

# **Systematische Untersuchungen zum Hygienerisiko nicht konservierter Cremes**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Carsten Döhling  
aus Buchen

Tübingen  
2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

23.02.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rolf Daniels

2. Berichterstatter:

PD Dr. Karl G. Wagner

*Für meine Familie*

## **DANKSAGUNG:**

Ich bedanke mich bei der Deutschen Homöopathie-Union DHU-Arzneimittel GmbH & Co. KG (D-Karlsruhe), der WALA Heilmittel GmbH (D-Bad Boll/Eckwälden) und der Weleda AG (D-Schwäbisch Gmünd) für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen.

Bei den Betreuern der Kooperation:

Frau Anette Greco

Frau Claudia Suhr

Herr Dr. Joachim Herrmann

bedanke ich mich für die wissenschaftlichen Impulse, die guten und anregenden Diskussionen und die stets angenehme Atmosphäre bei den Projektbesprechungen.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits als Tagungsbeitrag veröffentlicht:

**Döhling, Carsten H. L. & Daniels, Rolf** – “Recovery of germs after surface contamination of aqueous woolalcohol ointment” – 7<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Valletta/Malta, 08.-11.03.2010 (Poster)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Emulsionen</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>Gele</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>Cremes</b> .....	<b>7</b>
2.3.1	Lipophile Cremes.....	8
2.3.2	Hydrophile Cremes .....	9
<b>2.4</b>	<b>Verpackung halbfester Zubereitungen</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5</b>	<b>Mikroorganismen</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6</b>	<b>Herstellung unter aseptischen Bedingungen</b> .....	<b>13</b>
<b>2.7</b>	<b>Konservierungsmittel</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8</b>	<b>Prüfung auf ausreichende Konservierung</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>17</b>
3.1.1	Substanzen.....	17
3.1.2	Wasser.....	19
3.1.3	Testkeime.....	19
<b>3.2</b>	<b>Rezepturen</b> .....	<b>21</b>
3.2.1	Lipophile Cremes.....	21
3.2.1.1	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe .....	21
3.2.1.2	Wollwachsalkoholfreie W/O-Creme .....	22
3.2.2	Hydrophile Cremes .....	23
3.2.2.1	Wasserhaltige hydrophile Salbe.....	23
3.2.2.2	Nichtionische hydrophile Creme (NHC) .....	23

---

3.2.3	Hydrophile Basisemulsion.....	24
3.2.4	Hydrogele .....	25
3.2.4.1	Guar-Gel.....	25
3.2.4.2	Hypromellose-Gel .....	26
<b>3.3</b>	<b>Aseptische Herstellung der Cremes und Emulsionen.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4</b>	<b>Sterilisation .....</b>	<b>27</b>
3.4.1	Sterilisation bei trockener Hitze.....	27
3.4.2	Dampfsterilisation .....	28
<b>3.5</b>	<b>Herstellung der Inocula .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6</b>	<b>Beurteilung des Keimwachstums.....</b>	<b>29</b>
3.6.1	Keimzahlbestimmung.....	29
3.6.2	Prüfung auf Sterilität .....	30
<b>3.7</b>	<b>Untersuchungsstrategie zur Keimzahlentwicklung in nicht sterilen Zubereitungen .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8</b>	<b>Untersuchungsstrategie zum Eindringen von Keimen in sterile halbfeste Zubereitungen .....</b>	<b>30</b>
<b>3.9</b>	<b>Untersuchungsstrategien zur Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus der Primärverpackung .....</b>	<b>32</b>
3.9.1	Untersuchungsstrategie zur Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Einmalspritzen.....	33
3.9.2	Untersuchungsstrategie zur Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Tuben .....	34
<b>3.10</b>	<b>Untersuchung des Durchwachsens von Keimen durch Ölphasen.....</b>	<b>34</b>
<b>3.11</b>	<b>Test auf Varianzhomogenität .....</b>	<b>37</b>

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Modellformulierungen</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus einer Primärverpackung</b> .....	<b>41</b>
4.2.1	Verwendete Primärpackmittel .....	42
4.2.2	Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Spritzen .....	43
4.2.3	Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Tuben .....	45
4.2.3.1	Entnahme nicht konservierter Cremes.....	45
4.2.3.2	Entnahme konservierter Cremes .....	47
<b>4.3</b>	<b>Durchwachsen von Keimen durch Ölschichten</b> .....	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Keimwachstum in lipophilen Cremes</b> .....	<b>52</b>
4.4.1	Methodenvalidierung zur Membranfiltration .....	53
4.4.1.1	Einfluss von Polysorbat 80 auf das Keimwachstum auf Agarplatten.....	53
4.4.1.2	Reduktion der Anzahl der Spülvorgänge bei der Membranfiltration .....	55
4.4.2	Keimzahlentwicklung in der Wasserphase.....	57
<b>4.5</b>	<b>Einwachsen von Keimen in halbfeste Zubereitungen</b> .....	<b>60</b>
4.5.1	Entwicklung der Untersuchungsstrategie zum Einwachsen von Keimen in halbfeste Zubereitungen .....	60
4.5.2	Einwachsen von Keimen in Hydrogele.....	66
4.5.3	Einwachsen von Keimen in Emulsionen .....	67
4.5.4	Einwachsen von Keimen in Cremes .....	68
<b>5</b>	<b>ABSCHLUSSDISKUSSION</b> .....	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURNACHWEIS</b> .....	<b>81</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alu	Aluminium
ca.	circa
C. a.	Candida albicans
Cand. alb.	Candida albicans
CaSo	Caseinpepton-Sojamehlpepton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex
desinf.	desinfiziert
d. h.	das heißt
E. c.	Escherichia coli
E. coli	Escherichia coli
EAB	Europäisches Arzneibuch
evtl.	eventuell
GG	Guar-Gel
HB	Hydrophile Basisemulsion
HPMC	Hypromellose
KBE	Kolonien bildende Einheiten
KBT	Konservierungsmittel-Belastungs-Test Prüfung auf ausreichende Konservierung Ph. Eur. 5.1.3
kons.	konserviert
NHC	Nichtionische hydrophile Creme
NRF	Neues Rezepturformularium des Deutschen Arzneimittelcodex
O/W	Emulsionstyp Öl in Wasser
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea Europäisches Arzneibuch
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
U/min	Umdrehungen pro Minute
W/O	Emulsionstyp Wasser in Öl
WAS	Wollwachsalkoholsalbe
WHS	Wasserhaltige hydrophile Salbe
WWAS	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe

### **Besondere Hinweise**

Die Fehlerbalken in den Abbildungen geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die mikrobiologische Qualität von Arzneimitteln ist ein wichtiger Faktor, um deren Unbedenklichkeit zu gewährleisten. Dies gilt im Besonderen für kutan anzuwendende Arzneimittel, da diese typischerweise auf geschädigte Haut, deren Barrierefunktion beeinträchtigt ist, aufgetragen werden. Das Europäische Arzneibuch schreibt für die mikrobiologische Qualität pharmazeutischer Zubereitungen Höchstzahlen für bestimmte Keime vor. Diese werden unterteilt (EAB 2011) in die Gesamtzahl aerober Mikroorganismen (TAMC) und die Gesamtzahl an Hefen und Schimmelpilzen (TYMC). Zubereitungen zur Anwendung auf der Haut dürfen eine maximale Keimbelastung von  $2 \cdot 10^2$  aeroben Mikroorganismen und  $2 \cdot 10^1$  Hefen und Schimmelpilzen je Gramm oder Milliliter aufweisen. Besonderes Augenmerk ist auf Zubereitungen zu legen, die Wasser enthalten, da dieses den natürlichen Lebensraum für Mikroorganismen darstellt. Um die mikrobiologische Qualität über die gesamte Laufzeit zu gewährleisten, werden häufig Konservierungsmittel zugesetzt. Die Verwendung von Konservierungsmitteln muss jedoch kritisch hinterfragt werden, da antimikrobiell wirksame Substanzen zum Teil in niedrigsten Konzentrationen bereits irritative und allergische Kontaktdermatitiden auslösen können (Brasch, Henseler et al. 1993; Schnuch 1997; Statham, Smith et al. 2010). Daher besteht häufig der Wunsch von Konsumenten und pharmazeutischen Herstellern, Produkte auf dem Markt zu haben, bei denen auf den Einsatz von Konservierungsmitteln verzichtet wird.

In der Monographie „Halbfeste Zubereitungen zur kutanen Anwendung“ (EAB 2011) wird aufgeführt: *„Die Zubereitungen können geeignete Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel, [...] enthalten“*, wonach der Einsatz von Konservierungsmitteln zwar erlaubt, jedoch nicht vorgeschrieben ist. Des Weiteren heißt es in der Monographie: *„Im Laufe der pharmazeutischen Entwicklung müssen bei halbfesten Zubereitungen zur kutanen Anwendung, die Konservierungsmittel enthalten, die Notwendigkeit des gewählten Konservierungsmittels und die ausreichende Konservierung im Hinblick auf die Anforderungen der zuständigen Behörde*

*dokumentiert werden. Eine geeignete Methode zur Prüfung und Kriterien zur Beurteilung der konservierenden Eigenschaften der Zubereitung werden unter 'Prüfung auf ausreichende Konservierung' (5.1.3) aufgeführt.*“ Dies wird vielfach von den Zulassungsbehörden so ausgelegt, dass alle Zubereitungen, unabhängig vom Zusatz von Konservierungsmitteln, die „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ bestehen müssen. Diese Prüfung ist jedoch ohne Konservierungsmittel praktisch nicht zu bestehen, da mit ihr gezeigt werden muss, dass die Zubereitung dazu in der Lage ist, hohe Keimzahlen nach der Beimpfung mit dem Inoculum schnell zu reduzieren. Die daraus resultierende Notwendigkeit zum Einsatz von Konservierungsmitteln steht jedoch im Gegensatz zu der Guideline CPMP/QWP/419/03, die fordert, auf den Einsatz von Konservierungsmitteln zu verzichten, wenn dieser nicht absolut notwendig sei. (EMEA The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products 2003) Für Hersteller homöopathischer Arzneimittel stellt die Frage der Konservierung eine besondere Herausforderung dar, weil das Homöopathische Arzneibuch (HAB 2010) für Homöopathische Salben – mit Ausnahme von Hydrogelen und hydrophilen Cremes – den Zusatz von Konservierungsmitteln nicht zulässt. Diese sehr vielfältigen, zum Teil konträren Anforderungen legen nahe, dass es differenzierter Untersuchungen zur Notwendigkeit von Konservierungsmitteln und geeigneter Methoden zur Beurteilung des Hygienierisikos halbfester Zubereitungen bedarf.

Bei einer Recherche stößt man auf diverse Tests zur Prüfung der Wirksamkeit konservierender Maßnahmen, die in Pharmakopöen beschrieben sind (USP, BP, JP) oder von Verbänden und Behörden empfohlen oder gefordert werden (Farrington, Martz et al. 1994). Genannt werden z.B. der Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CFTA) Test; der Rapid Screen (RS) Test; der Sequential Challenge (SC) Test oder der FDA Post-use Test. Diese Testmethoden ähneln in ihrer Vorgehensweise der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ Ph. Eur. Sie unterscheiden sich von dieser und untereinander lediglich in den verwendeten Teststämmen, der Zubereitungsmenge, die beimpft wird, sowie der für die Beimpfung eingesetzten Keimzahl. Alle beschriebenen Methoden basieren darauf, dass eine hohe Anzahl an Keimen möglichst gleichmäßig auf eine Probe verteilt wird und die

---

Keimzahl zu definierten Zeitpunkten in einer repräsentativen Probe bestimmt wird. Um die Keimzahlbestimmung im Vergleich zu den in den Pharmakopöen beschriebenen Methoden zu beschleunigen, werden zur schnelleren Detektion der Keime Verfahren wie Impedanz-Messung (Connolly, Bloomfield et al. 1994), ATB Biolumineszenz (Kramer, Šuklje-Debeljak et al. 2008), Cytometrie (Easter 2003) oder lineare Regression (Orth 1979) beschrieben. Keine dieser Methoden simuliert die Situation der Kontamination bei der Anwendung von halbfesten Zubereitungen, bei der Keime auf deren Oberfläche übertragen werden. Van Doorne et al. nähern sich dem mit einer Methode an, bei der Keime auf die Oberfläche von Cremes aufgetragen werden um zu prüfen, ob diese die Zubereitung durchdringen (van Doorne, Collge et al. 1998). Allerdings berücksichtigt dieses Versuchsdesign nicht die Verhältnisse, die sich durch die Primärverpackung ergeben.

Um die Situation der Entnahme einer halbfesten Zubereitung aus einer Primärverpackung und das davon ausgehende Hygienerisiko für die Zubereitung umfassend zu untersuchen, bedarf es daher einer neuen Untersuchungsmethode.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu überprüfen, wie hoch das Hygienerisiko für nicht konservierte halbfeste Zubereitungen wirklich ist, wenn diese, wie bei der Entnahme aus der Primärverpackung üblich, mit Keimen in Kontakt kommen. Dabei wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob Zubereitungen, die mit hoher mikrobiologischer Qualität hergestellt sind, auch ohne Konservierungsmittel dem Anwender eine ausreichende mikrobiologische Sicherheit bieten können.

Die Arbeit befasst sich weiter mit der Fragestellung, ob die derzeit üblichen Tests, die von den Zulassungsbehörden für Arzneimittel gefordert werden, geeignet sind, das Hygienerisiko einer Creme realistisch einzuschätzen.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Emulsionen

Emulsionen sind Systeme, die aus zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten bestehen, von denen die eine dispers in der anderen verteilt vorliegt. Eine Definition des Emulsionsbegriffes gibt die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC):

*„In einer Emulsion liegen Tropfen einer Flüssigkeit und/oder Flüssigkristalle in einer weiteren Flüssigkeit fein verteilt vor.“* (IUPAC 1972)

Aus den beiden nicht mischbaren Flüssigkeiten werden die Phasen der Emulsion gebildet. Eine Phase ist ein Bereich gleicher physikalischer und chemischer Eigenschaften. Sie ist von einer anderen Phase durch eine Grenzfläche getrennt, an der sich die Eigenschaften sprunghaft ändern. Die Phasen einer Emulsion lassen sich in eine kontinuierliche, also zusammenhängende, äußere Phase und eine disperse innere Phase, die in viele Tropfen aufgeteilt ist und damit nicht zusammenhängt, einteilen. Somit lassen sich zwei Typen von Emulsionen unterscheiden: Emulsionen, deren kontinuierliche Phase überwiegend aus Wasser besteht, werden als Öl-in-Wasser-Emulsionen (O/W) bezeichnet, solche, deren kontinuierliche Phase überwiegend aus Öl besteht, werden Wasser-in-Öl-Emulsionen (W/O) genannt.

Emulsionen sind thermodynamisch instabil (Ivanov & Kralchevsky 1997). Dies ist begründet durch die sehr ausgeprägte Zunahme der Grenzfläche zwischen den Phasen, mit der die Grenzflächenenergie proportional zunimmt, wie aus Gleichung 2-1 zu ersehen ist.

$$\Delta E = \gamma * \Delta A \qquad \text{Gleichung 2-1}$$

$\Delta E$ : Grenzflächenenergie [J]

$\gamma$ : Grenzflächenspannung [ $\text{N} * \text{m}^{-1}$ ]

$\Delta A$ : Grenzflächenzunahme [ $\text{m}^2$ ]

---

Um die Stabilität von Emulsionen zu erhöhen, muss die Grenzflächenenergie  $\Delta E$  herabgesetzt werden. Dazu werden Emulgatoren gemäß der IUPAC-Definition zugesetzt. Dies sind amphiphile Substanzen, die sich an der Grenzfläche anreichern und damit die Koaleszenz der dispersen Phase verringern.

Den beiden Phasen der Emulsionen können weitere Substanzen zugesetzt sein, die die physikalischen und chemischen Eigenschaften beeinflussen. In der Außenphase können beispielsweise Stoffe enthalten sein, welche die rheologischen Eigenschaften der Emulsion bestimmen. Weiterhin können Agenzien zugegeben sein, die die Stabilität enthaltener Wirkstoffe und die Verträglichkeit für den Anwender erhöhen. Dies können unter anderem antimikrobiell wirksame Substanzen sein, die den Verderb der Emulsionen verhindern sollen. Dem mikrobiologischen Verderb kommt eine bedeutende Rolle zu, da die Keime, neben ihrer möglichen Pathogenität, durch ihren Stoffwechsel die Eigenschaften der Emulsion verändern können (Verrips, Smid et al. 1980).

## 2.2 Gele

Gele sind elastische, biphäse Systeme, in denen eine Flüssigkeit durch ein dreidimensionales Gerüst einer Feststoffkomponente immobilisiert ist (Dörfler 2002). Die Definition des Europäischen Arzneibuches für Gele lautet: *„Gele bestehen aus gelierten Flüssigkeiten. Die Gele werden mit Hilfe geeigneter Quellmittel hergestellt.“* (EAB 2011).

Die Feststoffkomponente, die das Gerüst eines Geles bildet, lagert sich in Form netzartiger Strukturen zusammen, deren Hohlräume von der Flüssigkeit ausgefüllt werden. Die Feststoffe sind dabei kolloidal verteilt. Durch die Einlagerung der Flüssigkeit in die Netzwerkstruktur wird der Abstand der Kolloide zueinander vergrößert, es tritt also eine Quellung auf. Die gelbildenden Kolloide können anorganischer oder häufiger organischer Natur sein und sind meist den Polymeren zuzuordnen. Sie können jedoch auch aus amorphen oder kristallinen Partikeln unterschiedlicher Form gebildet sein.

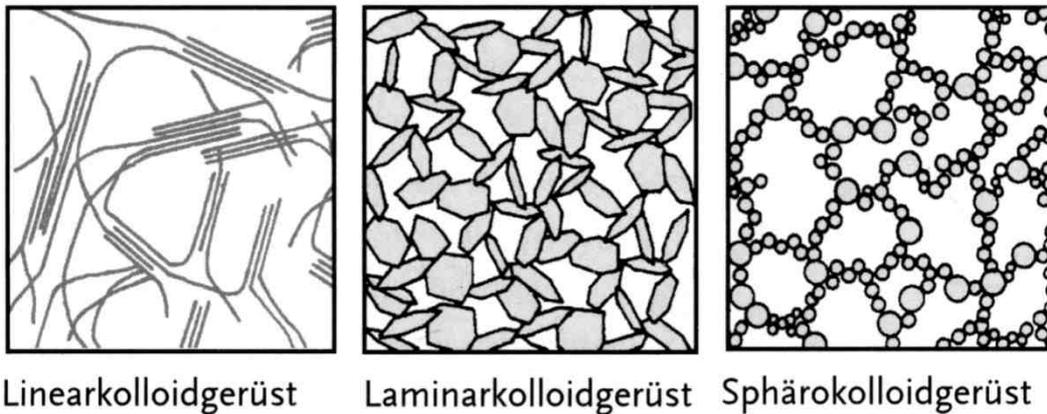


Abbildung 2-1: Kolloidgerüsttypen von Gelen nach Voigt (Voigt 2010)

Abbildung 2-1 zeigt die möglichen kolloidalen Gerüstaufbauten in Gelen. Gele mit Linearkolloidgerüst werden aus Polymeren gebildet, deren Moleküle sich abschnittsweise linear aneinander lagern. Diese Form des Gelaufbaus ist für Cellulosederivate typisch. Gele mit Laminarkolloidgerüst sind aus Plättchen oder Schichten aufgebaut, die in Bentonidgelen und in flüssigkristallinen Strukturen zu finden sind. Gele mit Sphärokolloidgerüst sind aus annähernd kugelförmigen Teilchen aufgebaut, die beispielsweise in Gelen aus hochdisperssem Siliciumdioxid anzutreffen sind.

Gele lassen sich unterscheiden in Isogelee und Heterogelee. Bei Isogelen bestehen das Feststoffgerüst und die immobilisierte Flüssigkeit aus chemisch gleichartigen Substanzen und unterscheiden sich lediglich in ihren physikalischen Eigenschaften, die aus der Kettenlänge resultieren. Heterogelee dagegen sind aus chemisch unterschiedlichen Feststoff- und Flüssigkomponenten zusammengesetzt.

Des Weiteren lassen sich Gele nach den Löseeigenschaften ihrer flüssigen Komponente in lipophile und hydrophile Gele einteilen. Die flüssige Komponente der lipophilen Gele wird von unpolaren Flüssigkeiten wie z.B. Kohlenwasserstoffen gebildet, die der hydrophilen Gele aus Wasser. Hydrophile Gele sind daher immer Heterogelee.

Die rheologischen Eigenschaften der Gele können abhängig von deren Zusammensetzung unterschiedlich sein und sind stark von der Konzentration des Gelbildners abhängig. Durch Zusätze wie Elektrolyte, Tenside, Lösungsmittel etc. und

---

die Veränderung physikalischer Parameter wie der Temperatur können die Eigenschaften von Gelen beeinflusst werden, was für die Anwendung nützlich sein kann.

### 2.3 Cremes

Cremes sind halbfeste, also streichfähige, Systeme, die aus einer wässrigen und einer öligen Phase bestehen.

Im Europäischen Arzneibuch sind Cremes folgendermaßen definiert: *„Cremes sind mehrphasige Zubereitungen, die aus einer lipophilen und einer wässrigen Phase bestehen.“* (EAB 2011). Nach dieser Definition wird nicht zwischen Cremes und Emulsionen unterschieden. Diese Unterscheidung ist jedoch für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine wichtige Voraussetzung.

Eine Creme ist ein zweiphasiges System, bei dem, um die Streichfähigkeit zu erlangen, die flüssige kontinuierliche Phase immobilisiert ist. Daher kann man eine Creme als eine Emulsion mit gelierten Außenphase ansehen, also eine Kombination aus Emulsion und Gel. Für die rheologischen Eigenschaften einer Creme, und damit für ihre Streichfähigkeit, ist immer die Zusammensetzung der Außenphase verantwortlich. Die Stabilisierung des Emulsionscharakters einer Creme erfolgt meist durch Emulgatoren, kann aber auch durch eine ausgeprägte Viskositätserhöhung der Außenphase und damit eine Immobilisierung der dispersen Phase hervorgerufen werden.

Cremes lassen sich nach den Eigenschaften der kontinuierlichen Phase in lipophile Cremes, hydrophile Cremes und amphiphile Cremes einteilen. Lipophile und hydrophile Cremes werden in den folgenden Unterkapiteln genauer betrachtet. Amphiphile Cremes stellen trikohärente Systeme dar. Wasserphase, Ölphase und Emulgatorschicht sind jeweils kontinuierlich, wobei die Emulgatorschicht die beiden anderen Phasen voneinander trennt (Voigt 2010). Damit lässt sich keine eindeutige Außenphase bestimmen.

### 2.3.1 Lipophile Cremes

Lipophile Cremes haben eine lipophile Außenphase und eine Wasserphase, die in dieser als Tropfen dispers verteilt vorliegt. Die Stabilisierung erfolgt mit Emulgatoren vom Wasser-in-Öl-Typ, wie z.B. Wollwachsalkohole, Sorbitanester, Monoglyceride oder Polyglycerinfettsäureester. Diese können an der Grenzfläche als Flüssigkristalle vorliegen. Überschüssige Emulgatormoleküle und weitere Gerüstbildner können ebenfalls in flüssigkristalliner Form in der Ölphase vorliegen und zu deren Immobilisierung beitragen. Der weitere Strukturaufbau in der Außenphase erfolgt durch lipophile Gelbildner. Lipophile Cremes sind damit Emulsionen, deren kontinuierliche Phase von einem lipophilen Gel gebildet wird.

Eine typische Vertreterin der lipophilen Cremes ist die Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe DAB, deren Aufbau in Abbildung 2-2 dargestellt ist.

