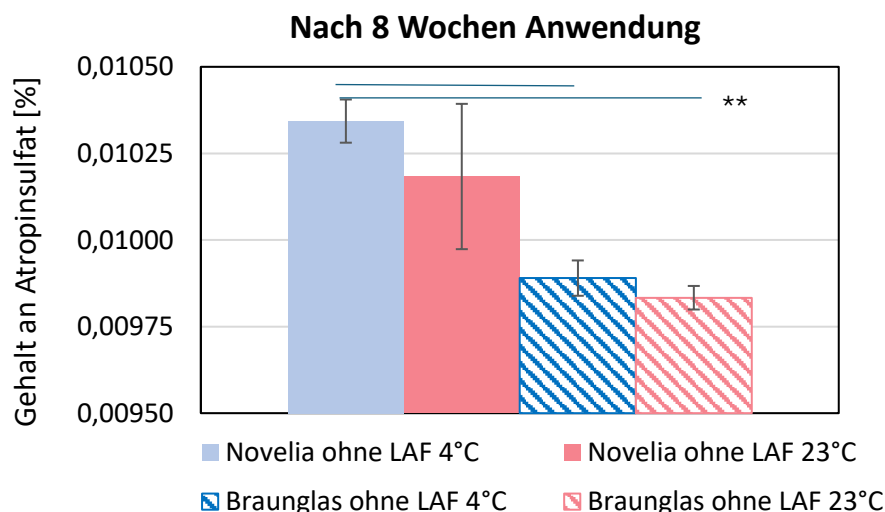


ABBILDUNG 26: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 8 Wochen täglicher Anwendung ohne aseptische Herstellung ($n=3$, $MW \pm SD$).

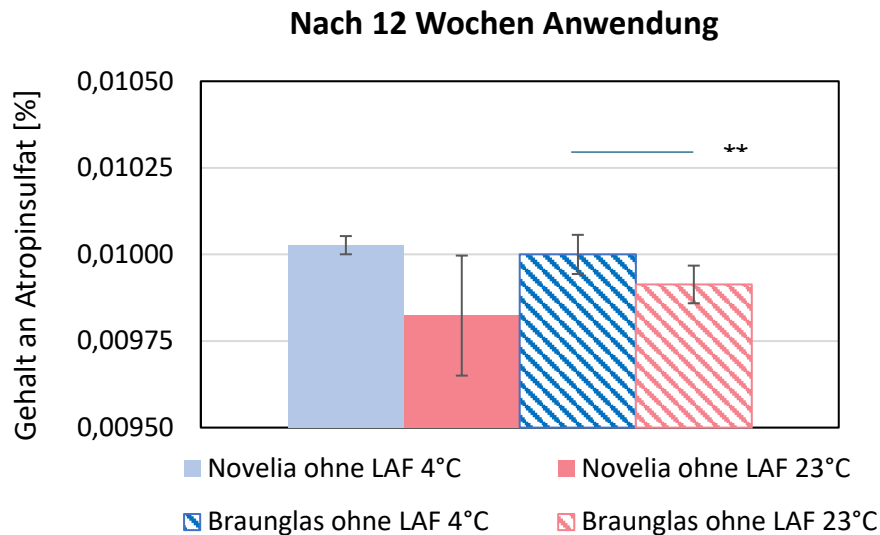


ABBILDUNG 27: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01 % nach 12 Wochen täglicher Anwendung ohne aseptische Herstellung ($n=3$, $MW \pm SD$).

Nach 12 Wochen Anwendung war, wie auch bei den aseptisch hergestellten Proben, ein Trend zu höherem Wirkstoffgehalt bei kühler Lagerung zu sehen, jedoch nur mit $p < 0,01$ im Fall von Braunglas (Abbildung 27).

Die vorliegenden Schwankungen lagen ungeachtet der statistischen Signifikanz in einem sehr niedrigen Prozentbereich (unter 2% des Sollgehalts an Atropinsulfat). Daher ist davon auszugehen, dass die untersuchten Augentropfen in Novelia®-Packmitteln unter den vorliegenden Bedingungen als mikrobiell sicher und wirksam in Bezug auf den Gehalt an Atropinsulfat einzustufen sind. Eine gekühlte Lagerung sollte dennoch empfohlen werden, um einen chemischen Abbau des Wirkstoffs maximal einzudämmen.

Die Untersuchung der chemischen Stabilität von Atropinsulfat zeigte, dass der Zielwirkstoffgehalt sowohl bei Lagerung im Kühlschrank als auch bei Raumtemperatur während des gesamten Beobachtungszeitraums von 12 Wochen um 0,01% lag (Schwankungsbreite: $\pm 0.0002\%$, keine Abbauprodukte detektierbar).