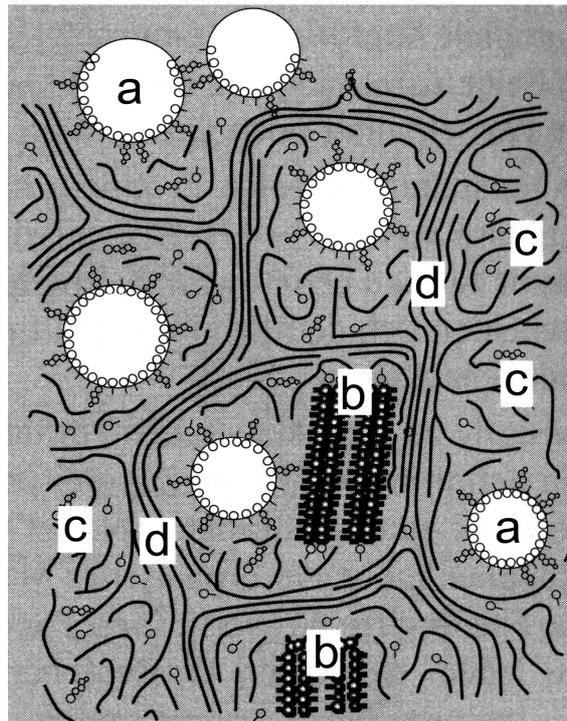


Abbildung 2-2: Struktur der wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe nach Junginger (Junginger 1992); (a) Wassertropfen mit Emulgatoren stabilisiert, (b) Überschusskristallite der Emulgatoren, (c) lipophile flüssige Phase, (d) lipophile Gelphase

Die Herstellung lipophiler Cremes erfolgt durch gemeinsames Aufschmelzen der lipophilen Bestandteile, Emulgatoren und Gerüstbildner und anschließendem Einarbeiten der Wasserphase. Das Einrühren der Wasserphase kann in kaltem Zustand erfolgen. Liegen die beiden Phasen jedoch erwärmt vor, so können die Emulgatormoleküle schneller in die Grenzfläche diffundieren, wodurch die Stabilisierung der Creme beschleunigt wird.

### 2.3.2 Hydrophile Cremes

In hydrophilen Cremes ist die kontinuierliche äußere Phase wässrig, die Innenphase besteht aus Ölen oder Wachsen. Die Stabilisierung erfolgt durch die Verwendung von Komplexemulgatoren oder durch Immobilisierung der Wasserphase einer O/W-Emulsion mit einem Gelbildner. Komplexemulgatoren sind Mischungen aus einem Öl-in-Wasser-Emulgator und einem lipophilen Tensid (Koemulgator), welches meist nicht alleine als Emulgator verwendet werden kann. Der strukturelle Aufbau der Wasserhaltigen hydrophilen Salbe DAB (Abbildung 2-3) ist ein typisches Beispiel für den kolloidchemischen Aufbau von hydrophilen Cremes.

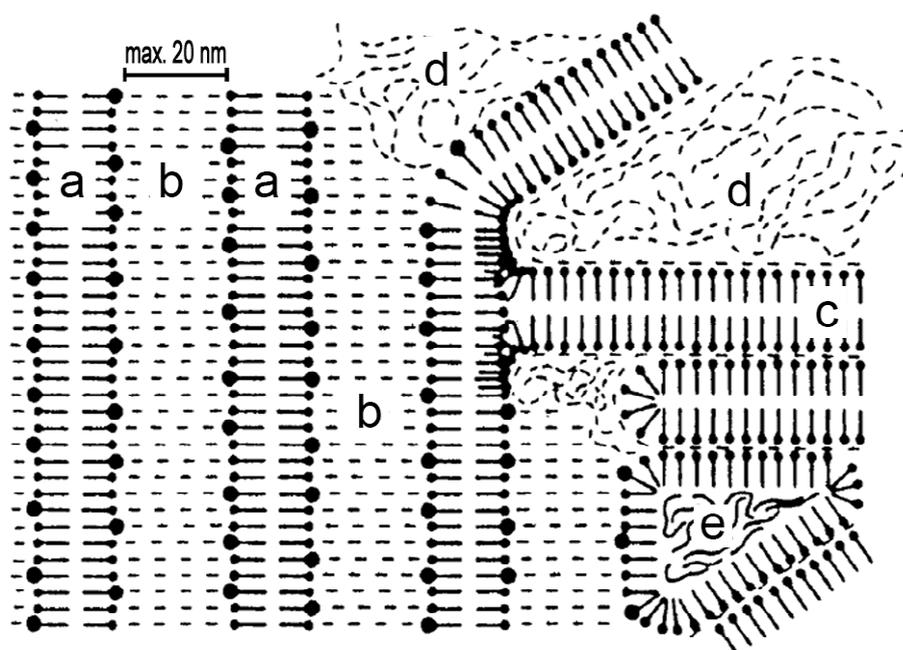


Abbildung 2-3: Struktureller Aufbau der WHS (nach Junginger); (a) flüssigkristallines, lamellares Gelgerüst aus emulgierendem Cetylstearylalkohol, (b) interlamellar fixiertes Wasser, (c) Cetylstearylalkohol-Semihydrat-Gelgerüst, (d) Bulkwasserphase, (e) lipophile, disperse Phase

Der Emulgator und der Koemulgator bilden Flüssigkristalle, in denen sie gemischt vorliegen. Dieser Emulgatorfilm lagert sich zu Lamellen zusammen, zwischen denen die Wasserphase immobilisiert ist und die mit größeren Bulkwasserkompartimenten in Verbindung stehen (Junginger 1992). Die überschüssigen Moleküle des Komplexemulgators schließen die Ölphase in kleine Kompartimente ab, die nicht tropfenförmig sein müssen. Die flüssigkristalline Gelstruktur, welche die Wasserphase durchzieht, verleiht der Creme dabei ihre Streichfähigkeit und stabilisiert die Bulkwasserkompartimente mechanisch (Kutz, Daniels et al. 2011).

Die Herstellung von hydrophilen Cremes erfolgt immer im heiß / heiß-Verfahren. Die Ölphase wird dabei gemeinsam mit den Emulgatoren und Gerüstbildnern aufgeschmolzen und mit der auf gleiche Temperatur erhitzten Wasserphase bis zum Erkalten homogenisiert. Daraus resultiert die beschriebene Struktur, mit der die höchstmögliche Stabilität erreicht wird.

#### **2.4 Verpackung halbfester Zubereitungen**

Halbfeste Zubereitungen werden bei der gebrauchstüblichen Entnahme aus ihrer Primärverpackung mit Keimen kontaminiert, da die Hautoberfläche mit einer großen Anzahl an Mikroorganismen besiedelt ist (Roth & James 1989), die teilweise in die Zubereitung übertragen werden. Die so eingebrachten Keime können überleben und vermehren sich gegebenenfalls, wodurch die Produkteigenschaften verändert werden können. Bei der nachfolgenden Applikation werden diese Keime wieder auf die zu behandelnde Haut aufgetragen.

Die Verpackung halbfester Zubereitungen zur Abgabe an den Anwender erfolgt üblicherweise in Tuben, Spendern oder Dosen, die im pharmazeutischen Umfeld als Kruken bezeichnet werden. Diese Primärpackmittel bestehen aus Metallen wie Aluminium und Weißblech oder Kunststoffen wie Polyethylen und Polypropylen.

Kruken und andere Dosen sind formstabil und zylinderförmig. Sie werden mit einem Deckel verschlossen, der den vollen Dosenumfang besitzt. Dadurch gerät beim Öffnen eine große Produktoberfläche mit der Umgebungsluft in Berührung, wodurch diese mit Luftkeimen kontaminiert werden kann. Die Entnahme aus Dosen erfolgt üblicherweise mit dem Finger, wobei eine Hautoberfläche von ca. 1-2 cm<sup>2</sup> mit dem Produkt in Kontakt kommt. Dabei können ca. 40-200 KBE auf das Produkt

übertragen werden (Wallhäußer 1995). Daraus resultieren in Abhängigkeit von der Produktzusammensetzung ein gewisses Hygienerisiko und die Gefahr, bei der folgenden Entnahme eine hohe Keimzahl auf die Haut aufzutragen.

Um dies zu vermeiden, werden in Apotheken häufig Spenderkruken verwendet, die ein verschließbares Ansatzstück besitzen, wodurch die Kontaktfläche bei der Entnahme zu Haut und Luft auf ca. 0,5 cm<sup>2</sup> verringert wird.

Spender bestehen aus einer formstabilen Dose, auf die eine Dosierpumpe aufgesetzt ist, durch die ein Produktstrang ausgedrückt wird. Der Produktauslass der Dosierpumpe ist nur wenige mm<sup>2</sup> groß, wodurch die Kontaktfläche im Vergleich zu Spenderkruken weiter vermindert ist. Eine zusätzliche Reduzierung des Hygienerisikos wird durch Airless-Spender erzielt. Diese zeichnen sich durch einen Schleppkolben in der Dose aus, durch den verhindert wird, dass das Produkt im Inneren der Dose mit Luft in Kontakt kommt.

Tube sind flexibel und besitzen ein verengtes, verschließbares Ansatzstück, durch das die Zubereitung ausgedrückt wird. Die Entnahmeöffnung und damit die Kontaktfläche zur Haut kann unterschiedlich groß sein und hat eine Fläche von wenigen mm<sup>2</sup> bis maximal 0,7 cm<sup>2</sup>. Diese ist abhängig von der Anwendungsart und der Größe der Tube. Insbesondere Augensalbtuben haben eine sehr enge Entnahmeöffnung, wodurch das Hygienerisiko für die Zubereitung gering gehalten wird.

## **2.5 Mikroorganismen**

Mikroorganismen, auch Keime genannt, sind tierische oder pflanzliche Kleinstlebewesen, die mit bloßem Auge nicht sichtbar sind (Drews 2010). Zu den Mikroorganismen zählen Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze. Sie können als vegetative Formen vorliegen, die sich durch Stoffwechselaktivität auszeichnen, oder als Sporen, welche die Dauerformen darstellen. Diese tragen das Erbgut, betreiben aber keinen Stoffwechsel (Wallhäußer 1995). Mikroorganismen können aufgrund ihrer Vermehrung und ihrer Stoffwechselaktivität zum Verderb der von ihnen besiedelten Produkte führen. Pathogene Mikroorganismen lösen Krankheiten aus (Falkow 1997). Die Fortpflanzung erfolgt durch Zellteilung, deren Geschwindigkeit von den Lebensbedingungen im Medium, das sie besiedeln, abhängig ist

(Schlegel 1992). Üblicherweise müssen sie unter Mangelbedingungen überleben, wodurch das Keimwachstum begrenzt ist. Abbildung 2-4 zeigt den typischen Verlauf der Zellzahlen einer Keimpopulation, die unter optimalen Wachstumsbedingungen gehalten wird.

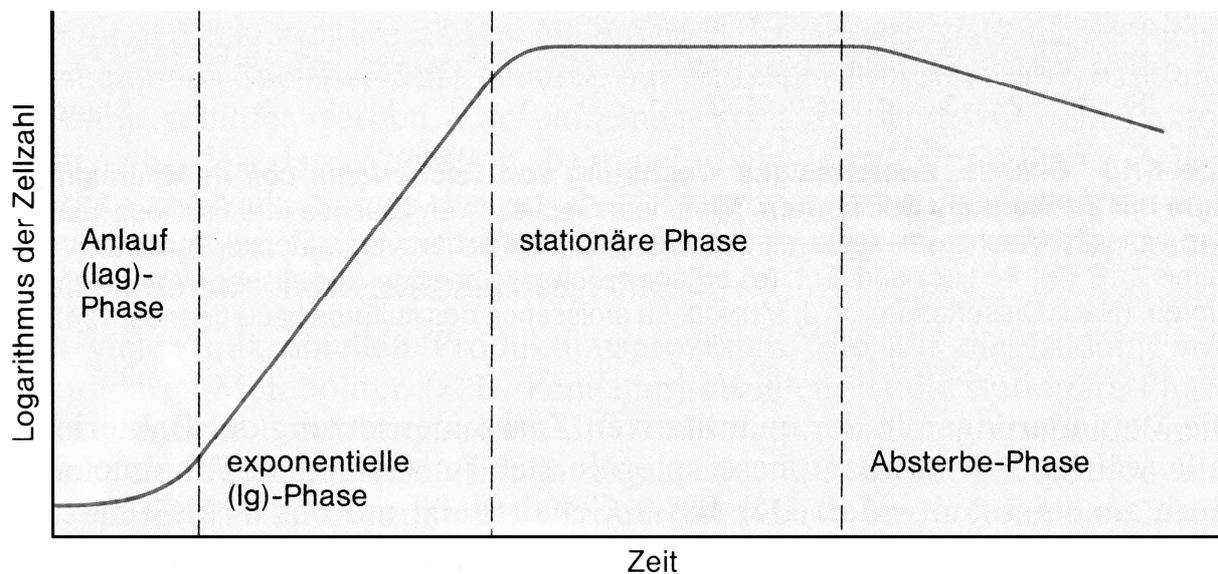


Abbildung 2-4: Wachstumsphasen einer Keimpopulation nach Schlegel

In der Anlaufphase stellt sich die Keimkultur auf die Umgebungsbedingungen ein, bis die maximale Teilungsrate erreicht ist. Diese bleibt in der exponentiellen Phase so lange erhalten, bis die Zellzahl so hoch ist, dass die Keime in Konkurrenz um die Substrate und den Lebensraum treten, wodurch die stationäre Phase eingeleitet wird. Diese kann abhängig von der Keimspezies und den Lebensbedingungen lange anhalten und geht irgendwann in die Absterbephase über, deren Gründe nicht restlos bekannt sind. Diskutiert wird ein Zusammenhang mit toxischen Stoffwechselprodukten und Autolyse durch zelleigene Enzyme (Schlegel 1992).

Die Größe von Mikroorganismen variiert von ca.  $0,02 \mu\text{m}$  bei den Viren bis zu  $5-6 \mu\text{m}$  bei Pilzen und Bakterien (Wallhäuser 1995), die einen eigenständigen Stoffwechsel betreiben und damit unabhängig von einem Wirt fortpflanzungsfähig sind. Die kleinsten bisher identifizierten Bakterien weisen einen Durchmesser von  $0,2 \mu\text{m}$  auf, Pilze gibt es ab  $0,5 \mu\text{m}$  (Wallhäuser 1995; Maniloff 1997).

Die menschliche Haut ist mit vielen Keimen besiedelt, deren Anzahl, in Abhängigkeit von der Lokalisation und im Besonderen der Feuchtigkeit auf der Hautoberfläche, von unter 100 bis ca.  $10^6$  KBE/cm<sup>2</sup> variiert (Wallhäußer 1995). Die Keime auf gesunder Haut sind überwiegend den Spezies Corynebakterien, Staphylokokken, Acinetobacter, Mikrokokken und Mallasezia zuzuordnen und sind meist apathogen (Hadaway 2003). Die Keimzusammensetzung auf erkrankter Haut kann davon stark abweichen und enthält häufig größere Anzahlen pathogener Keime (Roth & James 1989).

## **2.6 Herstellung unter aseptischen Bedingungen**

Für die Herstellung steriler Arzneiformen ist die Sterilisation im Abgabebehältnis oft nicht anwendbar, da die unzureichende thermische Stabilität vieler Zubereitungen die Sterilisationsbedingungen nicht zulässt. Daher ist es oft nötig, eine Herstellung unter aseptischen Bedingungen durchzuführen, um ein steriles Produkt zu erhalten.

Die Herstellung unter aseptischen Bedingungen wird im Europäischen Arzneibuch in Kapitel 5.1.1 „Methoden zur Herstellung steriler Zubereitungen“ (EAB 2011) detailliert beschrieben. Dort wird aufgeführt, dass sterile Ausgangsstoffe unter der Verwendung steriler Arbeitsmaterialien in einer keimarmen Umgebung zu einem sterilen Produkt verarbeitet werden. Die Ausgangsstoffe und Arbeitsmaterialien werden dazu nach den im selben Kapitel aufgeführten Verfahren sterilisiert. Die Herstellung erfolgt dann nach Möglichkeit in einem Reinraum, in dem keimarme oder sterile Bedingungen herrschen, unter Vermeidung des Eintrags von Mikroorganismen. Um zu gewährleisten, dass die Sterilität der eingesetzten Ausgangsstoffe bei der Herstellung erhalten bleibt, muss den folgenden Punkten besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden:

- Umgebung
- Personal
- kritische Oberflächen
- Behältnis-/Verschluss-Sterilisation und Überführungsschritte
- höchstzulässige Lagerzeit der Zubereitung vor der Abfüllung in das Endbehältnis

Ein wesentlicher Bestandteil der Herstellung und Abfüllung unter aseptischen Bedingungen ist die Verwendung von Filtern mit bakterienzurückhaltender Membran.

## **2.7 Konservierungsmittel**

*„Die Konservierung hat zum Ziel, ein gegebenes Produkt über einen genügend langen Zeitraum bei den vorhandenen Bedingungen unverändert zu erhalten. Zu diesem Zweck müssen alle schädigenden oder verderbenden Einflüsse ausgeschaltet werden.“* (Wallhäußer 1995). Um dies zu erreichen, werden Produkten häufig Konservierungsmittel zugesetzt. In Kapitel 5.1.3 Ph. Eur. „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (EAB 2011) ist aufgeführt, dass der Zusatz von Konservierungsmitteln dem Zweck dient, eine Vermehrung von Mikroorganismen zu verhindern oder die Auswirkung einer mikrobiellen Kontamination einzuschränken. Der Zusatz von Konservierungsmitteln darf jedoch nicht dazu dienen, einen Mangel in der guten pharmazeutischen Herstellungspraxis auszugleichen.

Als Konservierungsmittel werden Zellgifte eingesetzt, die schon in kleinsten Konzentrationen dazu in der Lage sind, das Wachstum von Mikroorganismen zu unterbinden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Konzentration der eingesetzten Substanzen ausreichend hoch ist, um nicht den Selektionsdruck in der Keimpopulation zu erhöhen und damit das Überleben resistenter Keime zu fördern (Voigt 2010).

Da Konservierungsmittel aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung Reizungen und Sensibilisierungen menschlicher Gewebe verursachen können (Brasch, Henseler et al. 1993; Schnuch 1997), ist es ein Ziel von Herstellerseite, deren Einsatz auf ein Minimum zu reduzieren, um damit auch die Bedürfnisse der Konsumenten zu befriedigen.

## **2.8 Prüfung auf ausreichende Konservierung**

Das EAB schreibt zur Sicherstellung der mikrobiologischen Qualität konservierter Arzneimittel die „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ vor (EAB 2011). Diese sieht vor, dass je ein Äquivalent des Produktes mit  $10^5$ - $10^6$  KBE/mL der Testkeime *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 und *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 beimpft wird und

nach 2, 7, 14 und 28 Tagen die Keimzahlen in den Proben bestimmt werden. Die Zubereitung muss dazu in der Lage sein, die Keimbelastung über den Untersuchungszeitraum deutlich zu reduzieren (Tabelle 2-1).

*Tabelle 2-1: Log-Stufen der Keimzahlminderung nach Kapitel 5.1.3 Ph. Eur.*

	Kriterium	2 Tage	7 Tage	14 Tage	28 Tage
Bakterien	A	2	3	–	keine Zunahme
	B	–	–	3	keine Zunahme
Pilze	A	–	–	2	keine Zunahme
	B	–	–	1	keine Zunahme

Die Bestimmung der Keimzahlen erfolgt durch Membranfiltration und Bebrütung der Filter auf Agarplatten. Für diese Methode bedarf es einiger Tage.

In der Literatur werden weitere Tests zur Prüfung auf Wirksamkeit der Konservierung, die in Pharmakopöen gefordert sind oder von Verbänden empfohlen werden, beschrieben. Aufgeführt werden der U.S. Pharmacopeia test (USP 2011), der British Pharmacopeia test (BP 2004), der Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association test (McEwen & Curry 1985), der rapid screen test (Farrington, Martz et al. 1994), der sequential challenge test (Farrington, Martz et al. 1994) und der FDA post-use test (Farrington, Martz et al. 1994). Diese Tests entsprechen in ihrem Aufbau im Wesentlichen der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ Ph. Eur., unterscheiden sich jedoch geringfügig in der Auswahl und Anzahl der Testkeime, der zu beimpfenden Produktmenge, den Bestimmungszeitpunkten der Keimzahlen und den Kriterien der zu erreichenden Keimzahlminderung.

Zusätzlich werden einige Methoden beschrieben, die dazu dienen, die Keimzahlbestimmung der gezogenen Proben zu beschleunigen.

Genannt werden:

- Die Impedance Methode, bei der die Impedanz des Untersuchungsmediums gemessen wird, die aufgrund der Ausscheidung geladener Substrate durch die Mikroorganismen mit der Zellzahl korreliert (Connolly, Bloomfield et al. 1994; Silley & Forsythe 1996).
- Die ATB Bioluminescence Methode, bei der den kontaminierten Proben Substrate und Enzyme zugegeben werden, welche von den Mikroorganismen unter Verwendung von ATP in lichtemittierende Substanzen umgewandelt werden. Das Ausmaß des emittierten Lichts korreliert mit der Zellzahl (Kramer, Šuklje-Debeljak et al. 2008).
- Die Cytometry Methode, bei der den kontaminierten Proben Fluorescein zugegeben wird, das von den Mikroorganismen abgebaut wird. Die Restfluoreszenz korreliert mit der Keimzahl. (Easter 2003).
- Die Linear regression Methode, bei der für die einzelnen Testkeime die Zeit bestimmt wird, die benötigt wird, um die Keimzahl um eine Zehnerpotenz zu verringern und daraus dann über lineare Regression berechnet wird, wie die Keimzahlen im Produkt zu bestimmten Zeitpunkten sind (Orth 1979).

Keine der beschriebenen Testmethoden berücksichtigt die die Situation der Kontamination bei der Anwendung von halbfesten Zubereitungen, bei der Keime auf deren Oberfläche übertragen werden, die evtl. in die Zubereitung eindringen können. Des Weiteren wird die Form und Beschaffenheit der Primärverpackung vernachlässigt.

Eine Annäherung an die Entnahmesituation stellt eine Methode dar, die von van Doorne beschrieben wird. Bei dieser werden Keime auf die Oberfläche von Cremes aufgetragen, die auf Agarplatten liegen. Dann wird überprüft, ob die Keime bis zur Platte gelangen können (van Doorne, Collge et al. 1998). Nicht in den Test eingeschlossen ist die Verwendung unterschiedlicher Primärverpackungen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Substanzen

Tabelle 3-1: verwendete Substanzen

Freiname	Produktname	Qualität	Hersteller
Caseinpepton- Sojamehlpepton-Agar	CASO-Agar	Ph.Eur.	Merck D-Darmstadt
Caseinpepton- Sojamehlpepton- Bouillon	CASO-Bouillon	Ph.Eur.	Merck D-Darmstadt
Cetylstearylalkohol	Lanette O	Ph.Eur.	Cognis D-Düsseldorf
Cetylstearylalkohol, emulgierend	Lanette N	Ph.Eur.	Cognis D-Düsseldorf
Dicaprylyl Carbonat	Cetiol CC		Cognis D-Düsseldorf
Dickflüssiges Paraffin	Dickflüssiges Paraffin	Ph.Eur.	Hansen & Rosenthal D-Hamburg
Dinatriumphosphat • 2 H <sub>2</sub> O	Natriumphosphat dibasisch Dihydrat	pro Analyse	Sigma-Aldrich D-Seelze
Erdnussöl	Oleum arachidis raffinatum Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Gebleichtes Wachs	Cera Alba Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Glycerol	Glycerinum Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Guarkernmehl	Guarmehl Ph.Eur. 5.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Hypromellose <sup>1</sup>	Metolose 90SH- 4000	USP	Shin-Etsu J-Tokyo
Kaliumdihydrogen- phosphat	Kaliumdihydrogen- phosphat	pro Analyse	Sigma-Aldrich D-Seelze

<sup>1</sup> Viskosität einer 2 %-igen wässrigen Lösung: 4000 mPa\*s

---

Macrogol-8-stearat	Myrj S8-SO-(MV)	Ph.Eur.	Croda E-Barcelona
Magnesiumsulfat • 7 H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat heptayhdrat	pro Analyse	Sigma-Aldrich D-Seelze
Mittelkettige Triglyceride	Miglyol 812	Ph.Eur.	Sasol D-Witten
Natriumchlorid	Natriumchlorid Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Octyldodecanol	Eutanol G	Ph.Eur.	Cognis D-Düsseldorf
Pepton aus Fleisch	Pepton aus Fleisch	Ph.Eur.	Merck D-Darmstadt
Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearat	Dehymuls PGPH	Ph.Eur.	Cognis D-Düsseldorf
Polyglyceryl-3 Diisostearat	Lameform TGI	Ph.Eur.	Cognis D-Düsseldorf
Polysorbat 60	Tween 60 V Pharma	Ph.Eur.	Croda E-Barcelona
Polysorbat 80	Tween 80 V Pharma	Ph.Eur.	Croda E-Barcelona
Propylenglycol	Propylenglycolum Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Sigma-Aldrich D-Seelze
Sabouraud-4 % Glucose-Agar	Sabouraud-4 % Glucose-Agar	Ph.Eur.	Merck D-Darmstadt
Sorbitanmonostearat	Span 60 Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Rizinusöl	Oleum ricini raffinatum Ph.Eur. 6.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Weißes Vaseline	Weißes Vaseline	Ph.Eur.	Hansen & Rosenthal D-Hamburg
Wollwachsalkohole	Wollwachsalkohole	Ph.Eur.	Deutsche Lanolin Gesellschaft D-Frankfurt
Zinkstearat	Zincum stearanicum Ph.Eur. 5.0	Ph.Eur.	Caesar & Lorentz D-Hilden
Isopropanol	Isopropanol	technisch	Brenntag GmbH D-Mülheim/Ruhr

---

### 3.1.2 Wasser

Zur Herstellung der Zubereitungen und Lösungen wird Wasser, das mindestens den Anforderungen der Monographie Hochgereinigtes Wasser des Europäischen Arzneibuchs (EAB 2011) entspricht und nach der Herstellung sterilisiert wird, verwendet. Die Herstellung des Wassers erfolgt durch Doppelumkehrosmose in Kombination mit Entionisierung, Adsorption und Photooxidation mit einem Wasseraufbereitungsgerät Purelab Option-Q 7 (Elga, UK-Marlow). Die Sterilisation erfolgt direkt im Anschluss an die Herstellung durch Dampfsterilisation (siehe Kapitel 3.3.2).

### 3.1.3 Testkeime

Die für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählten Testkeime sind nach den Anforderungen Arbeitssicherheit (Personenschutz), Relevanz und Robustheit der Keime ausgesucht.

Um gefahrloses Arbeiten im Labor zu gewährleisten, werden ausschließlich Keime verwendet, die der Risikogruppe 1 der Biostoffverordnung (Bundesministerium der Justiz 2008) angehören. Die Keime der Risikogruppe 1 sind *„Biologische Arbeitsstoffe, bei denen es unwahrscheinlich ist, dass sie beim Menschen eine Krankheit verursachen“*.

Relevanz und Robustheit der Keime werden dadurch gewährleistet, dass die Auswahl der Testkeime nach der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“, Ph. Eur. 5.1.3 (EAB 2011) erfolgt.

Die Testkeimstämme sind Züchtungen der „American Type Culture Collection“ (ATCC) die durch die ATCC-Nummerierung identifiziert werden.

Zur Anwendung kommen je ein Testbakterium und ein Testpilz.

#### **Testbakterium**

Escherichia coli, ATCC 8739

(E-Power microorganisms, Micro Bio Logics, US-St. Cloud)

#### **Testpilz**

Candida albicans, ATCC 10231

(E-Power microorganisms, Micro Bio Logics, US-St. Cloud)

Bezogen werden die Testkeime von der Vertriebsfirma Doenitz ProLab (D-Augsburg). Die Testkeime werden in Form lyophilisierter Keimpellets geliefert, die eine definierte Keimzahl enthalten. Diese beträgt chargenabhängig ca.  $5 \cdot 10^7$  KBE. Die Vegetation der Keime in den Pellets ist durch die Lyophilisation unterbrochen, diese kann jedoch durch Resuspendieren in Phosphatpuffer wieder aktiviert werden (Gehrke, Pralle et al. 1992). Die Keimpellets können bei 4 °C über einen Zeitraum von ca. 18 Monaten gelagert werden.

## 3.2 Rezepturen

### 3.2.1 Lipophile Cremes

#### 3.2.1.1 Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe

Die Zusammensetzung der eingesetzten wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe ist an die Monographie „Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe“ des Deutschen Arzneibuchs 2010 (DAB 2010) angelehnt, die sich auf die Monographie „Wollwachalkoholsalbe“ (DAB 2010) bezieht. Bei der Zusammensetzung von Wollwachsalkoholsalbe können laut DAB 2010 bis zu 12 der 93,5 Teile weißes Vaseline durch dickflüssiges Paraffin ersetzt werden, um eine weichere Konsistenz zu erhalten. Bei der verwendeten WAS werden zur Konsistenzanpassung 20 Teile weißes Vaseline durch dickflüssiges Paraffin ersetzt.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe

	<b>Substanz</b>	<b>Teile</b>
A	Cetylstearylalkohol	0,25
	Wollwachsalkohole	3
B	Weißes Vaseline	36,75
	Dickflüssiges Paraffin	10
	Wasser	50

### Herstellung

Die amphiphilen (A) und hydrophoben (B) Bestandteile werden gemeinsam auf dem Wasserbad bei 60 °C aufgeschmolzen. Das Wasser wird ebenfalls auf 60 °C erwärmt. Die beiden Phasen werden bei gleicher Temperatur nach dem „Spritze-zu-Spritze-Verfahren“ (siehe Kapitel 3.4) vereinigt und bis zum Erkalten homogenisiert.

### 3.2.1.2 Wollwachsalkoholfreie W/O-Creme

Bei der hier verwendeten W/O-Creme handelt es sich um eine Zubereitung mit einem hohen Innenphasenanteil. Lipophile Cremes dieses Typs werden häufig in Dermatika und Kosmetika verwendet, da sie gute feuchtigkeitsspendende und hautpflegende Eigenschaften besitzen. Die verwendeten Emulgatoren sind Polyglycerinester (Schütze 1977; Neissner 1980), die sich durch gute Hautverträglichkeit auszeichnen. Der breite Einsatz in der Lebensmittelindustrie (Babayan, Kaunitz et al. 1964; Hemker 1981) unterstreicht die gute Verträglichkeit.

Im Folgenden wird diese Zubereitung mit dem Begriff „W/O-Creme“ bezeichnet.

Tabelle 3-3: Zusammensetzung W/O-Creme

	Substanz	Teile
A	Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearat	3
	Polyglyceryl-3 Diisostearat	3
	Zinkstearat	1
B	Mittelkettige Triglyceride	17
	Gebleichtes Wachs	1
C	Magnesiumsulfat	1
	Wasser	74

### Herstellung

Die amphiphilen (A) und hydrophoben (B) Bestandteile werden gemeinsam auf dem Wasserbad bei 60 °C aufgeschmolzen. Die hydrophilen (C) Bestandteile werden gemischt und ebenfalls auf 60 °C erwärmt. Die beiden Phasen werden bei gleicher Temperatur nach dem „Spritze-zu-Spritze-Verfahren“ (siehe Kapitel 3.4) vereinigt und bis zum Erkalten homogenisiert.

### 3.2.2 Hydrophile Cremes

#### 3.2.2.1 Wasserhaltige hydrophile Salbe

Die Zusammensetzung der eingesetzten wasserhaltigen hydrophilen Salbe ist an die Monographie „Wasserhaltige hydrophile Salbe“ des Deutschen Arzneibuchs 2010 (DAB 2010) angelehnt, die sich auf die Monographie „Hydrophile Salbe“ (DAB 2010) bezieht. Das im DAB 2010 angegebene Phasenvolumenverhältniss Öl : Wasser von 3 : 7 wird in 1 : 1 abgewandelt, um das Phasenvolumenverhältnis an das der verwendeten wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe anzunähern.

*Tabelle 3-4: Zusammensetzung wasserhaltige hydrophile Salbe*

	<b>Substanz</b>	<b>Teile</b>
A	Emulgierender Cetylstearylalkohol	15
B	Dickflüssiges Paraffin	17,5
	Weißes Vaseline	17,5
	Wasser	50

#### **Herstellung**

Die amphiphilen und hydrophoben Bestandteile werden gemeinsam auf dem Wasserbad bei 70 °C aufgeschmolzen. Das Wasser wird ebenfalls auf 70 °C erwärmt. Die beiden Phasen werden bei gleicher Temperatur nach dem „Spritze-zu-Spritze-Verfahren“ (siehe Kapitel 3.4) vereinigt und bis zum Erkalten homogenisiert.

#### 3.2.2.2 Nichtionische hydrophile Creme (NHC)

Die Zusammensetzung der eingesetzten nichtionischen hydrophilen Creme ist angelehnt an die Monographie „Nichtionische hydrophile Creme“ des Deutschen Arzneibuchs 2010 (DAB 2010). Das Glycerol der NHC DAB 2010 wird aufgrund einer möglichen antimikrobiellen Wirkung (Dailey & Rosenwasser 1994) durch Erhöhen der Anteile der amphiphilen und hydrophoben Bestandteile ersetzt, wodurch das Phasenvolumenverhältnis Öl : Wasser von 1 : 1 erhalten bleibt.

Tabelle 3-5: Zusammensetzung nichtionische hydrophile Creme

	<b>Substanz</b>	<b>Teile</b>
A	Polysorbat 60	6,25
	Cetylstearylalkohol	12,5
	Weißes Vaseline	31,25
	Wasser	50

### **Herstellung**

Die amphiphilen Bestandteile (A) und weißes Vaseline werden gemeinsam auf dem Wasserbad bei 70 °C aufgeschmolzen. Das Wasser wird ebenfalls auf 70 °C erwärmt. Die beiden Phasen werden bei gleicher Temperatur nach dem „Spritze-zu-Spritze-Verfahren“ (siehe Kapitel 3.4) vereinigt und bis zum Erkalten homogenisiert.

#### **3.2.3 Hydrophile Basisemulsion**

Die Zusammensetzung der eingesetzten hydrophilen Basisemulsion ist angelehnt an die Monographie „Hydrophile Basisemulsion“ des Neuen Rezeptur Formulariums (NRF 2010) des Deutschen Arzneimittelcodex 2010 (DAC 2010). Die Bestandteile der hydrophilen Basisemulsion NRF von denen eine antimikrobiellen Wirkung zu erwarten ist (Glycerol, Kaliumsorbat, Citronensäure) werden durch Wasser ersetzt. Der Wasserphase werden teilweise zur Viskositätserhöhung 2 %, 5 % oder 10 % Hypromellose zugesetzt (Jumel, Harding et al. 1996).

Tabelle 3-6: Zusammensetzung Hydrophile Basisemulsion

	Substanz	Teile			
		HB 0%	HB 2%	HB 5%	HB 10%
A	Sorbitanmonostearat	2	2	2	2
	Macrogol-8-stearat	2	2	2	2
B	Mittelkettige Triglyceride	5	5	5	5
C	Hypromellose	0	1,8	4,6	9,1
	Wasser	91	89,2	86,4	81,9

### Herstellung

Die amphiphilen Bestandteile (A) und die mittelkettigen Triglyceride (B) werden gemeinsam auf dem Wasserbad bei 60 °C aufgeschmolzen. Das Wasser oder das zuvor hergestellte HPMC-Gel (C) werden ebenfalls auf 60 °C erwärmt. Die beiden Phasen werden bei gleicher Temperatur nach dem „Spritze-zu-Spritze-Verfahren“ (siehe Kapitel 3.4) vereinigt und bis zum Erkalten homogenisiert.

### 3.2.4 Hydrogele

#### 3.2.4.1 Guar-Gel

Tabelle 3-7: Zusammensetzung Guar-Gel

Substanz	Teile
Guarkernmehl	5
Wasser	95

### Herstellung

Das Wasser wird in einem hohen Becherglas vorgelegt und mit einem Rührwerk (RZR 2102 control, Heidolph, D-Schwabach) mit einem Propellerrührer bei 2000 U/min gerührt. Das Guarkernmehl wird portionsweise aufgestreut und so

lange eingerührt, bis sich ein gleichmäßiges, klares, bernsteinfarbenes Gel gebildet hat. Das Gel wird direkt nach der Herstellung in hitzebeständige Glasflaschen mit Schraubverschluss (Duran Laborflasche, Duran Group GmbH, D-Wertheim / Main) abgefüllt und dampfsterilisiert (siehe Kapitel 3.3.2).

### 3.2.4.2 Hypromellose-Gel

*Tabelle 3-8: Zusammensetzung Hypromellose-Gel*

Substanz	Teile		
	HPMC 2%	HPMC 5%	HPMC 10%
Hypromellose	2	5	10
Wasser	98	95	90

### Herstellung

Das Wasser wird in einem hohen Becherglas vorgelegt und mit einem Rührwerk (RZR 2102 control, Heidolph, D-Schwabach) mit einem Propellerrührer bei 2000 U / min gerührt. Das HPMC-Pulver wird portionsweise aufgestreut und so lange eingerührt, bis es gleichmäßig dispergiert ist. Die Mischung wird für 24 h bei 4 °C zum Durchquellen stehen gelassen.

### **3.3 Aseptische Herstellung der Cremes und Emulsionen**

Die Herstellung der für die Untersuchungen verwendeten halbfesten Zubereitungen erfolgt unter aseptischen Bedingungen (Winter 2006) unter einer Laminar-Airflow-Sicherheitswerkbank (NU-437-500-E, Nuair, US-Plymouth).

Die verwendeten Arbeitsmaterialien sind, falls verfügbar, vom Hersteller steril in „peel-off“-Packungen verpackt, andernfalls werden sie sterilisiert (siehe Kapitel 3.4.1 und 3.4.2).

#### **Spritze-zu-Spritze-Verfahren**

Die Herstellung von halbfesten Zubereitungen erfolgt in Anlehnung an die Zweispritzentechnik zur Herstellung von Augensalben (NRF 2010; Thoma 2010). Dazu werden zwei Luer-Lock-Einmalspritzen (peel-off, BD Plastipak, BD, US-Franklin Lakes) mit identischem Volumen über einen Luer-Lock-Adapter weiblich/weiblich (peel-off, Combifix Adapter, BBraun, D-Melsungen) zu einem geschlossenen System verbunden. Die zuvor getrennt hergestellten Phasen der halbfesten Zubereitung werden auf 60 °C erwärmt, wodurch die halbfeste lipophile Phase aufgeschmolzen wird. Die beiden flüssigen Phasen werden jeweils in eine Spritze aufgezogen, der Adapter auf eine der beiden Spritzen aufgeschraubt, entlüftet und dann mit der zweiten Spritze verbunden. Durch zügiges Hin- und Herbewegen der beiden Spritzenstempel wird die Zubereitung abwechselnd in die eine und die andere Spritze gedrückt. Hierdurch wird sie aufgrund der Querschnittsverengung einer intensiven Scherung ausgesetzt, die zur Homogenisierung und Tröpfchenverkleinerung führt. Dies wird so lange durchgeführt, bis die Zubereitung auf ca. 37 °C abgekühlt ist.

### **3.4 Sterilisation**

#### **3.4.1 Sterilisation bei trockener Hitze**

Die Sterilisation von Arbeitsmaterialien aus Glas und Edelstahl sowie von hitzebeständigen Ausgangsstoffen zur Herstellung von Zubereitungen erfolgt durch Sterilisation bei trockener Hitze wie unter „Methoden zur Herstellung steriler Zubereitungen“ in Kapitel 5.1.1 Ph. Eur. (EAB 2011) beschrieben. Die Sterilisation wird im Trockenschrank (Heraeus T5050, Heraeus, D-Heraeus) bei 160 °C für

120 min durchgeführt. Offene Glasgefäße werden zur Sterilisation mit Alufolie luftdicht abgedeckt, Kleinteile werden komplett in Alufolie eingepackt.

### **3.4.2 Dampfsterilisation**

Die Sterilisation wässriger Lösungen sowie nicht mit trockener Hitze sterilisierbarer Arbeitsmaterialien erfolgt durch Dampfsterilisation wie unter „Methoden zur Herstellung steriler Zubereitungen“ in Kapitel 5.1.1 des Europäischen Arzneibuchs (EAB 2011) beschrieben mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf bei 121 °C für 15 min. Die Dampfsterilisation erfolgt in einem Autoklaven (Labstar 3-4-7, Zirbus, D-Bad Grund).

Wässrige Lösungen werden zur Sterilisation in Infusions- oder Injektionsflaschen abgefüllt und mit Silikonstopfen und Alubördekappen (Zscheile & Klinger, D-Hamburg) verschlossen.

Arbeitsgeräte werden in einen wasserdampfdurchlässigen Autoklavierschlauch (Steriking RB, Wipak Medical, D-Bomlitz) eingeschweißt.

### **3.5 Herstellung der Inocula**

Zur Herstellung der Inocula werden lyophilisierte Keimpellets verwendet, die eine definierte Keimzahl enthalten (chargenabhängig ca.  $5 \cdot 10^7$  KBE). Die Vegetation der Keime in den Pellets ist durch die Lyophilisation unterbrochen, kann jedoch durch resuspendieren in Phosphatpuffer wieder aktiviert werden (Gehrke, Pralle et al. 1992). Dazu wird unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen Pinzette ein Pellet in einen sterilen 10 ml-Messkolben überführt und dieser mit Phosphatpuffer pH 7,4 Ph. Eur. bis zum Eichmaß aufgefüllt und mit einem sterilen Glasstopfen verschlossen. Der Messkolben wird gevortext (Vibrofix VF1, Janke & Kunkel, D-Stauffen), bis das Pellet zerfallen ist, und anschließend im Brutschrank (Memmert B 40, Memmert, D-Schwabach) für 30 min bei einer Temperatur von  $35 \pm 2$  °C bebrütet. Die so zubereitete Keimsuspension enthält ca.  $5 \cdot 10^6$  KBE/mL und kann mit Phosphatpuffer beliebig weiter verdünnt werden.

### 3.6 Beurteilung des Keimwachstums

#### 3.6.1 Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Keimzahl aus Proben gezielt beimpfter Cremes erfolgt nach der „Membranfiltermethode“ Ph. Eur. 2.6.12 „Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Zählung der gesamten vermehrungsfähigen Keime“ (EAB 2011), die verwendeten Materialien und Bedingungen sind in Tabelle 3-9 aufgeführt.

Tabelle 3-9: *Material und Bedingungen der Membranfiltermethode*

	<b>Escherichia coli</b>	<b>Candida albicans</b>
<b>Filter</b>	Cellulosenitrat, Porengröße 0,45 µm (Sartorius Stedim, D-Göttingen)	
<b>Spüllösung</b>	Natriumchlorid-Pepton-Pufferlösung pH 7,0 EAB 7.1 2.6.13	
<b>Spülvorgänge</b>	1	
<b>Agarmedium</b>	Agarmedium B EAB 7.1 2.6.13	Agarmedium C EAB 7.1 2.6.13
<b>Bebrütungstemperatur</b>	32,5 ± 2,5 °C	22,5 ± 2,5 °C
<b>Bebrütungsdauer</b>	5 Tage	

Die Anzahl der Spülvorgänge wurde auf einen reduziert und das Verfahren validiert (siehe Kapitel 4.5.2). Mit der in einer Einwegspritze zu 10 mL abgefüllten Creme wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Es resultiert eine Emulsion, die den Membranfilter nicht verstopft und deren Keimzahl nach Bebrütung auf Agarmedium auszählbar ist, also nicht mehr als 200 KBE enthält. Als Verdünnungsmedium für die Verdünnungsreihe wird NaCl-Pepton-Puffer Ph. Eur. 7.1 2.6.13, dem 0,5 % Polysorbat 80 zugesetzt ist, verwendet. Direkt nach der Herstellung der beimpften Creme beträgt die Keimzahl ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE, so dass in vier Schritten auf ca. 50 KBE verdünnt wird. Da die Keimzahlen in den gelagerten Creme-Proben nicht abschätzbar sind, werden diese in drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf je

einen Membranfilter aufgetragen. Die Verdünnungen werden in drei, vier und fünf Schritten hergestellt. Von diesen drei Membranfiltern wird derjenige zur Auswertung herangezogen, der am nächsten bei 50 KBE liegt. Über die ermittelte KBE-Anzahl und die Verdünnungsstufe kann die Keimzahl je mL Zubereitung berechnet werden.

### **3.6.2 Prüfung auf Sterilität**

Die Prüfung auf Sterilität der halbfesten Zubereitungen erfolgt in 15 mL-Reagenzgläsern, die mit Kapsenbergkappen verschlossen sind. Als Bebrütungsmedium wird Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (flüssiges Medium A, Ph. Eur. 7.1 2.6.13) verwendet, die in den Reagenzgläsern dampfsterilisiert wird. 0,1 ml-1 ml der Zubereitung wird in ein Reagenzglas gegeben und zum Dispergieren gevortext (Vibrofix VF1, Janke & Kunkel, D-Stauffen). Die Proben werden bei  $32,5 \pm 2,5$  °C im Brutschrank (Mettler B 40, Mettler, D-Schwabach) für fünf Tage bebrütet und danach ausgewertet. Ist die Bouillon klar, war die entnommene Probe steril, ist die Bouillon getrübt, war die entnommene Probe mit Keimen belastet.

Positiv- und Negativkontrollen werden bei jeder Versuchsreihe mitgeführt.

### **3.7 Untersuchungsstrategie zur Keimzahlentwicklung in nicht sterilen Zubereitungen**

Zur Untersuchung des Keimwachstums in lipophilen Cremes werden WWAS und W/O-Creme hergestellt, deren Wasserphase vor der Herstellung beimpft wird, so dass eine Keimzahl von ca.  $5 \cdot 10^4$  KBE / mL Creme resultiert. Die Cremeproben werden, wie im Kapitel 5.1.3 Ph. Eur. „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (EAB 2011) beschrieben, bei Raumtemperatur für 28 Tage gelagert. Die direkt nach der Herstellung vorliegende Keimzahl wird bestimmt. Weitere Probenzüge zur Keimzahlbestimmung erfolgen an den Tagen 2, 7, 14 und 28. Es werden drei Proben je Creme, Testkeim und Probenzug untersucht.

### **3.8 Untersuchungsstrategie zum Eindringen von Keimen in sterile halbfeste Zubereitungen**

Einer 5 mL-Einmalspritze (BD Plastipak, BD, US-Franklin Lakes) wird der Kolben entnommen, mit einem Minibohrer (4 mm Durchmesser) wird ein Loch in die Wand der Spritze gebohrt und dieses mit transparentem Klebefilm (Tesa Film transparent,

Tesa SE, D-Hamburg) wieder verschlossen (Abbildung 3-1 links). Der Kolben wird mit zwei Kanülen (BD Microlance 3 20G, BD, US-Franklin Lakes) durchstochen (Abbildung 3-1 rechts).



Abbildung 3-1: Angebohrte, zugelebte Spritze und durchstochener Kolben

Die mit einem Verschlusskonus (Combi Stopper, BBraun, D-Melsungen) verschlossene Spritze und der durchstochene Kolben werden dampfsterilisiert. Die Spritze wird aseptisch unter einer Laminar-Airflow-Arbeitsbank (NU-437-500-E, Nuaire, US-Plymouth) aus einer weiteren Spritze, in der die halb feste Zubereitung hergestellt wurde, von der Rückseite her befüllt. Dazu wird auf die abfüllende Spritze über einen Luer-Lock-Adapter weiblich/weiblich (Combifix Adapter, BBraun, D-Melsungen) ein Stück Silikonschlauch aufgesetzt, dessen Aussendurchmesser nur geringfügig kleiner ist als der Innendurchmesser der Spritze (Abbildung 3-2 links). Das eingefüllte Volumen ist so bemessen, dass der Abstand von der Oberfläche der Zubereitung zum Bohrloch 0,2 mL auf der Spritzenskala beträgt. Der Kolben wird in die Spritze eingesetzt, so dass ein Leervolumen von 1 mL entsteht (Abbildung 3-2 rechts), das durch eine der beiden Kanülen mit Keimsuspension befüllt wird. Hierbei kann die Luft durch die andere Kanüle entweichen.



Abbildung 3-2: Befüllen der Spritze und Spritze mit eingesetztem Kolben

Die beiden Kanülen werden entnommen, wodurch sich ein geschlossenes System ergibt, das ohne die Gefahr einer Kontamination von außen bis zum Probenzug gelagert werden kann. Zur Vorbereitung des Probenzugs wird die Spritze desinfiziert, der Kolben wieder mit zwei Kanülen durchstochen, die Keimsuspension mit einer Spritze entnommen und der entstandene Raum zum Abtöten der Keime auf der Cremeoberfläche mit Isopropanol 70 % befüllt (Penna, Mazzola et al. 2001), welcher nach 30 min wieder entnommen wird. Der Probenzug erfolgt, indem der transparente Klebfilm entfernt wird, eine 1 mL-Injektionsspritze (Injekt-F, BBraun, D-Melsungen) in das Bohrloch gesteckt wird (Abbildung 3-3) und 0,1 mL der Zubereitung entnommen werden. Diese werden zur Bebrütung in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon überführt. Je Zubereitung, Testkeim und Probenzug werden drei Spritzen untersucht.