5. Diskussion

Die in dieser Arbeit beschriebenen magistral hergestellten 0,01%igen Atropinsulfat-Augentropfen zeigten in sterilen kontaminationsfreien Packmitteln (Novelia®) ohne Zusatz von Konservierungsmitteln mikrobielle Stabilität nach Ph.Eur. sowie zufriedenstellenden Wirkstoffgehalt von $0,01 \pm 0.0002\%$ über 12 Wochen Anwendung unabhängig von der Lagerungstemperatur, wobei etwas höherer Wirkstoffgehalt nach gekühlter Lagerung sichtbar war (100% Wirkstoffgehalt nach 12 Wochen Anwendung und Lagerung bei 4 °C vs. 99% Wirkstoffgehalt nach 12 Wochen Anwendung und Lagerung bei 23 °C). Es ist daher generell eine gekühlte Lagerung vorzuziehen, wobei

etwaige Unterbrechungen in der Anwendungspraxis durch PatientInnen vertretbar erscheinen.

Ähnliche Ergebnisse konnten in verschiedenen Studien (1, 3-4) beobachtet werden. Allerdings wurde in den meisten der bisher durchgeführten Studien nicht die Stabilität nach Anbruch in Betracht gezogen, sondern lediglich die Stabilität nach Herstellung. Außerdem gibt es kaum Daten zur mikrobiellen Stabilität bei magistral hergestellten Atropinsulfat-Augentropfen unter Verwendung direkt hergestellter Lösungen und deren Verdünnungen, oft werden Fertigprodukte verdünnt.

Beispielsweise führten Jumpei Saito et al. (4) 2019 eine Studie durch, deren Ziel es war, die physikalische, chemische und mikrobiologische Stabilität von verdünnten Atropinsulfat-Augentropfen über einen Zeitraum von sechs Monaten nachzuweisen. Dabei wurden Konzentrationen von 0,1 bis 5,0 mg/mL verwendet, die im Unterschied zu der Studie in dieser Arbeit, ausgehend von einem Fertigprodukt (Nitten Atropine Ophthalmic Solution 1%) verdünnt wurden. Die Herstellung erfolgte über eine Sterilfiltration und aseptischen Abfüllprozess in Polyethylen-Flaschen (n=6), welche bei 5 °C und bei 25 °C über einen Zeitraum von sechs Monaten gelagert wurden. An Tag 0, 14, 28 und jeden Monat wurde dann der pH-Wert, die Osmolalität und der Atropinsulfatgehalt mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie gemessen. Der Gehalt an Atropinsulfat blieb in den sechs Chargen in einem Bereich von $\pm 5\%$ des Ausgangswertes (90-110% der Ausgangskonzentrationen). Die Osmolalität (285 mOsm/kg) und der pH-Wert (5,88) blieben ebenfalls konstant. Es wurden keine Schwankungen in den Lösungseigenschaften (Kristallisation, Verfärbung) festgestellt. Die Sterilität wurde mit einer Membranfiltermethode überprüft. Es konnte keine mikrobielle Verunreinigung festgestellt werden. Schlussfolgernd wird beschrieben, dass in dieser Studie Atropinsulfat-Augentropfen in einer Konzentration von 0,1 bis 5,0 mg/ml, verdünnt mit 0,9% NaCl, die in Polyethylen-Augentropfflaschen aufbewahrt wurden, physiologisch stabil waren und dass während der sechsmonatigen experimentellen Beobachtung keine offensichtliche Veränderung der physikalischen Eigenschaften festgestellt wurde. Aseptische Bedingungen bei der Herstellung von Atropinsulfat-Augentropfen sollten eingehalten werden (4).

In einer weiteren Studie von Wongwirawat et al. 2022 (1) wurde auch die Anbruchstabilität von Atropinsulfat-Augentropfen in Betracht gezogen. Die Proben wurden mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt, wobei eine Atropinsulfat-Injektionslösung verwendet wurde. Vorteile der Verwendung einer Atropinsulfat-Injektionslösung (im Vergleich zu Fertigprodukten von Atropinsulfat-Augentropfen) für die Herstellung von niedrigdosierten Atropinsulfat-Augentropfen werden beschrieben: leichte Erhältlichkeit in Gesundheitseinrichtungen, einfache Dosierbarkeit und Handhabung sowie der Verzicht auf Konservierungsmittel. Die Proben wurden bei Raumtemperatur und im Kühlschrank gelagert und einer täglichen Anwendungssimulation unterzogen (daily dripping). Auch hier konnten keine Bakterien, Pilze oder Schwebstoffe festgestellt werden, und auch der Wirkstoffgehalt war nach 12 Wochen stabil (1).