Abbildung 3-3: Entnahme der Probe aus der Spritze

Die beimpften Proben werden über einen Zeitraum von acht Wochen bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Die Keimfreiheit der abgefüllten Proben wird mit der Prüfung auf Sterilität nachgewiesen. Die Probennahme für die Untersuchung des Einwachsens erfolgt im Abstand von je zwei Wochen über den Zeitraum von acht Wochen nach der Herstellung.

### **3.9 Untersuchungsstrategien zur Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus der Primärverpackung**

Halbfeste Zubereitungen werden bei ihrer Entnahme aus der Primärverpackung üblicherweise durch Mikroorganismen, welche die menschliche Hautoberfläche besiedeln (Roth & James 1989; Hadaway 2003), kontaminiert. Im Folgenden werden zwei Strategien aufgezeigt, mit denen die Verschleppung von Keimen bei der

Entnahme untersucht werden kann. Darin wird getestet, ob Keime, die bei der Entnahme aus einer Tube die Oberfläche kontaminieren, bei der folgenden Entnahme nur in dieser Oberfläche auftreten. Des Weiteren wird überprüft, ob und wie weit die Keime in den der Oberfläche folgenden Produktstrang verschleppt werden und diesen kontaminieren.

### 3.9.1 Untersuchungsstrategie zur Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Einmalspritzen

In dieser Untersuchungsstrategie dienen sterile 10 ml-Einmalspritzen (BD Plastipak, BD, US-Franklin Lakes) als Tuben-Modelle. Da es jedoch bei Spritzen anders als bei Tuben möglich ist, sie so zu befüllen, dass die Entnahmetülle von der Zubereitung frei bleibt, ist es möglich, in diese eine Keimsuspension mit einer hohen Keimzahl einzubringen. Ziel ist, eine plane Cremeoberfläche über einen definierten Zeitraum mit möglichst hohen Keimzahlen in Kontakt zu bringen.

Hierfür werden die Spritzen aus einer weiteren Spritze, in der die halbfeste Zubereitung hergestellt wurde und auf die über einen Luer-Lock-Adapter weiblich/weiblich (Combifix Adapter, BBraun, D-Melsungen) ein Stück Silikonschlauch aufgesetzt ist, von der Rückseite her aseptisch befüllt (Abbildung 3-2 links). In die unbefüllte Tülle wird aus einer weiteren Spritze über eine Kanüle (BD Microlance, BD, US-Franklin Lakes) ca. 0,05 mL Keimsuspension mit einer Keimzahl von ca.  $2,5 \cdot 10^5$  KBE eingebracht (Abbildung 3-4).

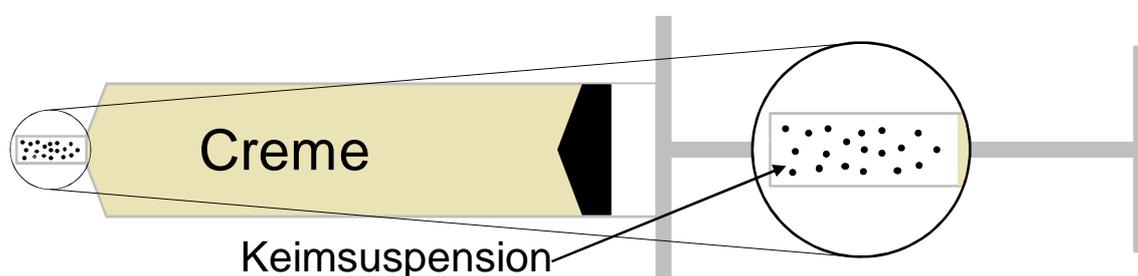


Abbildung 3-4: Befüllte Spritze mit Keimsuspension in der Tülle

Unmittelbar nach der Kontamination wird die Keimsuspension herausgedrückt. Der erste Millimeter des Produktstranges wird an einem sterilen Tuch abgewischt, wodurch die kontaminierte Oberfläche abgetragen wird. In einer Variation der Untersuchungsmethode wird an dieser Stelle als Zwischenschritt die Entnahmetülle

durch Eintauchen in Isopropanol 70 %, und anschließendes Verdunstenlassen desselbigen desinfiziert. Proben des Produktstranges von 1 mL werden in 15 mL-Reagenzgläser, die mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (flüssiges Medium A, Ph. Eur. 7.1 2.6.13) befüllt sind, gegeben, die dann bebrütet werden. Nach fünf Tagen wird ausgewertet, welche Proben steril und welche nicht steril sind.

### **3.9.2 Untersuchungsstrategie zur Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Tuben**

In dieser Untersuchungsstrategie werden unterschiedliche Tuben auf Verschleppung von Keimen bei der Entnahme von Cremes überprüft. Die zuvor dampfsterilisierten Tuben werden aus einer Spritze, in der die halb feste Zubereitung hergestellt wurde und auf die über einen Luer-Lock-Adapter weiblich/weiblich (Combifix Adapter, BBraun, D-Melsungen) ein Stück Silikonschlauch aufgesetzt ist, von der Rückseite her aseptisch mit jeweils 5 mL Creme befüllt und mit einer Tubenzange verschlossen. Falls vorhanden wird der Originalitätsverschluss mit dem Tubendeckel durchstoßen. Aus der Tube wird ein kurzer Produktstrang ausgedrückt und auf einem sterilen Tuch abgestreift, so dass an der Tüllenöffnung eine glatte Cremeoberfläche entsteht. Die Tülle wird zur Kontamination in Keimsuspension mit einer Keimzahl von ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE/mL eingetaucht. In einer Variation der Untersuchungsmethode wird an dieser Stelle als Zwischenschritt die Entnahmeöffnung durch Eintauchen in Isopropanol 70 % und anschließendes Verdunstenlassen desselbigen desinfiziert. Der folgende Produktstrang wird in Anteilen von jeweils 1 mL in 15 mL-Reagenzgläser, die mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (flüssiges Medium A, Ph. Eur. 7.1 2.6.13) befüllt sind, gegeben. Diese werden dann bebrütet. Nach fünf Tagen wird ausgewertet, welche Proben steril und welche nicht steril sind.

### **3.10 Untersuchung des Durchwachsens von Keimen durch Ölphasen**

Die Untersuchung, ob Mikroorganismen Ölphasen durchdringen können, erfolgt unter Verwendung von Franz-Zellen. Diese bieten die Möglichkeit, auf eine dünne Öl- oder Fettschicht Keimsuspension aufzubringen und auf der anderen Seite der Schicht eventuell durchgewachsene Keime zu erfassen.

Dazu werden Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membranfilter (11842-25-N, Sartorius Stedim, D-Göttingen) mit einem Porendurchmesser von 5  $\mu$ m und einer

Membranstärke von 100  $\mu\text{m}$  in Franz-Zellen eingespannt und mit der Ölphase getränkt. Eine Franz-Zelle ist, in ihrer eigentlichen Bestimmung, eine Freisetzungsapparatur, die aus zwei Glaskompartimenten besteht, welche durch eine Membran voneinander getrennt werden (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6) (Franz 1975).

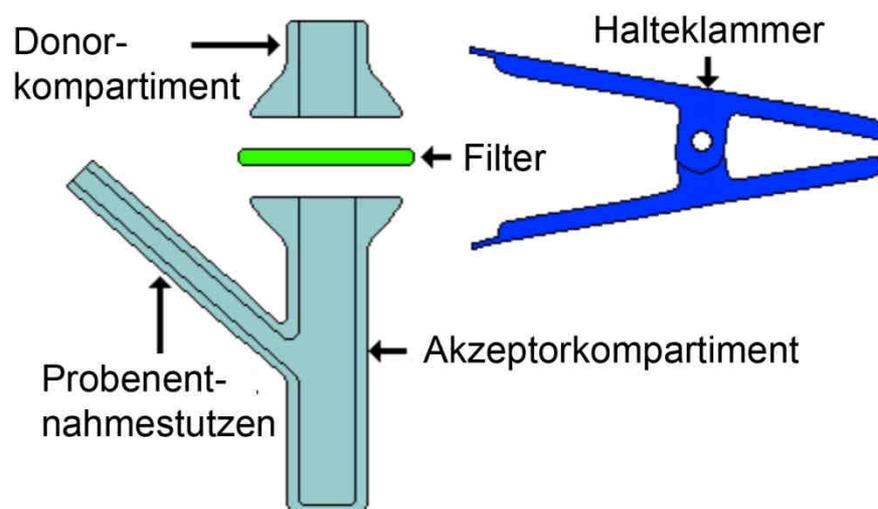


Abbildung 3-5: Schemazeichnung einer Franz-Zelle

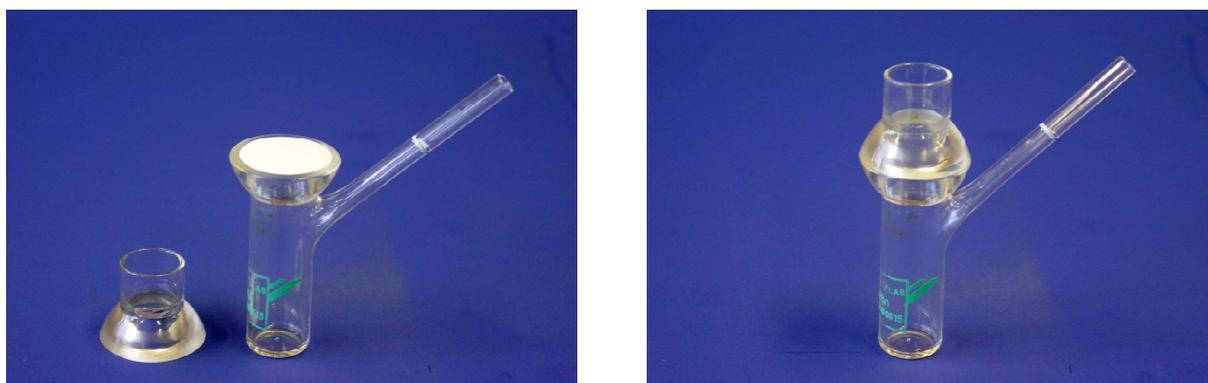


Abbildung 3-6: Franz-Zelle, links mit aufgelegter Filtermembran, rechts mit aufgesetztem Donorkompartiment

Da sich das Porenvolumen des Filters nicht genau bestimmen lässt, beträgt das aufgetragene Ölvolumen 177  $\mu\text{L}$ . Diese Menge ergibt sich, wenn man das Volumen als Produkt aus Innendurchmesser der Zelle und Membranstärke (theoretische Porosität von 100 %) errechnet. Dadurch ist gewährleistet, dass in jedem Falle alle Poren gefüllt sind und sich ein Ölfilm auf dem Filter ausbildet. Die zu

durchwachsende Ölschichtdicke liegt zwischen 100 und 200  $\mu\text{m}$ . Sie ergibt sich aus der Summe der Höhe der gefüllten Poren von 100  $\mu\text{m}$  und der Höhe des Ölfilms, der höchstens 100  $\mu\text{m}$  beträgt, da das Ölvolumen bei einer Porosität von 0 % auf der Membran diese Schichtdicke ergeben würde. Die Öle und Fettphasen werden zum Eintrag in den Filter mit Petrolether (1 + 2) gemischt, wodurch diese aufgrund der niedrigen Viskosität die Poren des Filters ausfüllen. Der Eintrag erfolgt portionsweise, wobei nach jedem Auftrag abgewartet wird, bis sich der Petrolether der Portion verflüchtigt hat.

Im oberen Donorkompartiment wird die Keimsuspension mit einer Keimzahl von ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE/mL, im unteren Akzeptorkompartiment unter Vermeidung von Luftblasen Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon eingebracht, um den Keimen, welche die Membran durchdringen, optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Durch den Probenentnahmestutzen werden Proben aus dem Akzeptorkompartiment gezogen und das entnommene Volumen durch Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon ersetzt.

Die Versuche werden unter Verwendung einer Laminar-Airflow-Arbeitsbank (NU-437-500-E, Nuaire, US-Plymouth) über einen Zeitraum von sieben Tagen mit täglichem Probenzug durchgeführt. Es werden Probenvolumina von 1 mL gezogen, die zur Prüfung auf Sterilität in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon über einen Zeitraum von fünf Tagen bebrütet werden.

Sterile Proben bedeuten, dass keine Keime die Ölphase durchwachsen haben, und nicht sterile Proben weisen auf ein Durchwachsen der Ölphase hin.

### 3.11 Test auf Varianzhomogenität

Um zu Prüfen, ob Untersuchungsdaten sich signifikant unterscheiden, wird ein Test auf Varianzhomogenität durchgeführt. Aus unter gleichen Bedingungen erhobenen Werten werden mit Gleichung 3-1 die Varianzen errechnet.

$$\text{var}(x) = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

$x_i$  Einzelwert

$\bar{x}$  Mittelwert

N Anzahl der Keimbestimmungen

Die Varianzen unterschiedlicher Untersuchungsreihen werden mit einem Test zur Varianzhomogenität (F-Test) auf signifikante Unterscheidung geprüft. Der F-Wert wird mit Gleichung 3-2 errechnet und mit einem tabellierten F-Wert ( $p = 0,01$ ) verglichen (Gottwald 2000).

$$F = \frac{\text{var}(x)_1}{\text{var}(x)_2} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

es gilt:  $\text{var}(x)_1 > \text{var}(x)_2$

Ist der errechnete Wert kleiner als der tabellierte Wert, so unterscheiden sich die Abweichungen der Werte nicht signifikant.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Modellformulierungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Rezepturen basieren überwiegend auf Standardrezepturen des DAB oder des DAC, die eine ausreichende Lagerstabilität über den gewählten Untersuchungszeitraum gewährleisten. Die Standardrezepturen wurden ausgewählt, da diese umfassend untersucht und beschrieben sind sowie häufig als Grundlage für pharmazeutische und kosmetische Produkte verwendet werden. Auszunehmen davon ist die W/O-Creme, die nicht in einem entsprechenden Kompendium beschrieben ist. Diese lipophile Creme sollte eine moderne wollwachsalkoholfreie Formulierung mit einem hohen Innenphasenanteil sein. Die Zusammensetzung der W/O-Creme wurde ausgehend von einer flüssigen Emulsion (Tabelle 4-1) und einer lipophilen Creme (Tabelle 4-2) erstellt und optimiert.

*Tabelle 4-1: Zusammensetzung der W/O-Emulsion als Basis für die Formulierung der W/O-Creme*

<b>Substanz</b>	<b>Teile</b>
Polyglyceryl-3 Diisostearat	1,25
Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearat	3,75
Mittelkettige Triglyceride	15
Octyldodecanol	15
Magnesiumsulfat	1
Glycerin 85%	5
Wasser	59

Tabelle 4-2: Zusammensetzung der lipophilen Creme als Basis für die Formulierung der W/O-Creme

Substanz	Teile
Polyglyceryl-3 Diisostearat	3
Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearat	3
Mittelkettige Triglyceride	8
Dicaprylyl Carbonat	8
Gebleichtes Wachs	1
Zinkstearat	1
Glycerin 85%	2
Butylenglycol	3
Magnesiumsulfat	1
Wasser	70

Die Lagerstabilität der in Tabelle 4-1 beschriebenen W/O-Emulsion ist so gering, dass bereits nach vierwöchiger Lagerung eine makroskopisch sichtbare Phasenseparation auftritt (Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: W/O-Emulsion kurz nach der Herstellung (links) und nach vierwöchiger Lagerung (rechts)

Dabei tritt die innere Wasserphase nach Außen und lagert sich am Boden des Gefäßes ab. Diese gebrochene Emulsion ist durch Schütteln nicht wieder rekonstituierbar. Damit ist es nicht möglich, die weiteren Untersuchungen durchzuführen, da die Zubereitungen hierfür über mehrere Monate lagerstabil, d. h. ohne Anzeichen einer Phasentrennung sein müssen. Des Weiteren weist die Emulsion keine Fließgrenze auf, wodurch die mikrobiologischen Untersuchungen weiter erschwert werden.

Die Zusammensetzung der in Tabelle 4-2 gezeigten Creme weist zwar eine ausreichende Lagerstabilität von mehr als einem Jahr auf (Lagerung bei Raumtemperatur und lichtgeschützt). Diese ist jedoch aufgrund der Verwendung von Glycerin und Butylenglycol, die potentiell antimikrobielle Wirkungen aufweisen (Dailey & Rosenwasser 1994; Smith 2000), unverändert nicht für die vorgesehenen mikrobiologischen Untersuchungen geeignet.

Als Emulgator für die W/O-Creme sollen die in Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 genannten Polyglycerinester verwendet werden. Die Anzahl der verwendeten Substanzen soll möglichst gering gehalten werden, um die Summe der Einflussfaktoren auf das Keimwachstum niedrig zu halten.

Aus den beiden gezeigten Rezepturen wird eine Formulierung zusammengestellt, die alle Anforderungen für die Untersuchungen dieser Arbeit erfüllt. Die beiden Emulgatoren sind darin zu gleichen Teilen enthalten, und die ölige Außenphase ist durch die Gerüstbildner gebleichtes Wachs und Zinkstearat stabilisiert und immobilisiert (Macierzanka, Szeląg et al. 2006). Die Formulierung wird weiter auf die Erfordernisse der Untersuchungen hin angepasst, indem auf Zusatz der mehrwertigen Alkohole Glycerin und Butylenglycol verzichtet wird. Diese Alkohole werden üblicherweise eingesetzt, um die Haut feucht zu halten, was für die Untersuchungen nicht von Belang ist, und zeigen potentiell antimikrobielle Wirkungen (Prickett, Murray et al. 1961; Dailey & Rosenwasser 1994), die hier unerwünscht sind. Als Öl, das die Grundlage der Lipidphase bildet, werden nur mittelkettige Triglyceride verwendet. Die Verwendung der Gerüstbildner gebleichtes Wachs und Zinkstearat ist für die Lagerstabilität und Konsistenz der Creme unerlässlich, da diese das kristalline Netzwerk der Außenphase aufbauen (Kutz, Daniels et al. 2011). Auch auf den Zusatz von Magnesiumsulfat kann nicht verzichtet werden, da die

---

Emulsion in der Wasserphase dadurch stabilisiert wird. Die so zusammengestellte Rezeptur, deren Zusammensetzung in Kapitel 3.2.1.2 gezeigt ist, ist eine streichfähige Creme, die auch nach einjähriger Lagerung keine Phasentrennung aufweist und damit für die Untersuchungen dieser Arbeit geeignet ist.

#### **4.2 Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus einer Primärverpackung**

In diesem Kapitel wird untersucht, ob die eingetragenen Keime beim Ausdrücken eines Cremestranges an der Oberfläche verbleiben und bei der nächsten Entnahme entfernt werden oder ob die eingetragenen Keime durch zeitweises Anhaften an der Primärverpackung in den Cremestrang verschleppt werden. Durch Variation der Behandlung vor der Produktentnahme mit und ohne Desinfektion wird untersucht, ob die Keime an der Oberfläche verbleiben und damit abgetötet werden, sich in Kanten und Sicken verbergen oder durch Adhäsion an das Verpackungsmaterial unzugänglich werden.

Dazu wird eine plane Creme-Oberfläche im Ansatzstück der Testverpackung mit einer Keimsuspension in Kontakt gebracht. Die Keimsuspension wird unmittelbar nach der Kontamination wieder entfernt, wodurch den Keimen kaum Zeit gelassen wird, in die Zubereitung einzudringen. Anschließend wird die kontaminierte Oberfläche abgestreift. Die in der Folge ausgedrückten Cremestränge werden auf Sterilität geprüft, um das Ausmaß der Keimverschleppung zu ermitteln.

### 4.2.1 Verwendete Primärpackmittel

Zur Untersuchung der Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Primärpackmitteln kommen sterile Einmalspritzen und verschiedene Tuben zum Einsatz.

Da eine sterile Einmalspritze von ihrer Geometrie einer Tube sehr ähnlich ist und sich für das Arbeiten unter aseptischen Bedingungen gut eignet, wird als Vorversuch zunächst die Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Einmalspritzen untersucht, die mit WWAS befüllt sind.

Um die Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Tuben praxisgerecht zu untersuchen, werden vier Tubenarten (Tabelle 4-3) mit unterschiedlichen Entnahmetüllen getestet. Diese Tuben unterscheiden sich im Material der Tülle, das aus Aluminium oder Polypropylen (PP) besteht, und in der Form der Tülle, die entweder breit und kurz (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3) oder schmal und spitz zulaufend ist. Eine Tube ist mit einem Originalitätsverschluss versehen, der aus einer Aluminiummembran besteht und die mit einem Dorn im Tubendeckel vor der ersten Entnahme durchstoßen werden muss.

*Tabelle 4-3: Tubenarten zur Untersuchung der Verschleppung von Keimen bei der Entnahme*

<b>Tube</b>	<b>Tüllenform</b>	<b>Tüllenmaterial</b>	<b>Originalitätsverschluß</b>
1	breit	Aluminium	nein
2	breit	Polypropylen	ja
3	spitz	Aluminium	nein
4	spitz	Polypropylen	nein



Abbildung 4-2: Tube 1 mit breiter Alu-Tülle



Abbildung 4-3: Tube 2 mit breiter PP-Tülle



Abbildung 4-4: Tube 3 mit schmaler Alu-Tülle



Abbildung 4-5: Tube 4 mit schmaler PP-Tülle

#### 4.2.2 Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Spritzen

Aus der kontaminierten Spritze werden nach Entfernung der Keimsuspension sechs Salbenstränge von jeweils 1 mL zur Prüfung auf Sterilität ausgedrückt. Ist die Probe verkeimt, wurden Keime bei der Entnahme in den jeweiligen Cremestrang verschleppt. Ist sie steril, wurden in den Cremestrang keine Keime verschleppt.

Die Untersuchungen werden jeweils mit und ohne Desinfektion der Cremeoberfläche durchgeführt.

In Tabelle 4-4 ist aufgeführt, welche Cremestränge nach dem Ausdrücken ohne vorherige Desinfektion mit Keimen kontaminiert sind. Tabelle 4-5 zeigt die Anzahl der verkeimten Cremestränge aus den Untersuchungen mit Desinfektion vor dem Ausdrücken. Je Testkeim werden drei Spritzen ausgedrückt. In den Tabellen ist jeweils diejenige der drei untersuchten Spritzen aufgeführt, aus der sich die größte Anzahl kontaminierter Cremestränge ausdrücken lässt.

*Tabelle 4-4: Prüfung auf Sterilität von Cremesträngen, die aus Spritzen ohne vorherige Desinfektion entnommen wurden; „+“ = verkeimt, „-“ = steril.*

<b>Ausgedrückter Cremestrang</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Escherichia coli	+	+	+	-	-	-
Candida albicans	-	-	-	-	-	-

Die Proben aus den Spritzen, die mit Escherichia coli kontaminiert sind, zeigen eine Verschleppung in die anschließend ausgedrückten Cremestränge. Mit Candida albicans kontaminierte Spritzen zeigen hingegen keine Verschleppung. Die Verschleppung der Bakterien ist wahrscheinlich durch Adhäsion an die Oberfläche des Spritzenmaterials (Dunne 2002) und verzögertes Wiedereintragen in den Cremestrang durch Scherung zu erklären. Cand. alb. zeigt eine solche Adhäsion an das Spritzenmaterial offensichtlich nicht und kann daher komplett mit der Cremeoberfläche entfernt werden.

*Tabelle 4-5: Prüfung auf Sterilität von Cremesträngen, die aus Spritzen nach erfolgter Desinfektion entnommen wurden; „+“ = verkeimt, „-“ = steril.*

<b>Ausgedrückter Cremestrang</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Escherichia coli	+	-	-	-	-	-
Candida albicans	-	-	-	-	-	-

Die Anzahl der verkeimten Cremestränge ist bei den mit Escherichia coli kontaminierten Spritzen im Vergleich zu den nicht desinfizierten Spritzen reduziert. Bei den Spritzen, die mit Candida albicans kontaminiert sind, wird wiederum keine Verschleppung nachgewiesen. Durch die Desinfektion wird die Anzahl der überlebenden Bakterien reduziert. Daraus lässt sich erkennen, dass ein großer Anteil der Bakterien für das Desinfektionsmittel zugänglich ist, sich jedoch einige durch Adhäsion an das Spritzenmaterial der Desinfektion entziehen.

### 4.2.3 Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Tuben

Die Untersuchungen werden mit WWAS aus der Gruppe der lipophilen Cremes und mit WHS aus der Gruppe der hydrophilen Cremes durchgeführt. Die Kontamination der befüllten Tuben erfolgt durch Eintauchen in Keimsuspension mit einer Keimzahl von ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE/mL. Die Cremeoberfläche im Ansatzstück wird direkt im Anschluss an die Kontamination abgestreift und die folgenden Cremestränge in 1 mL-Portionen zur Prüfung auf Sterilität entnommen. Es erfolgen Testreihen mit und ohne Desinfektion nach dem Abstreifen. Des Weiteren wird der Einfluss einer Konservierung mit 20 % Propylenglycol in der Wasserphase auf die Verschleppung der Keime untersucht.

#### 4.2.3.1 Entnahme nicht konservierter Cremes

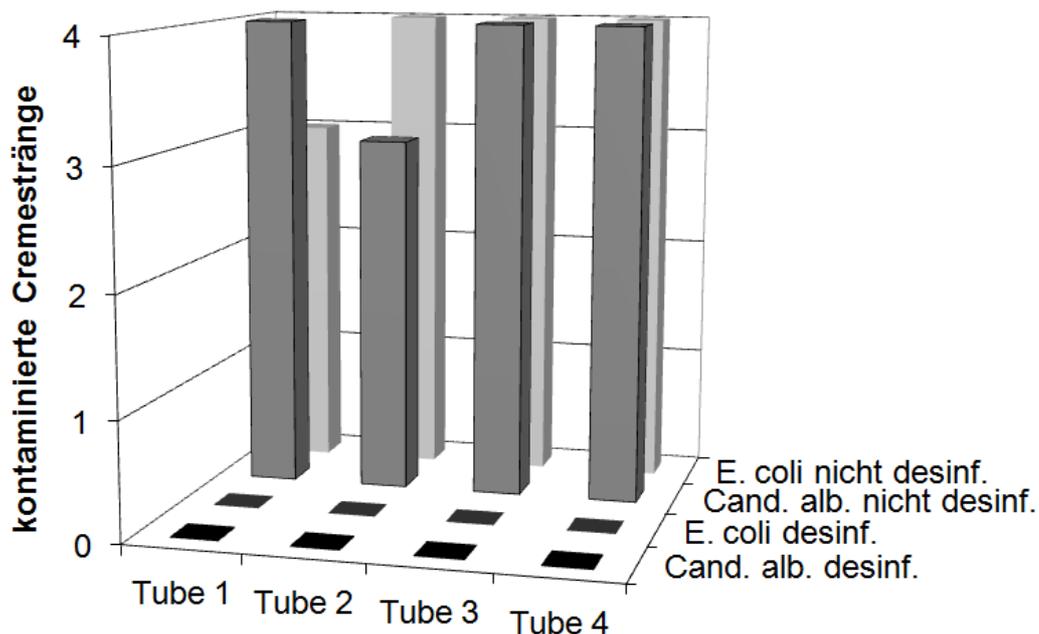


Abbildung 4-6: kontaminierte Cremestränge bei der Entnahme von nicht konservierter WHS aus Tuben

Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7 zeigen, dass Verschleppungen von Keimen in hohem Ausmaß stattfinden, wenn das Tubenansatzstück vor der Entnahme nicht desinfiziert wird.

Eine stark unterschiedliche Anzahl kontaminierter Cremestränge ist weder zwischen den untersuchten Tubenarten noch zwischen der WWAS und der WHS zu erkennen. Beide Testkeime verhalten sich gleich, was bedeutet, dass sie vergleichbar stark an Oberflächen, Kanten und Sicken der unterschiedlichen Ansatzstücke zurückgehalten werden. Hierbei ist insbesondere weder ein Unterschied zwischen den Tubenmaterialien noch zwischen den Formen der Ansatzstücke erkennbar.

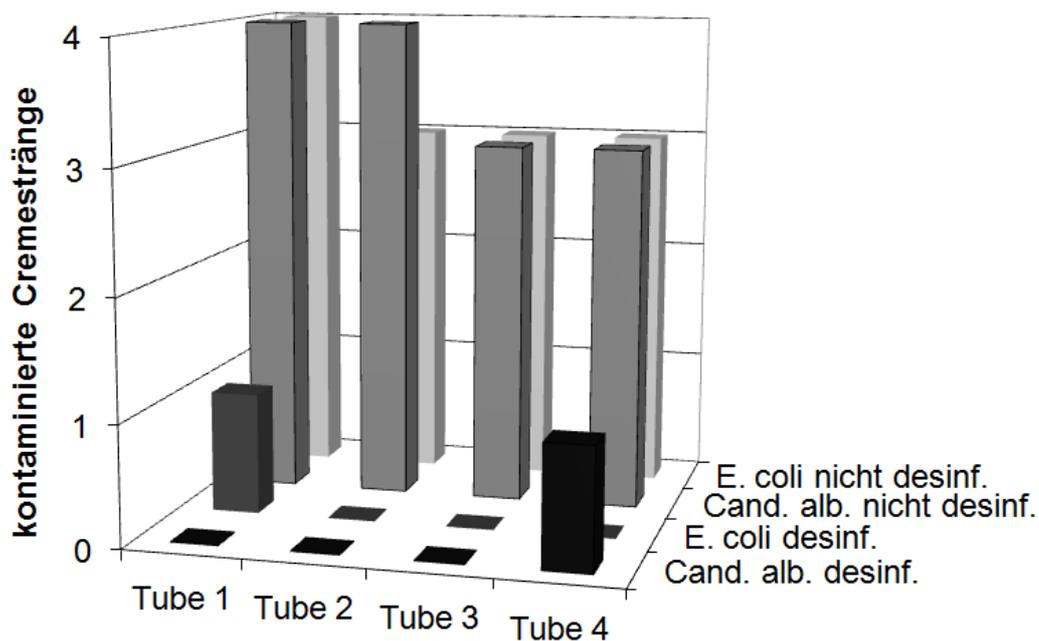


Abbildung 4-7 kontaminierte Cremestränge bei der Entnahme von nicht konservierter WWAS aus Tuben

Wenn das Ansatzstück der Tube vor der Entnahme der Cremestränge desinfiziert wird, findet eine Verschleppung überlebensfähiger Keime nicht oder nur in geringem Ausmaß statt. Daraus lässt sich ableiten, dass die Kontamination tatsächlich nur an der Oberfläche der Creme und des Ansatzstückes stattfindet. Ein Eindringen der Keime ins Innere der Creme, wo diese nicht für das Desinfektionsmittel zugänglich sind, findet nicht statt.

Da in den Versuchen mit 4 von 5 mL der größte Anteil des Tubeninhaltes untersucht wird, kann nicht unterschieden werden, ab welchem Cremestrang letztlich keine Kontamination nachzuweisen wäre. Die Einzeldosierung einer Creme erreicht

allerdings selten eine Menge von 4 mL, wodurch dies auch als nicht praxisrelevant zu betrachten ist. Dies gilt insbesondere unter Betrachtung dessen, dass die Haut eines Erwachsenen eine Fläche von ca. 1,8 m<sup>2</sup> annimmt (Thews, Mutschler et al. 2007) und mit 4 mL bei einer üblichen Auftragemenge von ca. 2 mg/cm<sup>2</sup> ca. 0,2 m<sup>2</sup> eingecremt werden können. Legt man die 9er Regel nach Wallace zugrunde (Kammel 2010), kann damit z.B. mehr als ein ganzer Arm oder die halbe Rumpfvorderseite abgedeckt werden.

#### 4.2.3.2 Entnahme konservierter Cremes

Zur Untersuchung des Effektes einer Konservierung wird den Cremes 20 % Propylenglycol bezogen auf die Wasserphase zugesetzt. Die Werte werden zunächst entsprechend der Vorgehensweise bei den nicht konservierten Cremes erhoben und mit diesen verglichen. Im Weiteren werden Tuben mit konservierten und nicht konservierten Cremes nach der Kontamination unverschlossen unter keimarmen Bedingungen für 24 h gelagert und danach die Werte erhoben und miteinander verglichen.

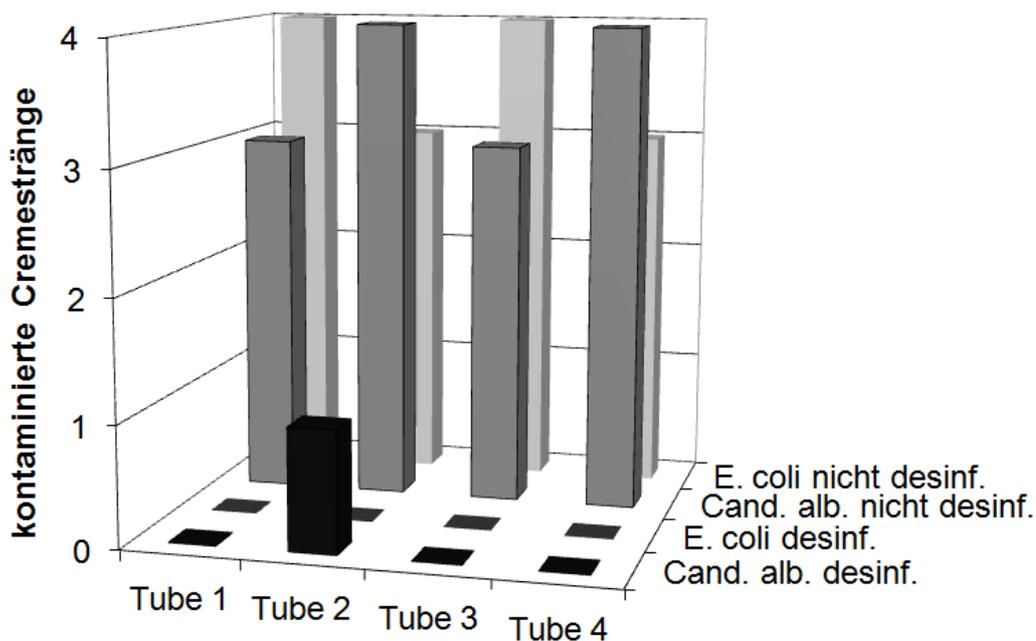


Abbildung 4-8: kontaminierte Cremestränge bei der Entnahme von konservierter WHS aus Tuben

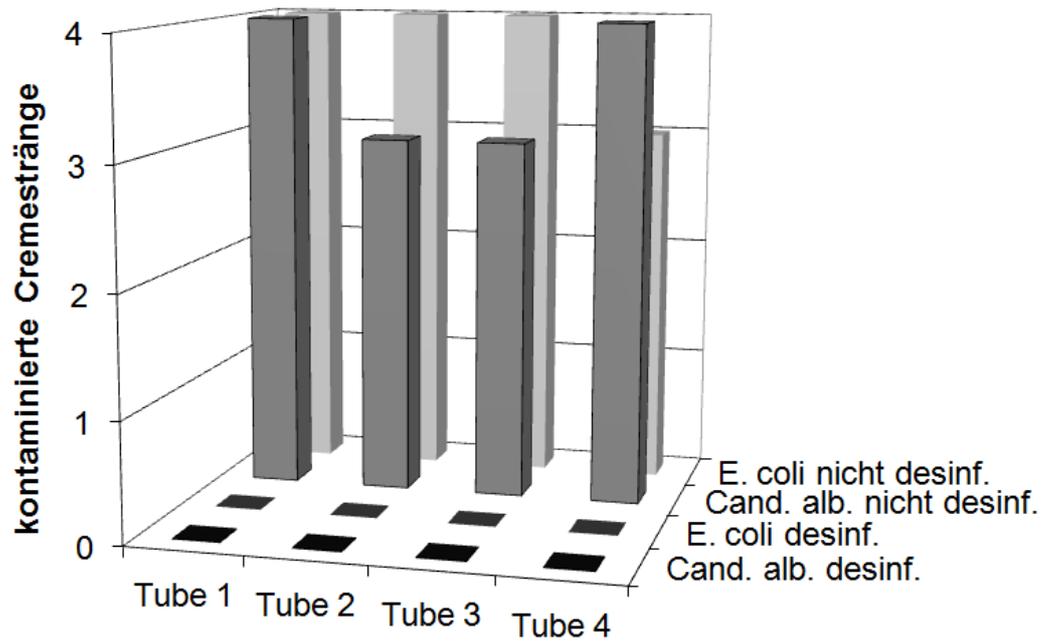


Abbildung 4-9: kontaminierte Cremestränge bei der Entnahme von konservierter WWAS aus Tuben

Die konservierten Cremes zeigen eine ausgeprägte Verschleppung von Keimen, wenn vor der Probennahme nicht desinfiziert wird, und keine Verschleppung nach erfolgter Desinfektion (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Dabei ist kein eindeutiger Unterschied zwischen den Proben der unterschiedlichen Cremes und den beiden Testkeimen zu erkennen.

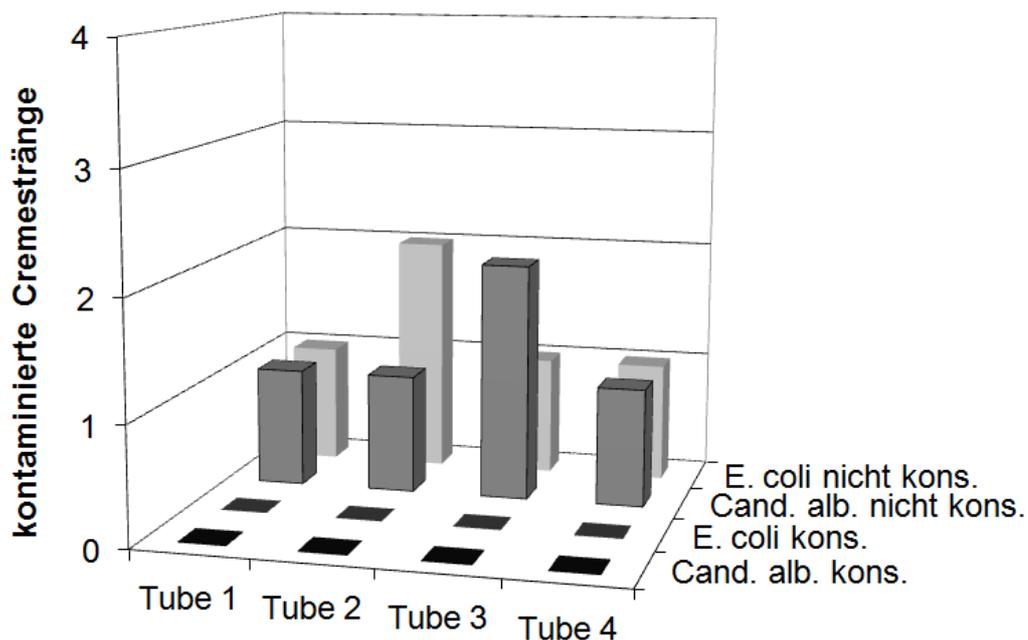


Abbildung 4-10: Vergleich kontaminierter Cremestränge bei der Entnahme von konservierter und nicht konservierter WHS aus Tuben nach steriler Lagerung für 24 h

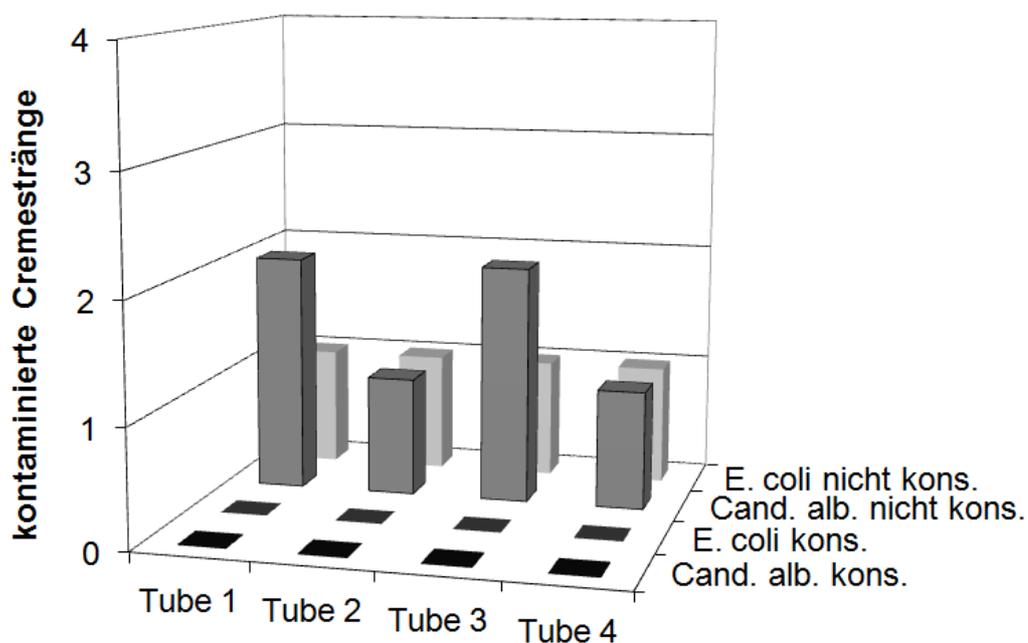


Abbildung 4-11: Vergleich kontaminierter Cremestränge bei der Entnahme von konservierter und nicht konservierter WWAS aus Tuben nach steriler Lagerung für 24 h

Aus Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11 ist zu entnehmen, dass die Anzahl der kontaminierten Cremestränge nach 24-stündiger Lagerung ohne Desinfektion bei höchstens zwei liegt, das entspricht einer Entnahmemenge von 2 mL. Nach Desinfektion findet keine Verschleppung der Keime statt.

Ein Vergleich zwischen den Ergebnissen bei den nicht konservierten Cremes (Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7) sowie bei den konservierten Cremes (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9) zeigt, dass der Zusatz eines antimikrobiell wirksamen Stoffes zur Wasserphase der Cremes die Verschleppung von Keimen bei der Entnahme aus Tuben zunächst nicht beeinflusst. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der antimikrobiell wirksamen Substanz, die in der Oberfläche nur in geringer Menge zur Verfügung steht, nicht genügend Zeit gegeben wird, ihre zellschädigende Wirkung auf die Keime auszuüben.

Der Vergleich der Anzahl kontaminierter Cremestränge nach 24-stündiger Lagerung (Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11) und sofortiger Untersuchung (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9) offenbart eine eindeutige Verminderung bei den Proben, die ohne Desinfektion genommen werden. Die Reduktion bei den nicht konservierten Cremes lässt sich durch das Verdunsten des Wassers der Keimsuspension erklären, wodurch die Überlebenschancen für die Keime reduziert werden. Bei allen konservierten Cremes kann keine Verschleppung der Keime beobachtet werden, was darauf zurückzuführen ist, dass das antimikrobiell wirksame Propylenglycol (Wallhäußer 1995) zusätzlich zu den ungünstigen Überlebensbedingungen innerhalb der 24-stündigen Lagerung seine Wirkung entfalten kann.

### **4.3 Durchwachsen von Keimen durch Ölschichten**

Im Zusammenhang mit dem Hygienerisiko von lipophilen Cremes ist es von großem Interesse, ob Keime in der Lage sind, durch die lipophile Phase von Tropfen zu Tropfen zu wandern. Dies wird untersucht, indem eine Keimsuspension mit hoher Keimzahl von ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE/mL auf eine dünne Ölschicht (100-200  $\mu\text{m}$ ) aufgebracht wird. Auf der Gegenseite der Membran werden eventuell durchgewachsenen Keimen mit CaSo-Boullion optimale Lebensbedingungen gestellt, wie in Kapitel 3.10 beschrieben.

Untersucht werden die Öle, welche Bestandteil der Fettphasen der in dieser Arbeit verwendeten Cremes sind, sowie üblicherweise in pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzte Öle unterschiedlicher Polaritäten, die aufgrund ihrer Oberflächenspannungen abgeschätzt werden (Halpern 1949).

Außerdem werden die Fettphasen der in dieser Arbeit verwendeten Cremes, die halb feste Salben sind, untersucht. Die Salben unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Kristalloide und damit im Aufbau ihrer inneren Struktur (siehe Kapitel 2.3). Die Probenzahlen betragen jeweils  $n = 3$ .

Verwendete Öle:

<b>Öl</b>	<b>Oberflächenspannung [mN/m] bei 20 °C</b>
– dickflüssiges Paraffin	33,1
– mittelkettige Triglyceride (MCT)	33,4
– Erdnussöl	35,5
– Rizinusöl	39,0

Verwendete Fettphasen:

- Wollwachsalkoholsalbe
- Hydrophile Salbe
- Fettphase der nichtionischen hydrophilen Creme
- Fettphase der W/O-Creme

Eine nicht mit Ölphase getränkte Trennmembran (PTFE, Porenweite 5  $\mu\text{m}$ , Membranstärke 100  $\mu\text{m}$ ) kann von den Testkeimen in weniger als einem Tag durchwachsen werden. Dies wurde in einem Vorversuch nachgewiesen.

Die aus dem Akzeptorkompartiment der Franz-Zellen gezogenen Proben sind bei allen untersuchten Fettphasen zu allen Untersuchungszeitpunkten steril. Ein Durchwachsen der Keime durch den Öl- oder Fettphasenfilm findet nicht statt. Eine Untersuchung der Keimsuspension im Donorkompartiment wird bei allen

Probenzügen mitgeführt und zeigt, dass in diesem über den gesamten Untersuchungszeitraum Keime vorhanden sind.

Die Durchmesser von Mikroorganismen reichen von ca. 0,2 bis 1  $\mu\text{m}$  bei den Bakterien bis zu ca. 2 bis 5  $\mu\text{m}$  bei den Pilzen (Wallhäußer 1995). Ein Vergleich dieser Dimensionen mit der Stärke der zu überwindenden überlebensfeindlichen Schicht zeigt, dass die Mikroorganismen den Kontakt zur Wasserphase aufgeben müssten, um durch die Schicht zu diffundieren, d. h. die Keime müssten eine 100 bis 200  $\mu\text{m}$  starke Lipidschicht, wie sie im beschriebenen Experiment vorliegt, vollständig ohne Kontakt zu Wasser überwinden.

#### **4.4 Keimwachstum in lipophilen Cremes**

Zur Beurteilung des Hygienierisikos einer halbfesten Zubereitung mit wässriger Innenphase ist es zunächst wichtig, das Verhalten der Keime in diesen Cremes zu betrachten. Hiermit kann abgeschätzt werden, welches Hygienierisiko von der Keimbelastung der Creme nach der Herstellung ausgeht.

Um das Wachstumsverhalten von Keimen in einer dispersen wässrigen Phase zu untersuchen, wird eine definierte Anzahl an Testkeimen gleichmäßig auf die Wasserphase der Creme verteilt. Das gleichmäßige Verteilen der Testkeime in halbfesten Zubereitungen ist aufgrund der hohen Viskosität nicht einfach zu gewährleisten, da das Mischen erheblich erschwert ist. Um sicherzustellen, dass die Keime gleichmäßig in der Zubereitung verteilt sind, werden diese vor der Herstellung der Creme der Wasserphase zugefügt. Im Anschluss erfolgt das Mischen und Homogenisieren der Öl- und Wasserphase. Die Keime durchlaufen ihren Vegetationszyklus dann in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen in der Wasserphase, während die Creme gelagert wird. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Die Keimzahl wird unmittelbar nach der Herstellung und zu definierten Zeitpunkten während 28 Tagen bestimmt.

Zur Bestimmung der Keimzahlen in den Cremes werden Verdünnungsreihen hergestellt und geeignete Verdünnungen nach der „Membranfiltermethode“ Ph. Eur. 2.6.12 (EAB 2011) auf Agarplatten gegeben. Die Anzahl der Spülvorgänge bei der Membranfiltration wird auf einen reduziert. Als Verdünnungsmedium wird NaCl-Pepton-Puffer verwendet, dem zum Brechen der W/O-Emulsion 0,5 %

Polysorbat 80 zugegeben ist. Sowohl für die Reduzierung der Spülvorgänge als auch für den Zusatz von Polysorbat 80 wird eine Methodvalidierung durchgeführt.

#### 4.4.1 Methodvalidierung zur Membranfiltration

##### 4.4.1.1 Einfluss von Polysorbat 80 auf das Keimwachstum auf Agarplatten

Da Polysorbat 80 in höheren Konzentrationen einen antimikrobiellen Effekt aufweisen kann (Naraifumi, Hajime et al. 2002), soll geklärt werden, ob bereits der Zusatz von 0,5 % Polysorbat 80 einen Einfluss auf das Wachstum der Testkeime auf den Agarplatten bei der Membranfiltrationsmethode hat.