Um eine mikrobielle Kontamination in Mehrdosenbehältnissen auszuschließen, ist es auch möglich, den Formulierungen ein Konservierungsmittel zuzusetzen. Da diese jedoch potenziell mit unerwünschten Wirkungen einhergehen, wird versucht, darauf zu verzichten. In einer 2020 publizierten Studie von Baptiste Berton et al. (3) wurde die Stabilität von 0,1 mg/ml Atropinsulfat-Augenzubereitungen mit und ohne Konservierungsmittel in Mehrdosenbehältnissen evaluiert. Dabei wurde Cetrimid verwendet, das eine ähnliche Wirksamkeit wie Benzalkoniumchlorid aufweist. Die Proben wurden 180 Tage ungeöffnet bei 25 °C gelagert und an sechs Tagen wurde eine Anwendungssimulation durchgeführt. Beide Formulierungen mit und ohne antimikrobielle Konservierungsmittel erwiesen sich bei Lagerung in LDPE-Flaschen („low-density polyethylene“; Polyethylen niedriger Dichte) für 6 Monate bei 25 °C als physikalisch-chemisch stabil und zeigten eine identische mikrobielle Haltbarkeit.

Die vorliegenden Daten stimmen daher mit den bisherigen Studienergebnissen zur magistralen Herstellung niedrigdosierter Atropinsulfat-Augentropfen überein, was die Lagerstabilität bzw. Aufbrauchsfrist nach Anbruch angeht. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie mit einem für den österreichischen Apothekenbetrieb spezifischen Arbeitsablauf sowie entsprechenden Packmitteln und Probenvolumen.

6. Conclusio

Magistral hergestellte Augentropfen haben in Österreich in der Behandlung von ophthalmologischen Krankheiten einen vergleichsweise hohen Stellenwert. Eine der Einschränkungen ist jedoch die Frage der Haltbarkeit jener Arzneiformen. Um diese zu gewährleisten, werden oft Konservierungsmittel zugesetzt oder Einzeldosenbehältnisse verwendet. Konservanzien können jedoch zu unerwünschten Wirkungen und zu Allergisierung führen. Da Atropinsulfat-Augentropfen zur Eindämmung einer Myopieprogression bei Kindern als Langzeittherapie zum Einsatz kommen, ist es erforderlich, dass diese über einen langen Zeitraum nach Anbruch mikrobiell und chemisch stabil bleiben, um eine sichere Patientenversorgung gewährleisten zu können.

Im Apothekenalltag werden in der magistralen Herstellung von Augentropfen üblicherweise Mehrdosenbehältnisse aus Braunglas verwendet, jedoch nimmt der Gebrauch von Novelia®-Gebinden insbesondere in Bezug auf Atropinsulfat-Augentropfen zur Anwendung bei Kindern immer mehr zu.

In dieser Studie galt es herauszufinden, welche Anbruchstabilität bei Nutzung von „Novelia®“-Packmitteln bei unkonservierten magistral hergestellten Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% erzielt werden kann. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine gekühlte Lagerung einen Vorteil bezüglich mikrobieller und chemischer Stabilität während der täglichen Anwendung bringt.

Dabei zeigte sich, dass die Formulierungen im klassischen sterilen Braunglas lediglich 14 Tage keimfrei blieben, was die Vorgaben der Ph.Eur. für unkonservierte Augentropfen bestätigt (Verwendbarkeit auf 24 Stunden ab Anbruch limitiert). In Novelia®-Packmitteln blieben die Formulierungen trotz des Verzichts auf

Konservierungsmittel über einen Zeitraum von 84 Tagen nach Anbruch bei täglicher Anwendung keimfrei. Ausreichende chemische Stabilität des Wirkstoffs wurde in beiden Packmitteln erzielt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass magistral hergestellte Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% ohne Zusatz von Konservierungsmitteln in sterilen kontaminationsfreien Packmitteln (Novelia®) mikrobielle Stabilität nach Ph.Eur. und einen zufriedenstellenden Wirkstoffgehalt von $0,01\% \pm 0.0002\%$ über 12 Wochen Anwendung zeigen, wobei gekühlte Lagerung gewisse Vorteile bezüglich der chemischen Stabilität des Wirkstoffs bringt (100% bei gekühlter Lagerung vs. 99% bei Raumtemperatur nach 12 Wochen).

Die erhobenen Daten können dazu beitragen, die Sicherheit und Wirksamkeit dieses häufig bei Kindern eingesetzten magistral hergestellten Arzneimittels korrekt einzuschätzen. Aus den oben genannten Gründen ist der Einsatz von kontaminationsfreien Packmitteln bei Atropinsulfat-Augentropfen zur Anwendung bei pädiatrischen Patienten als Goldstandard zu empfehlen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie eines Auges; abgedruckt mit Genehmigung vom Deutschen Apotheker Verlag nach Kircher et al. (7).....	2
Abbildung 2: Struktur von Atropinsulfat (14).....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung mikrobiologischer Integritätstests; abgedruckt mit Genehmigung von Elsevier nach Vasdev et al. (11).....	12
Abbildung 4: Aufbau des Versuchs: mikrobielle Stabilität von Atropinsulfat-Augentropfen; erstellt mit www.biorender.com	13
Abbildung 5: Überblick Studiendesign.....	15
Abbildung 6: Vergleich des Tropfengewichts in Novelia®-Packmittel und im Braunglas (n=144, MW $\pm$ SD).....	18
Abbildung 7: Gießen von Agar-Platten im Stapel; abgedruckt mit Genehmigung von Springer Verlag nach Steinbüchel et al. (25).....	20
Abbildung 8: Lagerung der Proben in Bechergläsern während Inkubation.....	21
Abbildung 9: Inkubation der Proben im Wärmeschrank.....	21
Abbildung 10: Durchführung des „tip seal integrity test“.....	23
Abbildung 11: Vorbereitung des „tip seal integrity test“.....	23
Abbildung 12: Probe 2B23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) auf dem Nährboden für Pilze.....	23
Abbildung 13: Probe 2B23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) auf dem Nährboden für Bakterien.....	23
Abbildung 14: Proben 2AB23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) Und 3AB23 (Charge 3, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur) auf Nährboden für Pilze.....	24
Abbildung 15: Proben 1AB8 (Charge 1, Braunglas, Lagerung im Kühlschrank; oben links), 2B23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung im Kühlschrank; oben Mitte), 3B23 (Charge 3, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur; oben rechts), 1B23 (Charge 1, Braunglas Lagerung bei Raumtemperatur; unten links), 2AB23 (Charge 2, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur; unten Mitte), 3AB23 (Charge 3, Braunglas, Lagerung bei Raumtemperatur; unten rechts) auf Nährboden für Pilze.....	24

Abbildung 16: Braunglas-Proben nach 4 Wochen Anwendung; Tag 3 der Inkubation.....	27
Abbildung 17: Braunglas-Proben Nach 4 Wochen Anwendung; Tag 15 der Inkubation.....	27
Abbildung 18: Braunglas-Proben nach 8 Wochen Anwendung; Tag 14 der Inkubation.....	27
Abbildung 19: Braunglas-Proben nach 12 Wochen Anwendung; Tag 14 der Inkubation	28
Abbildung 20: Novelia®-Proben nach 12 Wochen Anwendung; Tag 14 der Inkubation	28
Abbildung 21: Novelia®-Proben während des „tip seal integrity test“. Von links nach rechts: negative Referenz, Probe gelagert bei 4 °C, Probe gelagert bei 23 °C, positive Referenz (trüb).....	29
Abbildung 22: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 4 Wochen täglicher Anwendung nach aseptischer Herstellung (n=3, MW ± SD).....	30
Abbildung 23: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 8 Wochen täglicher Anwendung nach aseptischer Herstellung (n=3, MW ± SD).....	31
Abbildung 24: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 12 Wochen täglicher Anwendung nach aseptischer Herstellung (n=3, MW ± SD).....	31
Abbildung 25: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 4 Wochen täglicher Anwendung ohne aseptische Herstellung (n=3, MW ± SD).....	32
Abbildung 26: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 8 Wochen täglicher Anwendung ohne aseptische Herstellung (n=3, MW ± SD).....	32
Abbildung 27: Gehalt an Atropinsulfat in Atropinsulfat-Augentropfen 0,01% nach 12 Wochen täglicher Anwendung ohne aseptische Herstellung (n=3, MW ± SD).....	33

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Etikettenbeschriftung der Atropinsulfat-Augentropfenflaschen.....	16
Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchung auf mikrobielle Stabilität mittels Ausplattieren.....	26