Dazu werden Keimsuspensionen der beiden Testkeime mit Keimzahlen von ca.  $5 \cdot 10^6$  KBE/mL hergestellt und diese in Verdünnungsreihen auf ca. 50 KBE verdünnt. Als Verdünnungsmedium wird NaCl-Pepton-Puffer verwendet, dem in einer der beiden Versuchsreihen 0,5 % Polysorbat 80 zugesetzt ist. Die Proben der höchsten Verdünnungsstufe werden zur Keimzahlbestimmung auf Membranfilter aufgebracht, diese werden fünf Tage lang auf Agarplatten bebrütet.

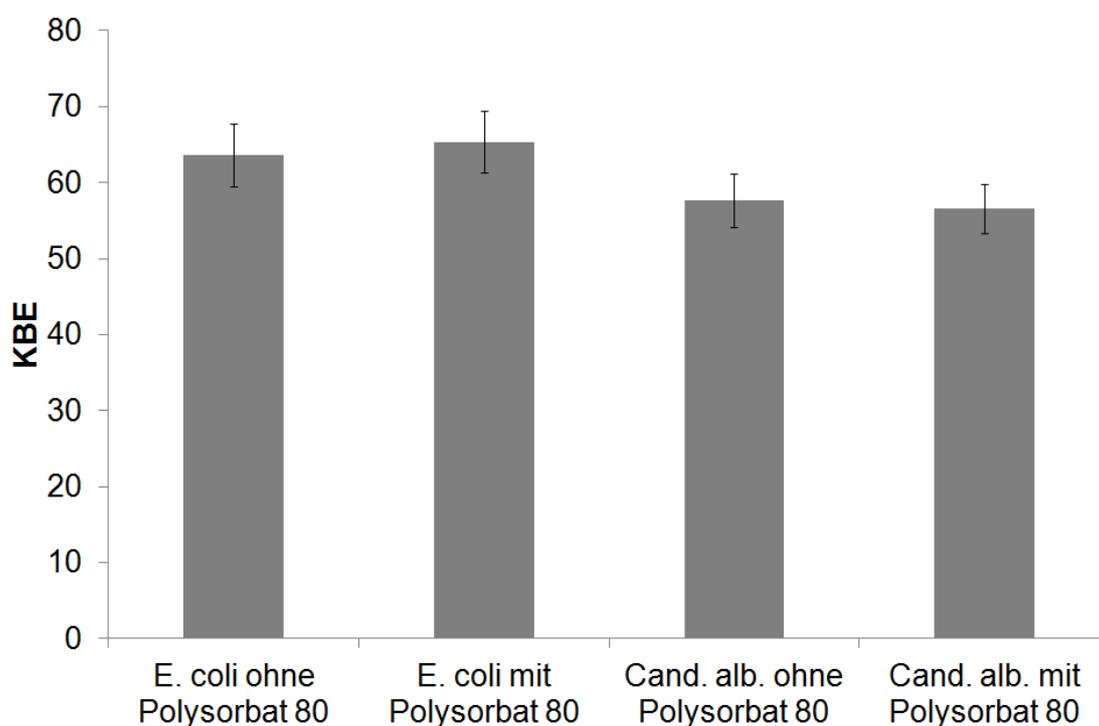


Abbildung 4-12: Einfluss von 0,5 % Polysorbat 80 im Verdünnungsmedium auf Keimwachstum ( $n = 3$ , Fehlerbalken = Standardabweichung)

Abbildung 4-12 zeigt die ausgezählten Keimzahlen der jeweils gleichen Testkeime mit und ohne Zusatz von Polysorbat 80. In Tabelle 4-6 sind die Ausgezählten Keimzahlen und deren Varianzen aufgeführt. Tabelle 4-7 zeigt die F-Werte im Vergleich zu den entsprechenden Tabellenwerten des Tests auf Varianzhomogenität. Die Varianzen sind mit Gleichung 3-1 und die F-Werte mit Gleichung 3-2 wie in Kapitel 3.11 dargestellt berechnet.

Tabelle 4-6: *Varianzen der Keimzahlen mit und ohne Zusatz von Polysorbat*

Testkeim	E. coli		Cand. alb.	
	+	-	+	-
Probe 1	66	65	59	58
Probe 2	61	67	53	61
Probe 3	69	59	58	54
<b>Varianz</b>	<b>10,89</b>	<b>11,56</b>	<b>6,89</b>	<b>8,22</b>

Tabelle 4-7: *F-Werte des Test auf Varianzhomogenität mit und ohne Zusatz von Polysorbat 80*

	Vergleich mit und ohne Zusatz von 0,5 % Polysorbat 80	Tabellenwert (p = 0,01) (n = 3)
Escherichia coli	1,06	99,0
Candida albicans	1,19	99,0

Die F-Werte liegen für die Vergleiche beider Testkeime unter dem tabellierten F-Wert. Der Test auf Varianzhomogenität zeigt damit keinen signifikanten Unterschied der Ausgezählten Keimzahlen. Daraus lässt sich ableiten, dass der Zusatz von 0,5 % Polysorbat 80 zum Verdünnungsmedium NaCl-Pepton-Puffer sich nicht auf das Keimwachstum bei der Keimzahlbestimmung auswirkt. Die mit dieser Methode

bestimmten Keimzahlen können daher für die Auswertung der Untersuchungen herangezogen werden.

#### **4.4.1.2 Reduktion der Anzahl der Spülvorgänge bei der Membranfiltration**

Die Membranfiltration wird in Anlehnung an das Kapitel „Mikrobiologische Prüfung nicht steriler Produkte: Zählung der gesamten vermehrungsfähigen Keime“ Ph. Eur. 2.6.12 (EAB 2011) durchgeführt. Die Prüfung sieht vor, dass nach Aufbringen der mit Keimen kontaminierten Probe auf ein Membranfilter dreimal mit einem geeigneten Medium gespült wird. Die Methode sieht allerdings auch vor, dass die Anzahl von drei Spülvorgängen reduziert werden kann, wenn dies entsprechend validiert wird.

Die Anzahl der Spülvorgänge wird in getrennten Untersuchungsreihen auf einen und zwei reduziert, um zu überprüfen, ob sich damit die gleichen Keimzahlen bestimmen lassen.

Dazu werden Keimsuspensionen mit Keimzahlen von ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE/mL hergestellt. Durch Verdünnungsreihen werden Keimsuspensionen mit ca. 50 KBE erhalten, die jeweils auf einen Membranfilter einer dreifachen Membranfiltrationseinheit aufgebracht werden. Je einer der drei Membranfilter wird einmal, zweimal oder dreimal mit 100 mL NaCl-Pepton-Puffer gespült und im Anschluss zur Bebrütung auf eine Agarplatte überführt. Pro Testkeim werden drei unabhängig voneinander hergestellte Keimsuspensionen untersucht, mit denen je drei Untersuchungsreihen durchgeführt werden. Daraus resultiert eine Probenzahl von  $n = 9$ .

Die Keimzahl der eingesetzten Keimsuspensionen kann nicht standardisiert werden. Daher wird bei jeder Untersuchungsreihe die Ausgangskeimzahl bestimmt und die später erhobenen Keimzahlen als Verhältniszahlen zu diesen angegeben. D. h. die in den Tabellen aufgeführten Werte geben an, wie viel Prozent der Ausgangskeimzahl bei der jeweiligen Untersuchung nachgewiesen werden.

In Tabelle 4-8 sind die relativierten Keimzahlen und deren Varianzen innerhalb einer Gruppe mit gleicher Behandlung aufgeführt.

*Tabelle 4-8: Keimzahlen bei unterschiedlicher Anzahl der Spülvorgänge, relativiert zum Mittelwert der Probenbestimmung*

Spülvorgänge	1	2	3	1	2	3
<b>Testkeim</b>	<b>E. coli</b>			<b>Cand. alb.</b>		
Probe 1-1	100,82	97,67	102,38	100,00	99,17	100,86
Probe 1-2	103,28	102,33	104,76	105,13	96,69	106,03
Probe 1-3	95,90	100,00	92,86	94,87	104,13	93,10
Probe 2-1	100,00	120,73	103,33	100,00	107,61	108,14
Probe 2-2	110,34	84,15	96,67	109,68	94,57	101,16
Probe 2-3	89,66	95,12	100,00	90,32	97,83	90,70
Probe 3-1	100,82	97,67	102,38	104,03	95,24	103,20
Probe 3-2	103,28	102,33	104,76	101,61	104,76	103,20
Probe 3-3	95,90	100,00	92,86	94,35	100,00	93,60
Varianz	33,81	90,82	22,62	36,33	20,77	37,54

*Tabelle 4-9: F-Werte des Test auf Varianzhomogenität bei unterschiedlichen Anzahlen der Spülvorgänge*

	Vergleich ein Spülvorgang gegenüber zwei Spülvorgängen	Vergleich ein Spülvorgang gegenüber drei Spülvorgängen	Tabellenwert (p = 0,01) (n = jeweils 9)
Escherichia coli	2,69	1,49	6,09
Candida albicans	1,75	1,03	6,09

Die F-Werte liegen sowohl beim Vergleich von einem zu zwei Spülvorgängen als auch beim Vergleich von einem zu drei Spülvorgängen bei beiden untersuchten Testkeimen unter dem tabellierten F-Wert (Tabelle Tabelle 4-9). Die bestimmten Keimzahlen in den Untersuchungsgruppen unterscheiden sich damit nicht signifikant.

Damit ist der dokumentierte Nachweis erbracht, dass die Methode auch bei nur einem einzigen Spülvorgang zu einem wahren Ergebnis führt, d. h. die Methode ist als validiert anzusehen.

Die Anzahl von nur einem Spülvorgang bei der Membranfiltration kann unter den gewählten Bedingungen für die hier vorliegenden Untersuchungen angewandt werden.

#### **4.4.2 Keimzahlentwicklung in der Wasserphase**

Falls sich Keime in der Innenphase einer nicht steril hergestellten lipophilen Creme vermehren können, ist ein Zusatz von Konservierungsmittel unerlässlich. Findet jedoch keine Vermehrung der Keime statt, ist für das Hygienerisiko in erster Linie die Keimbelastung nach der Herstellung maßgeblich.

Nach dem europäischen Arzneibuch wird das Hygienerisiko anhand der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ Ph. Eur. 5.1.3 (EAB 2011) bestimmt (die Prüfung wird auch als „Konservierungsmittelbelastungstest“ (KBT) bezeichnet). Die Untersuchungen zur Entwicklung der Keimzahlen in der Wasserphase in lipophilen Cremes werden in Anlehnung daran durchgeführt. Der KBT wird jedoch dahingehend abgewandelt, dass die Testkeime nicht der Creme untergemischt werden, sondern schon vor der Herstellung in der Wasserphase verteilt werden, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten.

Die Wasserphasen der WWAS und W/O-Creme werden mit Suspensionen der Testkeime beimpft, so dass eine Keimbelastung von ca.  $5 \cdot 10^4$  KBE/mL Creme resultiert. Die genaue Keimzahl wird direkt nach der Herstellung durch Verdünnungsreihen und Membranfiltration bestimmt. Die Proben werden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Weitere Probenzüge zur Keimzahlbestimmung erfolgen, analog des KBT, an den Tagen 2, 7, 14 und 28.

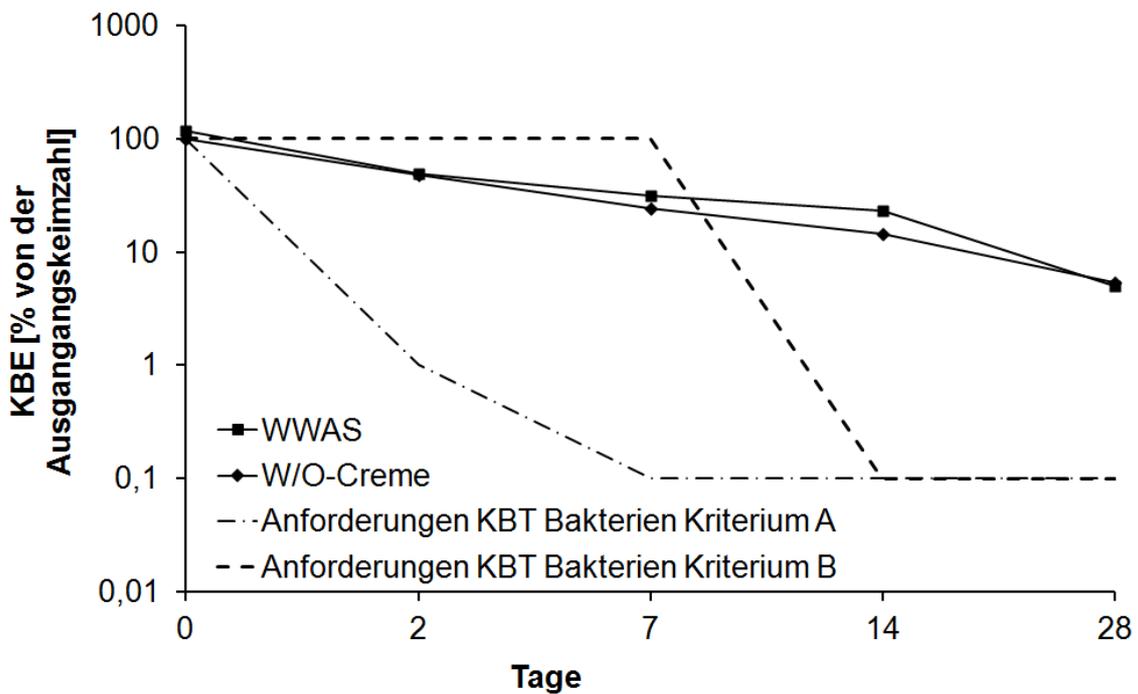
Tabelle 4-10 Zeigt die Keimzahlen in den untersuchten Cremes.

Tabelle 4-10: Keimzahlen in lipophilen Cremes nach Beimpfung mit Testkeimen

WWAS										
Testkeim	E. c.	C. a.								
Tag	0		2		7		14		28	
Probe 1	120	29	48	38	46	21	27	7	5	4
Probe 2	112	32	60	36	24	17	22	4	6	7
Probe 3	119	24	39	50	24	14	21	9	4	6
Mittelwert	117	28	49	41	31	17	23	7	5	6

W/O-Creme										
Testkeim	E. c.	C. a.								
Tag	0		2		7		14		28	
Probe 1	81	98	39	81	19	39	14	18	4	7
Probe 2	77	102	36	76	22	45	10	16	5	4
Probe 3	82	103	40	82	17	38	11	12	4	5
Mittelwert	80	101	38	80	19	41	12	15	4	5

Abbildung 4-13: Keimzahlentwicklung von *E. coli* in lipophilen Cremes; halblogarithmische Darstellung, (n = 3)

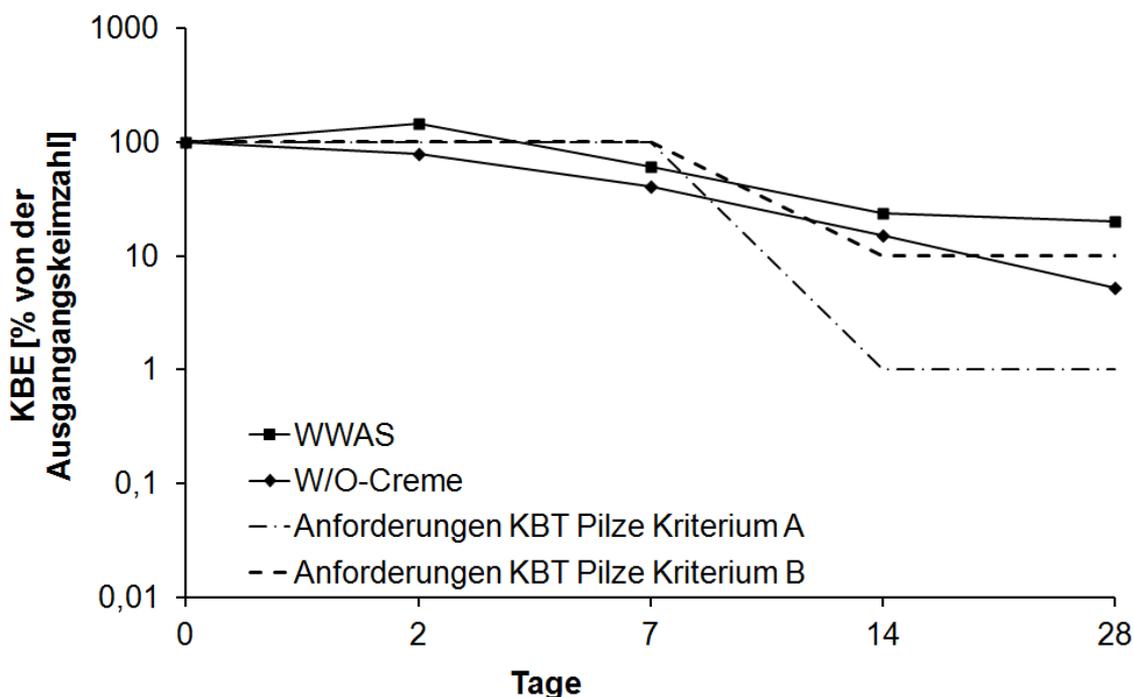


Abbildung 4-14: Keimzahlentwicklung von *Cand. alb.* in lipophilen Cremes; halblogarithmische Darstellung, ( $n = 3$ )

Die Keimzahlen nehmen über den Untersuchungszeitraum sowohl nach Beimpfung mit *E. coli* (Abbildung 4-13) als auch nach Beimpfung mit *Cand. alb.* (Abbildung 4-14), stetig ab, obwohl keiner der beiden Formulierungen Konservierungsmittel zugesetzt wurden. Die Reduktion der Keimzahl in den W/O-Cremes entspricht jedoch nicht den im KBT geforderten log-Reduktionsstufen, weder das Kriterium A noch das schwächere Kriterium B können erfüllt werden. Ein eindeutiger Unterschied der Keimzahlreduktionen ist weder zwischen den beiden untersuchten Rezepturen noch zwischen den Testkeimen zu sehen.

Aus diesen Untersuchungen lässt sich erkennen, dass sich die beiden Testkeime in der Wasserphase der lipophilen Cremes nicht vermehren. Da diese offensichtlich keine geeigneten Lebensbedingungen vorfinden, nimmt ihre Anzahl stetig ab. Keime die in eine Wasserphase eingebracht werden, vermehren sich offensichtlich nicht zwangsläufig. Dies steht im Gegensatz zu der üblichen Auffassung, die in vielen Lehrbüchern (Schöffling 1998; Bauer, Frömming et al. 2006; Voigt 2010) und im NRF (NRF 2010) vertreten wird.

#### **4.5 Einwachsen von Keimen in halbfeste Zubereitungen**

Bei der Entnahme einer halbfesten Zubereitung aus einer Tube oder Kruke wird deren Oberfläche mit Hautkeimen kontaminiert. (Roth & James 1989). Um dieses Hygienierisiko zu beurteilen, werden Keime auf die Oberfläche von halbfesten Zubereitungen aufgetragen. Es wird untersucht, ob die Keime im Inneren der Zubereitung wiedergefunden werden.

##### **4.5.1 Entwicklung der Untersuchungsstrategie zum Einwachsen von Keimen in halbfeste Zubereitungen**

Zur Charakterisierung des Eindringens von Keimen ins Innere einer halbfesten Zubereitung, nachdem diese auf die Oberfläche aufgebracht wurden, bedarf es einer geeigneten Untersuchungsstrategie. Diese muss gewährleisten, dass eine ausreichend große Oberfläche der Zubereitung mit hohen Keimzahlen in Kontakt gebracht und über einen längeren Zeitraum gelagert werden kann. Des Weiteren muss eine Probe aus dem Inneren der Zubereitung entnommen werden können, ohne dass dabei eine Schmierinfektion durch Keime an der Oberfläche erfolgt. In der Probe nachgewiesene Keime dürfen ausschließlich durch Wachstum oder Diffusion während der Lagerung ins Innere der Zubereitung gelangt sein.

Ein Modell, das für solche Untersuchungen geeignet ist, stellt eine Einmalspritze dar, die teilweise mit der Zubereitung und teilweise mit einer Keimsuspension befüllt ist, zwischen denen sich eine Grenzfläche ausbildet. In die Spritzenwand ist ein Loch gebohrt, durch das eine Probe aus dem Inneren der Zubereitung entnommen werden kann.

Als Primärpackmittel kommen sterile Einmalspritzen zum Einsatz, die aus Polypropylen und Isopren bestehen und daher autoklavierbar sind. Diese werden zu vier Fünfteln mit der Zubereitung befüllt, das verbleibende Volumen zur Beimpfung wird mit Keimsuspension aufgefüllt. Die Grenzfläche zwischen Zubereitung und Keimsuspension soll dabei möglichst plan sein, um einerseits ihre Größe und andererseits den Abstand zwischen Grenzfläche und dem Probennahmeort möglichst exakt definieren zu können.

Abbildung 4-15 zeigt ein an den praktischen Gegebenheiten orientiertes Modell zur Umsetzung der Anforderungen, bei dem zunächst die Zubereitung eingefüllt und

danach durch das Ansatzstück die Keimsuspension auf die Oberfläche aufgetragen wird. Zum Probenzug wird bei diesem Modell die Keimsuspension durch das Ansatzstück quantitativ entfernt. Danach werden auch die Proben durch das Ansatzstück herausgedrückt.

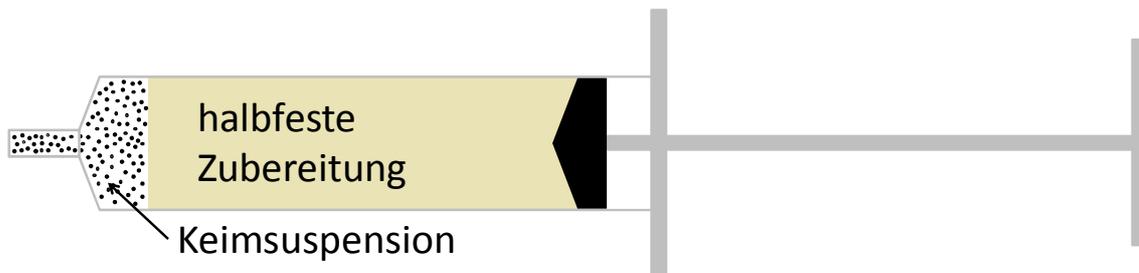


Abbildung 4-15: Modell für Durchwachungstests in Einmalspritzen

Dass beim Ausdrücken Keime verschleppt werden, ist in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Daher ist das Entnehmen der Keimsuspension und der Proben aus derselben Öffnung des Primärpackmittels auszuschließen. Des Weiteren ist es nicht möglich, die Spritze mit einer halbfesten Zubereitung so zu befüllen, dass eine plane Oberfläche entsteht. Beim Befüllen durch das Ansatzstück haftet die Zubereitung an der Wand und lässt sich nicht gleichmäßig mit dem Stempel nach unten ziehen. Wenn der Kolben entnommen wird und die Spritze von der Rückseite mit Zubereitung befüllt wird, entsteht eine abgerundete Oberfläche, die einen tiefen Spalt zwischen Oberfläche und Spritzenwand entstehen lässt (Abbildung 4-16).



Abbildung 4-16: Spritze von hinten mit Zubereitung befüllt, Raum für Keimsuspension mit Fluorescein-Na-Lösung gefüllt

Aus den Vorversuchen zur Befüllung und Probennahme mit dem gezeigten Versuchsmodell ergibt sich, dass die Zubereitung in den vorderen Teil der Spritze eingefüllt werden muss, um die Keimsuspension zwischen der Oberfläche und dem Kolben einzubringen. Die Probenentnahme sollte durch ein Bohrloch in der Spritzenwand erfolgen. Diese Anforderungen erfüllt das in Abbildung 4-17 gezeigte Modell.