9. Literaturverzeichnis:

1. Wongwirawat N, Kuchonthara N, Boontanomwong S, Pongpirul K. Hospital-prepared low-dose atropine eye drops for myopia progression control using atropine sulfate injection diluted in normal saline and lubricants. BMC Res Notes. 5. November 2022;15(1):342.
2. Myles W, Dunlop C, McFadden SA. The Effect of Long-Term Low-Dose Atropine on Refractive Progression in Myopic Australian School Children. J Clin Med. 1. April 2021;10(7):1444.
3. Berton B, Chennell P, Yessaad M, Bouattour Y, Jouannet M, Wasiak M, u. a. Stability of Ophthalmic Atropine Solutions for Child Myopia Control. Pharmaceutics. 17. August 2020;12(8):781.
4. Saito J, Imaizumi H, Yamatani A. Physical, chemical, and microbiological stability study of diluted atropine eye drops. J Pharm Health Care Sci. 2019;5:25.
5. Kircher Wolfgang. Arzneiformen richtig anwenden. 4. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2016. 483 S.
6. Mäder K, Weidenauer U. Innovative Arzneiformen - ein Lehrbuch für Studium und Praxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2010. S. 323-344
7. Kircher Wolfgang, Tost Frank, Walz Lydia. Augenarzneimittel - Therapie, Anwendung und Beratung. 1. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2012. S. 1-7
8. Voigt Rudolf. Pharmazeutische Technologie - Für Studium und Beruf. 10. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2006. S.497-503
9. Peuke Claudia, Dreeke-Ehrlich Martina. Rezeptur - Leitlinien für die Herstellung. 4. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2014. S. 291-312
10. Schöffling Ursula. Arzneiformenlehre - Ein Lehrbuch der Galenik für Theorie und Praxis. 5. Auflage. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2009. S.465-484

11. Vasdev N, Chaudhari N, Polaka S, Rajpoot K, Gondaliya P, Sayyed AA, u. a. Current progress in preservative-free topical ophthalmic formulations. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 1. Januar 2023;79:103996.
12. Krieglstein GK. Konservanzen in Ophthalmika. Ophthalmologe. November 2012;109(11):1062–3.
13. Egyed C, Kreuzinger M. Ophthalmica - Zubereitungen zur Anwendung am Auge - Kompendium magistraler ophthalmologischer Rezepturen. 1. Auflage. Wien: Gerin Druck GmbH, Wolkersdorf; 2022.
14. Arzneibuch [Internet]. [zitiert 12. Oktober 2023]. Verfügbar unter: https://arzneibuch.at/arzneibuch/arzneibuch/start.xav?lang=at#__arzneibuch__%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%27eab_mono-2589%27%5D__1697111101489
15. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 6. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 1991. S. 274
16. Lipp HP, Beck Th, Chririak U, Melhorn A, Morath B, Schmitt B, u. a. Arzneistoff-Profile - Basisinformation über arzneiliche Wirkstoffe. 36. Eschborn: Govi (Imprint) in der Avoxa - Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH; 2023. S.1-6
17. Pichler E, Pichler L. Heilt Atropin die kindliche Myopie? Paediatr Paedolog. Februar 2020;55(1):28–9.
18. Sen S, Yadav H, Jain A, Verma S, Gupta P. Effect of atropine 0.01% on progression of myopia. Indian J Ophthalmol. September 2022;70(9):3373–6.
19. Schaeffel F. Biologische Mechanismen der Myopie. Ophthalmologe. Januar 2017;114(1):5–19.
20. Kreft B, Wohrab J. Ophthalmika. Im Fokus. 15007-018-1718-4.pdf [Internet]. S. 16-18. [zitiert 18. Dezember 2023]. verfügbar unter: <https://link-springer-com.uaccess.univie.ac.at/content/pdf/10.1007/s15007-018-1718-4.pdf>
21. Lagrèze WA, Joachimsen L, Schaeffel F. Gegenwärtiger Stand der Empfehlungen zur Minderung von Myopieprogression. Ophthalmologe. Januar 2017;114(1):24–9.
22. Joachimsen L, Lagrèze WA. Therapieoptionen bei progredienter Myopie im Kindesalter. Ophthalmologe. Juni 2019;116(6):518–23.
23. Marx D, Bartsch T, Wohnhas R, Zwisler W. Microbial integrity test for preservative-free multidose eyedroppers or nasal spray pumps. Pharm Ind. 2019; S.1247-1252
24. Kramer A. Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung - Qualitätssicherung der Hygiene und Industrie, Pharmazie und Medizin. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008. 984 S.

25. Steinbüchel A, Oppermann-Sanio FB, Ewering C, Pötter M. Mikrobiologisches Praktikum - Versuche und Theorie [Internet]. 3. Auflage. Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2021 [zitiert 18. Januar 2024]. S. 308. verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63235-2>