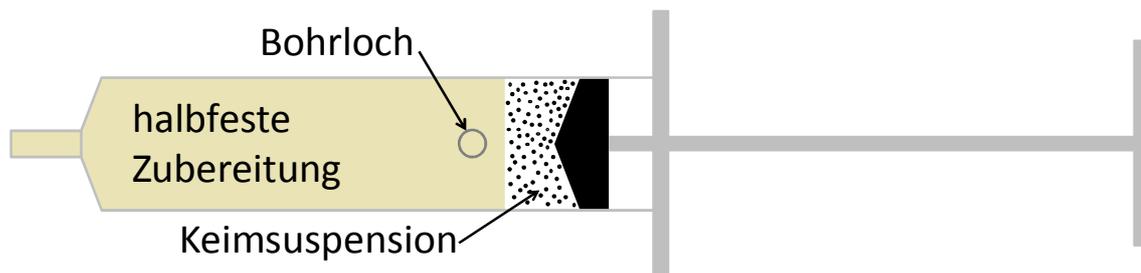


Abbildung 4-17: Schematische Darstellung einer Spritze, die von der Rückseite befüllt wird und ein Bohrloch in der Wand enthält, durch das der Probenzug erfolgen kann

Die plane Oberfläche lässt sich erzeugen, indem die Zubereitung aus einer weiteren Spritze befüllt wird, auf die über einen Luer-Lock-Adapter ein Stück Silikonschlauch aufgebracht ist (Abbildung 4-18). Der Außendurchmesser des Silikonschlauches ist geringfügig kleiner als der Innendurchmesser der zu befüllenden Spritze.



Abbildung 4-18: Befüllen der Spritze über einen Silikonschlauch

Die Größe der Oberfläche und damit auch die Kontaktfläche zwischen Zubereitung und Keimsuspension ergibt sich aus dem Innendurchmesser der Spritze. Sie beträgt bei den verwendeten 5 mL-Spritzen 1,13 cm<sup>2</sup>.

Um den Kolben nach dem Befüllen wieder einsetzen zu können, muss eine Entlüftung erfolgen. Dies wird durch eine Kanüle gewährleistet, mit der der Kolben durchstochen wird. Durch eine zweite Kanüle wird die Keimsuspension eingefüllt (Abbildung 4-19).



*Abbildung 4-19: Spritze mit durchstoßenem Kolben zum Entlüften und Befüllen mit Keimsuspension*

Das Bohrloch zur Probenentnahme hat denselben Durchmesser wie das Ansatzstück einer Luer-Spritze (Abbildung 4-20), mit der der Probenzug erfolgen soll. Das Bohrloch sollte so nah wie möglich an der kontaminierten Zubereitungsoberfläche liegen, um auch das Eindringen von Keimen über geringe Entfernungen nachweisen zu können. Der Abstand des Bohrloches zur kontaminierten Oberfläche darf andererseits auch nicht zu gering sein, damit beim Probenzug keine Anteile der Keime an der Grenzfläche angesaugt werden.



Abbildung 4-20: Spritze mit Bohrloch in der Spritzenwand

Da der notwendige Abstand vom Fließverhalten der Zubereitung und den Druckverhältnissen in der Spritze abhängig ist, muss dieser durch Untersuchung unterschiedlicher Zubereitungen ermittelt werden. Dazu wird der Keimsuspension Fluorescein-Na 0,005 % zugesetzt und der Abstand zwischen Bohrlochrand und Zubereitungsoberfläche von 0 mm bis 7,2 mm in 1,8 mm Schritten (entspricht 0,2 mL auf der Spritzenskalierung) variiert. In einer Versuchsreihe verbleibt die angefärbte Keimsuspension während der Entnahme der Proben in der Spritze, bei einer weiteren wird diese vor dem Probenzug entnommen. Die Proben von jeweils 0,1 mL werden auf eine Glasplatte aufgebracht, mit UV-Licht angestrahlt und fotografiert (Abbildung 4-21). Proben, bei denen die Keimsuspension mit angesaugt wurde, zeigen starke Fluoreszenz.

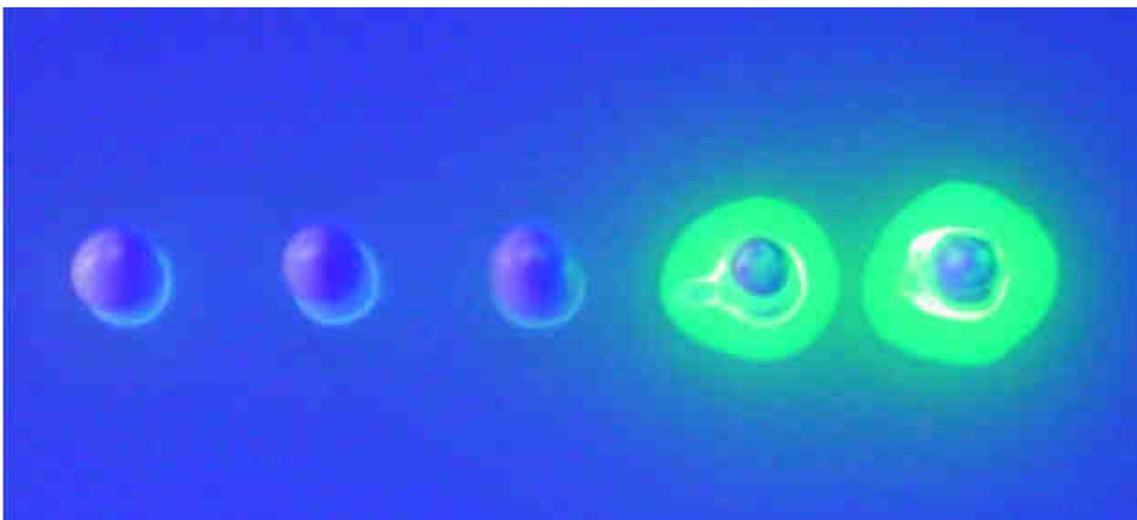


Abbildung 4-21: Durch das Bohrloch entnommene Proben

Die Untersuchungen zur größtmöglichen Annäherung des Probennahmeortes an die Zubereitungsoberfläche werden mit WWAS, W/O-Creme, WHS, NHC und Guar-Gel durchgeführt.

*Tabelle 4-11: Abstand zwischen Zubereitungsoberfläche und Bohrlochrand, bei dem noch keine Fluorescein-Lösung angesaugt wird (höchster Wert aus n=3)*

	WWAS	W/O	WHS	NHC	GG
Fluorescein-Lösung nicht entnommen	3,6 mm	5,4 mm	1,8 mm	3,6 mm	5,4 mm
Fluorescein-Lösung entnommen	1,8 mm				

Tabelle 4-11 zeigt, dass die Fluorescein-Lösung, abhängig von der Zubereitung, bei unterschiedlichen Abständen der Oberfläche zum Bohrloch angesaugt wird. Wird jedoch die Fluorescein-Lösung größtenteils vor dem Probenzug entnommen, verringert sich der Abstand bei allen untersuchten Zubereitungen auf 1,8 mm. Die Entnahme der Lösung ist somit sinnvoll, da dies unabhängig von der Zubereitung eine Untersuchung des Eindringens von Keimen auch über sehr kurze Strecken ermöglicht.

Um die Sicherheit, keine überlebensfähigen Keime anzusaugen, zu erhöhen, wird nach der Entnahme der Keimsuspension zur Desinfektion Isopropanol 70% (m/m) in das Beimpfungskompartiment eingefüllt und nach einer Einwirkzeit von 30 min wieder entnommen.

Das Volumen der Keimsuspension beträgt 1 mL. Die eingebrachte Keimsuspension soll möglichst über den gesamten Untersuchungszeitraum eine gleichmäßig hohe Keimzahl enthalten, damit eine konstante Keimbelastung der Cremeoberfläche gewährleistet ist. Um dies sicherzustellen, wird die Entwicklung der Keimzahlen von Keimsuspensionen mit einem Volumen von 1 mL, die anfänglich ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE enthalten, über acht Wochen untersucht. Der Probenzug erfolgt alle vier Tage.

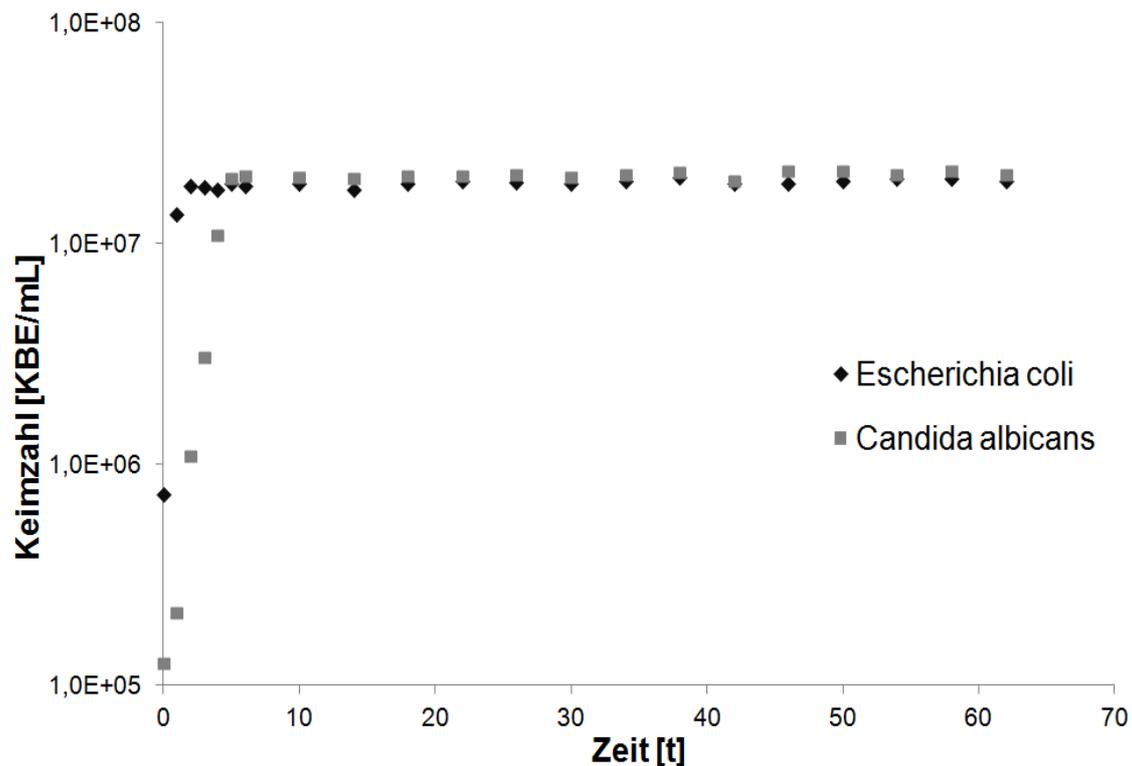


Abbildung 4-22: Keimzahlentwicklung in der Beimpfungssuspension während der Lagerung

Abbildung 4-22 zeigt, dass die Keimzahlen in den ersten Tagen der Lagerungsperiode um ca. zwei Zehnerpotenzen ansteigen und dann über den gesamten Lagerungszeitraum konstant bleiben.

#### 4.5.2 Einwachsen von Keimen in Hydrogele

Das Wachstumsverhalten von Keimen, die auf die Oberfläche von Hydrogelen aufgebracht werden, wird mit Guar-Gel und Hypromellose-Gelen untersucht. Das verwendete Guar-Gel enthält 5 % Guarkernmehl. Die eingesetzten HPMC-Gele enthalten einen Gelbildneranteil von 2 %, 5 % oder 10 %. Diese unterscheiden sich in ihrer Konsistenz, bedingt durch einen unterschiedlich ausgeprägten konzentrationsabhängigen Strukturaufbau (Jumel, Harding et al. 1996).

In allen untersuchten Proben des Guar-Gels lassen sich Keime nachweisen. Ein Einwachsen der Keime in das Gel findet schon nach kurzer Lagerung statt. Dieses rasche Keimwachstum ist darauf zurückzuführen, dass die Polysaccharidketten des Gel-Gerüsts den Keimen als Substrat dienen (Robinson, Ross-Murphy et al. 1982; Tomlin, Edwards et al. 1986; Rubinstein & Glikokabir 1995). Somit ist der Nachweis

erbracht, dass das Einwachsen von Keimen in halb feste Zubereitungen unter den gewählten Untersuchungsbedingungen prinzipiell möglich ist.

Bei der Untersuchung der HPMC-Gele ergibt sich ein differenziertes Bild. Das Verhalten der Keime, die auf die Oberfläche der HPMC-Gele aufgebracht werden, ist abhängig von der Konzentration des Gelbildners. In den Gelen mit 2 % und 5 % HPMC werden ab der ersten Probennahme Keime nachgewiesen. Die Keime finden in diesen Gelen offensichtlich ausreichend gute Lebensbedingungen vor und können sich in der zusammenhängenden Wasserphase ungehindert verbreiten. Die Proben des zehnpromzentigen HPMC-Gels sind jedoch alle steril; ein Einwachsen findet nicht statt. Dass die Keime in diesem Gel im Unterschied zu den niedriger konzentrierten HPMC-Gelen nicht wachsen, ist darauf zurückzuführen, dass der Gelbildner ein Netzwerk bildet dessen Maschenweite so gering ist (Keary 2001), dass die Keime es nicht durchdringen können. Ob das Eindringen der Keime durch Einwachsen oder durch passive Diffusion stattfindet, lässt sich im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit nicht unterscheiden. Dies ist für die Anwendung halbfester Zubereitungen jedoch ohnehin nicht von Belang, da es alleine darauf ankommt, welche Anzahl an Keimen in einer applizierten Menge vorliegt.

Ob Keime nach oberflächlichem Kontakt in den Hydrogelen gefunden werden, ist zum einen davon abhängig, ob die Keime das Gelgerüst abbauen können, und zum anderen davon, ob die Maschenweite des Gel-Gerüsts ein Durchdringen zulässt.

#### **4.5.3 Einwachsen von Keimen in Emulsionen**

Die Untersuchungen zum Eindringen von Keimen in Emulsionen wurden mit Hydrophiler Basisemulsion durchgeführt, deren Wasserphase zum Strukturaufbau 2 %, 5 % oder 10 % HPMC zugesetzt wurde (Jumel, Harding et al. 1996).

Alle Proben der Emulsionen, die keine, 2 oder 5 % HPMC enthielten, waren unsteril.

Alle Proben der Basisemulsion, die mit 10 % HPMC in der Wasserphase verdickt waren, erwiesen sich hingegen als steril. Analog zum gezeigten Wachstum der Keime in HPMC-Gelen findet auch in den mit HPMC verdickten Emulsionen das Keimwachstum abhängig von der Dichte der Netzwerkstruktur statt.

#### 4.5.4 Einwachsen von Keimen in Cremes

Für die Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der auf Oberflächen von Cremes aufgetragenen Keime werden je zwei hydrophile und lipophile Cremes verwendet. Die hydrophilen Cremes sind Wasserhaltige hydrophile Salbe und Nichtionische hydrophile Creme. Die lipophilen Cremes sind Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe und W/O-Creme.

Alle aus den gelagerten Cremes entnommenen Proben sind unabhängig von der Phasenlage der Creme steril. Ein Eindringen der Keime ins Innere der untersuchten Cremes findet trotz Abwesenheit konservierender Zusätze nicht statt.

Um die Wachstumsbedingungen für die Keime noch mehr zu optimieren, werden zusätzlich Untersuchungen mit Cremes durchgeführt, in denen das Wasser durch CaSo-Bouillon ersetzt ist. Die Proben aus diesen Cremes sind ebenfalls alle steril, was wiederum darauf hinweist, dass kein Eindringen von Keimen stattfindet.

Ein Einwachsen von Keimen, die z.B. bei der Entnahme aus dem Primärpackmittel auf die Oberfläche halbfester Zubereitungen gelangen, wird bis dato in Abhängigkeit von der Phasenlage erwartet. Bei lipophilen Cremes mit disperser Wasserphase wird ein geringes Hygienerisiko erwartet. Ist jedoch die äußere Phase wässrig, so wird damit gerechnet, dass sich Keime nach oberflächlicher Kontamination gut darin vermehren. Die Konsequenzen aus dieser Lehrmeinung zum Hygienerisiko halbfester Zubereitungen spiegeln sich z.B. im Neuen Rezeptur Formularium in den dort empfohlenen Aufbrauchfristen für Rezeptur Arzneimittel wider (NRF 2010). Die vorliegenden Untersuchungen stützen diese pauschale Bewertung jedoch nicht, da ein Einwachsen oder eine Diffusion von Keimen selbst bei Zubereitungen mit zusammenhängender Wasserphase nur in Einzelfällen zu beobachten ist. Ob dabei Keime ins Innere einer kontaminierten Zubereitung durch Einwachsen oder Diffusion gelangen, lässt sich anhand des Versuchsdesigns nicht unterscheiden. Allerdings ist die Kenntnis des zugrundeliegenden Mechanismus auch kaum relevant, da für die mikrobiologische Qualität der Produkte alleine entscheidend ist, ob Keime in das Produkt gelangen können oder nicht.

In lipophilen Cremes findet erwartungsgemäß ein Einwachsen der Keime nicht statt, da diese die ölige Außenphase durchdringen müssten, um von einem Wassertropfen

zum anderen zu gelangen. Dies wird zum einen dadurch praktisch unmöglich, dass Keime in der kontinuierlichen Lipidphase nicht überleben können (Schlegel 1992), und dass zum anderen die gelierte Außenphase der Cremes eine mechanische Barriere bildet (Junginger 1992). Dies konnte sowohl an der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe als auch an der wollwachsalkoholfreien lipophilen Creme mit hohem Wassergehalt gezeigt werden. Offensichtlich reicht der bei 75 % Innenphasenanteil verbleibende dünne Lipidfilm (ca. 5-20  $\mu\text{m}$ ) zwischen den einzelnen Tropfen aus, um ein geringes Hygienierisiko zu gewährleisten.

In hydrophilen Cremes bestätigt sich die Erwartungshaltung nicht. Ein Eindringen der Keime ins Innere der untersuchten Cremes findet selbst unter optimierten Wachstumsbedingungen nicht statt.

In der Wasserhaltigen hydrophilen Salbe bildet Emulgierender Cetylstearylalkohol ein lamellares flüssigkristallines Netzwerk in der Wasserphase aus (Abbildung 4-23), dessen Netzebenenabstand nur ca. 20 nm beträgt (Junginger 1992).

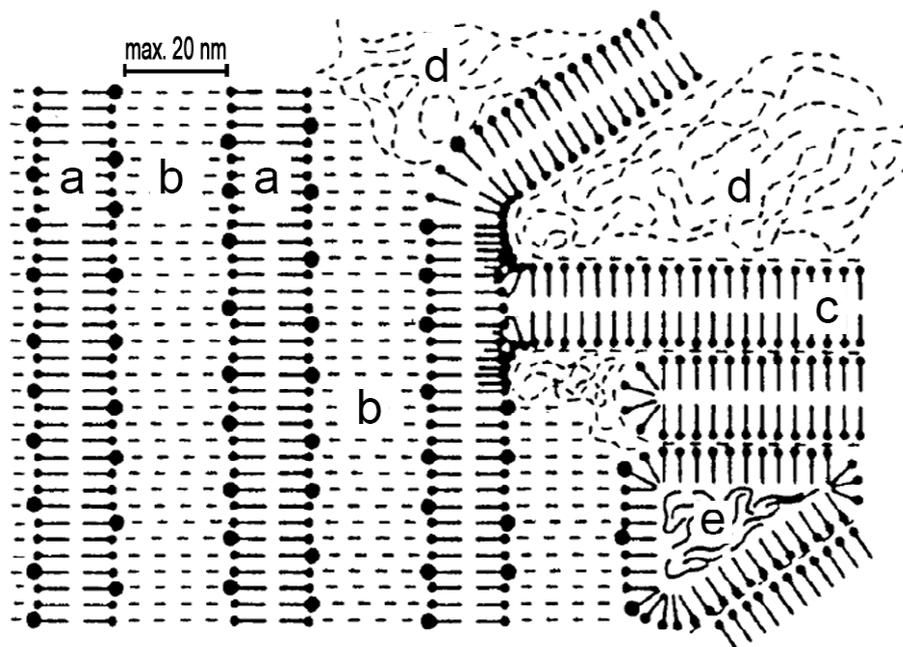


Abbildung 4-23: Struktureller Aufbau der WHS (Junginger 1992); (a) flüssigkristallines, lamellares Gelgerüst aus emulgierendem Cetylstearylalkohol; (b) interlamellar fixiertes Wasser; (c) Cetylstearylalkohol-Semihydrat-Gelgerüst; (d) Bulkwasserphase; (e) lipophile, disperse Phase

Damit ist das Netzwerk um den Faktor zehn engermaschiger als das in der Ph. Eur. zur Bakterienfiltration vorgeschriebene Filtermaterial (0,22 µm). Da selbst kleine Keime durch diese Filter zurückgehalten werden (EAB 2011), ist es wenig verwunderlich, dass die um den Faktor zehn kleineren Strukturen der WHS das Einwandern von Keimen wirksam verhindern. Ein vergleichbarer struktureller Aufbau ist bei den meisten Cremes zu finden, deren Konsistenz auf ein lamellares Gelgerüst aus einem hydrophilen Emulgator und einem Gerüstbildner (z.B. Cetylstearylalkohol) zurückzuführen ist. So auch bei der Nichtionischen hydrophilen Creme, wodurch sich erklären lässt, dass auch bei dieser kein Durchwachsen von Keimen beobachtet wird.

## 5 Abschlussdiskussion

Halbfeste Zubereitungen kommen bei der gebrauchstüblichen Entnahme aus der Primärverpackung unvermeidlich mit der Haut des Anwenders in Kontakt. Dabei kann es zu einer oberflächlichen Kontamination der Zubereitung durch Hautkeime kommen. Entsprechend den Anforderungen des europäischen Arzneibuchs darf der Keimgehalt von Dermatika einen Grenzwert von 200 aeroben Bakterien und 20 Hefen und Schimmelpilzen je Gramm oder Milliliter Zubereitung nicht überschreiten. Allein durch die oberflächliche Kontamination bei der Entnahme ist nicht davon auszugehen, dass eine zuvor keimfreie Zubereitung von mindestens einem Gramm den geforderten Grenzwert überschreitet, da von der Fingerkuppe maximal 200 KBE auf das Produkt übertragen werden (Wallhäußer 1995). Die Situation würde sich aber grundlegend ändern, wenn die oberflächlich übertragenen Keime sich auf oder in der Formulierung vermehren. Die Gefahr, dass dies passiert, wird als Hygienerisiko bezeichnet.

Die bisherige Lehrmeinung geht davon aus, dass Cremes mit kontinuierlicher Wasserphase einem hohen Hygienerisiko ausgesetzt sind. Bei Cremes mit disperser Wasserphase wird das Hygienerisiko als geringer eingestuft, aufgrund des enthaltenen Wassers wird jedoch grundsätzlich von einem gewissen Risiko ausgegangen. Die Lehrmeinung spiegelt sich auch in den Aufbrauchfristen, die das NRF für halbfeste Zubereitungen empfiehlt, wider (NRF 2010). Allerdings gibt es zum tatsächlichen Hygienerisiko unkonservierter Cremes kaum publizierte Untersuchungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, das Hygienerisiko nicht konservierter Cremes systematisch zu untersuchen.

In Cremes, denen ein Konservierungsmittel zugesetzt ist, besteht dessen Funktion darin, eingebrachte Keime in ihrem Wachstum zu hemmen. Es darf jedoch nicht dazu dienen, eine schlechte mikrobiologische Qualität, die aus der Herstellung resultiert, auszugleichen. Dies ist im Einleitungssatz der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ Ph. Eur. 5.1.3 (EAB 2011) definiert und zeigt die grundlegende Zielsetzung des EAB zur Beherrschung der Keimzahlen in Arzneimitteln auf. Des Weiteren schreibt das EAB im Kapitel „Mikrobiologische Qualität nicht steriler

Produkte“ Ph. Eur. 5.1.4 (EAB 2011) für Zubereitungen zur Anwendung auf der Haut eine Keimzahl von höchstens  $2 \cdot 10^2$  KBE aerober Bakterien und  $2 \cdot 10^1$  KBE Pilzen oder Sporen je Gramm oder Milliliter Zubereitung vor. In der vorliegenden Arbeit wird mit ausgewählten Testkeimen untersucht, ob die geforderten Kriterien des EAB auch ohne den Einsatz von Konservierungsmitteln erfüllt werden können. Einen Anhaltspunkt dafür, dass dies möglich sein müsste, zeigt die Tatsache, dass es konservierungsmittelfreie Pflegecremes gibt, die in Dosen verpackt sind und daher einem hohen Hygienerisiko ausgesetzt sein müssten. Bei diesen Produkten zeigt sich jedoch auch bei Lagerung unter günstigen Wachstumsbedingungen für die Mikroorganismen kein sichtbarer Verderb, z.B. das Wachstum von Schimmelkulturen an der Entnahmestelle, wie es aufgrund der Lehrmeinung zu erwarten wäre.

Um das Hygienerisiko von Cremes beurteilen zu können, müssen im Wesentlichen zwei Faktoren betrachtet werden:

1. Welches Wachstumsverhalten zeigen Keime, die in der Wasserphase einer Creme verteilt sind?
2. Welches Wachstumsverhalten zeigen Keime, die auf der Oberfläche einer Creme aufgebracht werden, insbesondere im Hinblick auf deren Eindringen in das Innere der Creme?

Aus der Kombination dieser beiden Faktoren lässt sich dann das Hygienerisiko einer individuell untersuchten Creme bestimmen.

Das Wachstumsverhalten der gewählten Testkeime im Inneren von Cremes wird mit lipophilen Cremes untersucht, deren Wasserphase als Tropfen in der Fettphase verteilt ist. In der Wasserphase dieser Cremes sind keine stabilisierenden Strukturen aufgebaut. Die Tropfen stellen hier voneinander getrennte Lebensräume für die Keime dar. Die Anzahl der gleichmäßig auf die Wasserphase verteilten Keime nimmt – trotz der Abwesenheit von Konservierungsmitteln – über den Untersuchungszeitraum stetig ab. Offensichtlich finden die in der Wasserphase verteilten Keime keine ausreichenden Lebensbedingungen vor, die ein Weiterwachsen der Population zulassen. Das Ausbleiben der Zunahme der Keimzahl in den Wassertropfen lässt sich damit begründen, dass die einzelnen Keime in diesen kleinen Lebensräumen in starker Konkurrenz um Substrate stehen

(Wallhäußer 1995). Da die ausgewählten Testkeime keine anspruchsvollen Bedingungen benötigen (Schlegel 1992), ist damit zu rechnen, dass sich dieses Verhalten auf eine Vielzahl anderer Keimspezies übertragen lässt. Dass die von der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ des Europäischen Arzneibuchs geforderten Kriterien nicht erreicht werden, erscheint für das Hygienerisiko von Cremes nicht weiter von Belang, da durch die Prüfung die Kontamination, die bei der gebrauchstüblichen Anwendung erfolgt, nicht korrekt simuliert wird. Insbesondere ist die Anzahl der bei der Entnahme auf die Creme übertragenen Keime - praxisnahe Untersuchungen gehen von maximal 40-200 Keimen aus (Wallhäußer 1995) - wesentlich geringer als die im Test verwendete. Da die Untersuchungen zeigen, dass die eingetragenen Keime sich nicht vermehren, stellen diese keine relevante Gefährdung der Produktqualität dar. Vielmehr dürften die mikrobiologische Qualität der Zubereitungen nach Herstellung und Verpackung sowie das Design der Primärverpackung, entscheidend für das Hygienerisiko sein. Daher darf erwartet werden, dass bei der Anwendung einer halbfesten Zubereitung auch nach Anbruch nur wenige Keime auf die Haut gelangen.

Wenn sich Keime in den Wassertropfen jedoch nicht vermehren, ist das Hygienerisiko davon abhängig, wie viele Keime in eine Creme eingebracht werden und wie diese in der Creme verteilt werden. Für den Anwender ist entscheidend, welche Keimzahlen bei der Anwendung auf die Haut aufgebracht werden.

Um dies zu klären, wird das Wachstumsverhalten von Keimen untersucht, die auf die Oberfläche einer Creme aufgebracht werden. Damit wird die Situation bei der Entnahme aus der Primärverpackung simuliert. Dazu wird Keimsuspension mit hohen Keimzahlen auf die Oberfläche steriler Cremes aufgetragen und nach Lagerung überprüft, ob sich Keime im Inneren nachweisen lassen.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen die Erwartungshaltung für lipophile Cremes, bei denen auch nach achtwöchigem oberflächlichem Kontakt mit einer Keimsuspension von mindestens  $10^5$  KBE/mL keine Keime im Inneren nachgewiesen werden. Das Eindringen der Keime wird dadurch verhindert, dass diese die ölige Außenphase durchdringen müssten, wenn sie von einem Wassertropfen zum anderen gelangen wollen. Dies wird auch durch die Untersuchungen zur Durchwachsung von Ölschichten bestätigt. Keime können in der kontinuierlichen

Lipidphase nicht überleben (Schlegel 1992) und die gelierte Außenphase der Cremes bildet eine mechanische Barriere (Junginger 1992). Das konnte sowohl an der Wasserhaltigen Wollwachsalkoholsalbe als auch an der wollwachsalkoholfreien lipophilen Creme mit hohem Wassergehalt gezeigt werden. Offensichtlich reicht der bei 75 % Innenphasenanteil verbleibende dünne Lipidfilm (ca. 5-20 µm) zwischen den einzelnen Tropfen aus, um ein nur geringes Hygienerisiko zu gewährleisten.

Die Untersuchungen zum Keimwachstum in hydrophilen Cremes bestätigen hingegen die Erwartungen nicht. Im Gegensatz zur bestehenden Lehrmeinung zeigen nur wenige der untersuchten Formulierungen mit wässriger Außenphase ein Eindringen von Keimen während der Lagerung. Abbildung 5-1 fasst zusammen, in welchen der untersuchten Zubereitungen Keime nachgewiesen wurden.

	Gele		Emulsionen	Cremes W/O    O/W	
<b>Keime in der Zubereitung nachweisbar</b>	Guar-Gel 5%	HPMC-Gel 2%	HB  HB 2% HPMC		
		HPMC-Gel 5%	HB 5% HPMC		
<b>keine Keime in der Zubereitung nachweisbar</b>		HPMC-Gel 10%	HB 10% HPMC	WWAS  Lipophile Creme	WHS  NHC

Abbildung 5-1: Einwachsen von Keimen in halbfeste Zubereitungen

Das Hygienerisiko hydrophiler halbfester Zubereitungen muss daher differenziert betrachtet werden; die Faktoren, die das Keimwachstum verhindern können, müssen ermittelt werden.

Die Zubereitungen, in denen Keime nachgewiesen werden, lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Die Zubereitungen der ersten Gruppe enthalten keinen Strukturbildner in der Wasserphase, der das Keimwachstum beeinflussen könnte. Ein Beispiel dafür ist die Hydrophile Basisemulsion. Die Zubereitungen der zweiten

Gruppe enthalten in der Außenphase einen Gerüstbildner, welcher von den Keimen verdaut wird (Tomlin, Edwards et al. 1986; Rubinstein & Glikokabir 1995) und somit das Einwachsen der Keime fördert. Dies kann am Beispiel des Guar-Gels gezeigt werden. Die Zubereitungen der dritten Gruppe enthalten einen Strukturbildner in geringer Konzentration, der den Keimen weder als Substrat dient, noch von ihnen enzymatisch abgebaut werden kann. Aufgrund der geringen Konzentration kann sich kein engmaschiges Gelgerüst ausbilden. Diese Zubereitungen bieten Keimen einen geeigneten Lebensraum und sind somit mit einem hohen Hygienerisiko behaftet. Daher kann auf Maßnahmen zur Konservierung solcher Zubereitungen nicht verzichtet werden.

Zubereitungen, die trotz wässriger Außenphase kein Hygienerisiko aufweisen, zeichnen sich dadurch aus, dass es sich um Gele oder Cremes handelt, deren zusammenhängende Wasserphase von engmaschigen Strukturbildnern durchzogen ist. Hypromellose-Gele mit bis zu 5 % Gelbildner bilden noch kein ausreichend engmaschiges Gerüst aus, bei Gelbildnerkonzentrationen ab 10 % ist ein solches offensichtlich ausgebildet, da in diese keine Keime eindringen können. Dies gilt auch für Cremes mit lamellar flüssigkristallinem Aufbau in der Wasserphase. Betrachtet man den bekannten kolloidchemischen Aufbau der wasserhaltigen hydrophilen Salbe, in dem der Emulgator Cetylstearylsulfat-Natrium und der Koemulgator Cetylstearylalkohol Strukturen mit einem Netzebenenabstand von maximal 20 nm ausbilden (Junginger 1992), wird dies deutlich. Damit ist dieser um den Faktor zehn engmaschiger als das in der Ph. Eur. zur Bakterienfiltration vorgeschriebene Filtermaterial (0,22 µm). Da selbst kleine Keime durch diese Filter zurückgehalten werden (EAB 2011), ist es wenig verwunderlich, dass die um den Faktor zehn kleineren Strukturen der WHS das Einwandern von Keimen wirksam verhindern. Unter diesen Voraussetzungen ist auch davon auszugehen, dass die Untersuchungen repräsentativ für Keime sind, die nicht auf der Oberfläche aufgebracht werden, sondern direkt in das Innere der Zubereitungen eingebracht werden.

Die Beurteilung des Hygienerisikos halbfester Zubereitungen erfolgt zurzeit primär auf Basis der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ Ph. Eur. 5.1.3 (EAB 2011). In der Prüfung werden hohe Keimzahlen auf die Gesamtmenge der Zubereitung verteilt

und geprüft, ob die Keimzahl durch die Zubereitung schnell vermindert wird. Dabei werden sehr hohe Keimzahlen in einem geringen Volumen dispergiert und der gesamten Zubereitung zugemischt, wobei eine gleichmäßige Verteilung schwer zu erreichen ist. Dies gilt insbesondere beim Beimpfen lipophiler Cremes, da die Keimsuspension in der inneren Wasserphase verteilt werden muss. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Keimsuspension direkt zu Tropfen emulgiert wird, die eine sehr hohe Keimzahl enthalten, und dass ein großer Anteil der bereits vorhandenen Wassertropfen nicht kontaminiert wird. D. h. es entstehen Bereiche in der Creme, die hoch, und solche, die nur schwach oder gar nicht kontaminiert sind. Die dadurch ermittelten Keimbelastungen können ein zu hohes oder zu niedriges falsches Ergebnis liefern. Diese Prüfung simuliert allerdings nicht die Situation der Anwendung einer halbfesten Zubereitung, bei der wesentlich geringere Keimzahlen, die abhängig vom Design der Primärverpackung maximal 200 KBE betragen (Wallhäußer 1995), von der Hautoberfläche auf die Oberfläche der Creme übertragen werden. Diese geringen Keimzahlen stellen, wenn sie sich nicht vermehren und nicht ins Innere der Zubereitung eindringen, kein hohes Hygienerisiko für die Creme da. Das Hygienerisiko einer Zubereitung, die mit hoher mikrobiologischer Qualität hergestellt ist und die ein Keimwachstum nicht begünstigt, erscheint daher oft viel höher als es tatsächlich ist.

Die Entwicklung der Keimzahlen auf der Oberfläche einer halbfesten Zubereitung wird in dieser Arbeit nicht untersucht. Da sich in der Oberfläche einer Creme nur eine geringe Menge an Wasser befindet, ist mit einem ausgeprägten Wachstum auf einer stabilen Zubereitung nicht zu rechnen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass unter gegebenen Umständen die Bildung von Kondenswasser zu größeren Wasseransammlungen führen kann, die dann als geeigneter Lebensraum für Keime zur Verfügung stehen. Dies stellt dann ein erhebliches Hygienerisiko dar. Dasselbe gilt allerdings auch für konservierte Cremes, da im Kondenswasser im Allgemeinen keine ausreichende Konservierungsmittelkonzentration vorliegt. Dieses Hygienerisiko kann durch die Auswahl geeigneter Primärpackmittel umgangen werden, welche so beschaffen sein sollten, dass die Ausbildung von Lufträumen über der Zubereitungsfläche ausgeschlossen ist, wodurch ein Verdunsten von Wasser und damit dessen Kondensation verhindert wird. Das Primärpackmittel hat durch sein

---

Design auch einen großen Einfluss auf die Anzahl der Keime, die bei der Entnahme auf die Zubereitung übertragen werden können. Die mögliche Keimanzahl hängt wesentlich von der Größe der Oberfläche ab, die mit der Haut in Kontakt kommt. Die überlebenden Keime einer Kontamination werden bei der folgenden Entnahme in die aufzutragende Zubereitung verschleppt. Die Keimbelastung in der applizierten Zubereitungsmenge in KBE/mL wird daher hauptsächlich durch das Packmittel und die Entnahmemenge bestimmt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass halbfesten Zubereitungen, die Wasser enthalten, nicht zwingend ein Konservierungsmittel zugesetzt werden muss, um die Anforderungen des EAB zur mikrobiologischen Qualität erfüllen zu können. Das Hygienierisiko, dem eine Creme ausgesetzt ist, ist nicht ausschließlich von ihrer Phasenlage abhängig. Die Notwendigkeit, ein Konservierungsmittel zuzusetzen, ist von der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe abhängig, da diese den kolloidchemischen Aufbau der Zubereitung bestimmen. Es können wasserhaltige Zubereitungen hergestellt werden, in denen sich eingebrachte Keime nicht vermehren und in die auch Keime, die oberflächlich aufgebracht wurden, nicht eindringen können. Für solche Zubereitungen ist die „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ Ph. Eur. 5.1.3 nicht geeignet, wenngleich Zulassungsbehörden das Bestehen dieser Prüfung häufig fordern.

Aus den durchgeführten Untersuchungen lässt sich daher ableiten, dass das Hygienierisiko nicht konservierter halbfester Zubereitungen nicht ausschließlich aus der Betrachtung ihrer Phasenlage beurteilt werden darf. Eine erste Abschätzung des individuellen Hygienierisikos einer halbfesten Zubereitung ist mit Hilfe des Schemas in Abbildung 5-2 möglich.

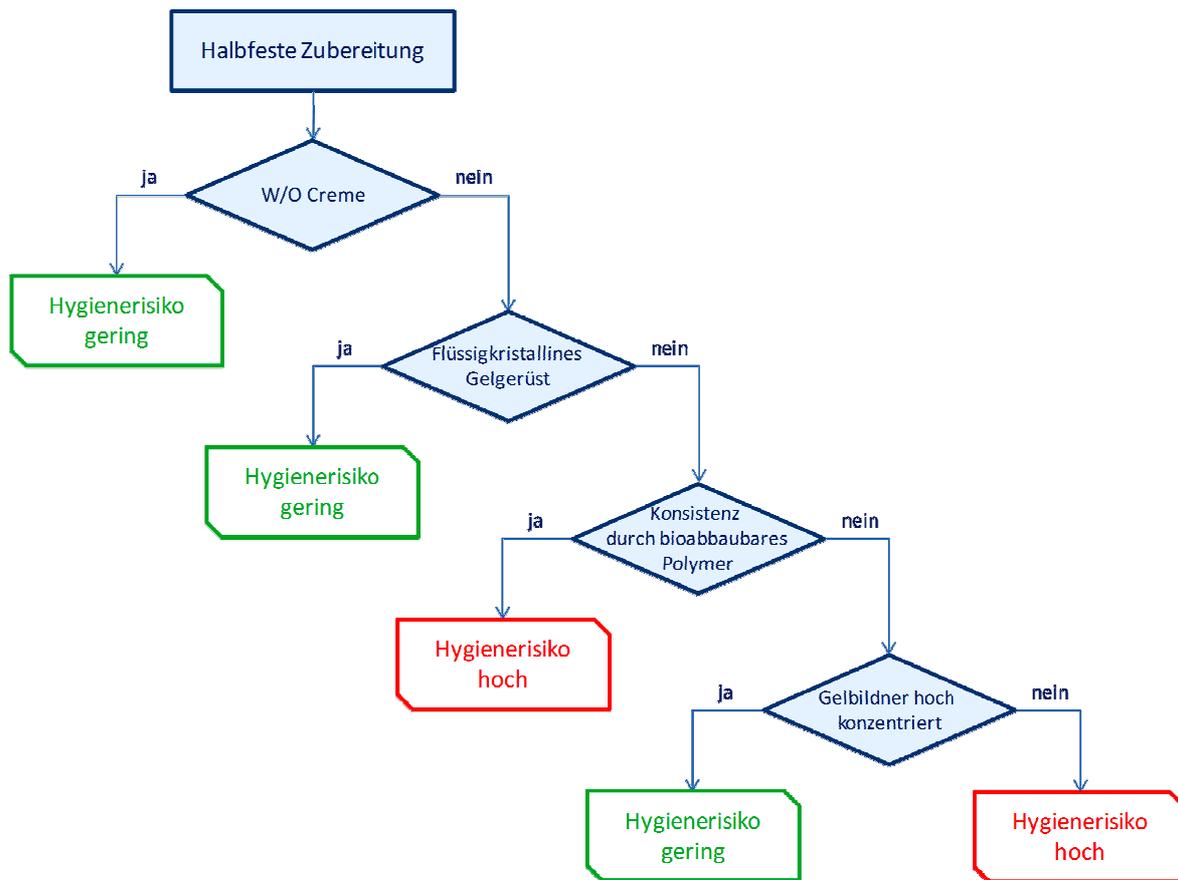


Abbildung 5-2: Fließschema zur Beurteilung des Hygierisikos halbfester Zubereitungen

Endgültige Klarheit können allerdings nur Untersuchungen am jeweiligen Produkt selbst geben. Wird das Hygierisiko einer Formulierung anhand des Schemas als „hoch“ eingestuft, ist die Durchführung der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualität notwendig und aussagekräftig. In den Fällen, in denen das Hygierisiko als „gering“ eingestuft ist, erscheint die Beurteilung der mikrobiologischen Eigenschaften alleine anhand der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ nicht zielführend. Ausgehend von einem nahezu keimfreien Produkt nach Herstellung und Konfektionierung ist es aufgrund der vorliegenden Untersuchungen auch bei O/W-Zubereitungen nicht zwingend notwendig, die mikrobiologische Qualität durch Zusatz eines Konservierungsmittels abzusichern, wenn mit einer geeigneten Untersuchungsstrategie der Nachweis erbracht werden kann, dass oberflächlich aufgetragene Keime nicht in die Formulierung einwandern und sich dort vermehren können.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Hygienerisiko nicht konservierter Cremes bei der Anwendung durch den Konsumenten.

Untersucht werden sowohl hydrophile Cremes, bei denen in der gängigen Lehrmeinung mit einem hohen Hygienerisiko gerechnet wird, als auch lipophile Cremes, deren Hygienerisiko als gering eingeschätzt wird. Letztere werden jedoch wegen ihres Wassergehaltes grundsätzlich auch als mikrobiell anfällig angesehen.

Lipophile Cremes werden im Hinblick auf das Wachstum von Keimen in Wassertropfen und die Fähigkeit der Keime, Ölphasen zu durchdringen, untersucht. Dabei reduziert sich die Anzahl an Keimen, die in den Wassertröpfchen lipophiler Cremes verteilt werden, während der Lagerung kontinuierlich; ein Durchdringen von Lipidschichten zwischen zwei wässrigen Bereichen kann nicht beobachtet werden.

Ob Keime, die oberflächlich auf halb feste Zubereitungen aufgebracht werden, in deren Inneres penetrieren können, wird sowohl an hydrophilen als auch lipophilen Cremes untersucht. Werden Keime auf die Oberfläche lipophiler Cremes aufgetragen, können sie nicht in das Innere dieser eindringen. Das Eindringen von Keimen, die auf der Oberfläche hydrophiler Cremes aufgebracht werden, ist abhängig vom strukturellen Aufbau der Wasserphase der Creme.

Eine engmaschige, für Keime undurchdringliche Struktur kann durch Kristalloide aufgebaut sein, wie es z.B. bei den lamellar angeordneten Flüssigkristallen, die Emulgator und Koemulgator in der Wasserphase der Wasserhaltigen hydrophilen Salbe DAB ausbilden, der Fall ist.

In gleicher Weise wirken auch makromolekulare Hydrogelbildner, sofern diese in ausreichend hohen Konzentrationen eingesetzt werden und nicht durch Mikroorganismen abgebaut werden können. So kann die Wasserphase der Hydrophilen Basisemulsion NRF nicht mehr von Keimen durchwachsen werden, wenn sie mit 10 % Hypromellose immobilisiert ist. Niedrige Hypromellose-Konzentrationen sind jedoch nicht ausreichend, um das Eindringen von Keimen zu verhindern.

Dies gilt auch für Hydrogele, die keine Fettphase beinhalten, wenn der Gelbildner nicht durch die Keime abgebaut werden kann.

Guar als Gelbildner kann, unabhängig von seiner Konzentration, das Eindringen von Keimen nicht verhindern, da es diesen als Substrat dient.

Des Weiteren wird betrachtet, wie sich Keime verhalten, die sich zum Entnahmezeitpunkt an der Produktöffnung der Primärverpackung befinden. Keime an der Produktöffnung der Primärverpackung werden bei der Entnahme der Creme auf den ausgedrückten Cremestrang übertragen. Die Länge des mit Keimen belasteten Produktstranges ist abhängig von der Keimbelastung an der Produktöffnung. Der belastete Cremestrang ist dabei länger als ein Cremestrang, der üblicherweise für eine Anwendung entnommen wird.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich Folgendes schlussfolgern:

Das Hygienerisiko, dem lipophile Cremes während der Anwendung ausgesetzt sind, ist sehr gering, so dass der Verzicht auf Konservierungsmittel für diese empfohlen werden kann.

Das Hygienerisiko hydrophiler Cremes hingegen ist abhängig vom strukturellen Aufbau ihrer Wasserphase. Teilweise kann auch bei diesen auf Konservierungsmittel verzichtet werden. Dies setzt allerdings zwingend voraus, dass das individuelle Hygienerisiko einer Creme mit einem geeigneten Test untersucht wird. Eine bloße Abschätzung anhand der Phasenlage der Creme führt regelmäßig zu einem falsch zu hoch eingeschätzten Hygienerisiko.

## 7 Literaturnachweis

**Babayan, V.; Kaunitz, H.; Slanetz, C. (1964):**

Nutritional studies of polyglycerol esters.

Journal of the American Oil Chemists' Society 41 (6): 434-437

**Bauer, K. H.; Frömming, K.-H.; Führer, C. (2006):**

Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

**BP (2004):**

Efficacy of antimicrobial preservation

in: British Pharmacopoeia; The Stationery Office, London

**Brasch, J.; Henseler, T.; Frosch, P. (1993):**

Patch Test Reactions to a Preliminary Preservative Series - a Retrospective Study Based on Data Collected by the Information Network of Dermatological Clinics (Ivdk) in Germany.

Dermatosen in Beruf und Umwelt 41 (2): 71-76

**Bundesministerium der Justiz (2008):**

Biostoffverordnung § 3

<http://www.gesetze-im-internet.de/biostoffv/index.html>

**Connolly, P.; Bloomfield, S. F.; Denyer, S. P. (1994):**

The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products.

Journal of Applied Microbiology 76 (1): 68-74

**DAB (2010):**

Deutsches Arzneibuch, Ausgabe 2010

Deutscher Apotheker Verlag, Govi Verlag, Eschborn

**DAC (2010):**

Deutscher Arzneimittelcodex, Ausgabe 2010

Deutscher Apotheker Verlag, Govi Verlag, Eschborn

**Dailey, J. R.; Rosenwasser, G. O. D. (1994):**

Viability of Bacteria in Glycerin and Ethanol Preserved Sclera.

Journal of Refractive and Corneal Surgery 10 (1): 38-40

**Dörfler, H. D. (2002):**

Grenzflächen und kolloiddisperse Systeme

Springer-Verlag, Berlin

**Drews, G. (2010):**

Was sind Mikroorganismen und wie sind sie entstanden

in: Mikrobiologie; Springer Berlin Heidelberg: 5-6

**Dunne, W. M. (2002):**

Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?

Clinical Microbiology Reviews 15 (2): 155-166

**EAB (2011):**

Europäisches Arzneibuch, Amtliche deutsche Ausgabe

Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn

**EAB (2011):**

Methoden zur Herstellung steriler Zubereitungen

in: Europäisches Arzneibuch, Amtliche deutsche Ausgabe; Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn

**EAB (2011):**

Prüfung auf ausreichende Konservierung

in: Europäisches Arzneibuch, Amtliche deutsche Ausgabe; Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn

**Easter, M. C. (2003):**

Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry

Interpharm/CRC, New York

**EMA The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2003):**

Note for Guidance on Excipients, Antioxidants and Antimicrobial Preservatives in the Dossier for Application for Marketing Authorization of a Medicinal Product

**Falkow, S. (1997):**

What is a pathogen?

ASM News 63 (7): 359-365

**Farrington, J. K.; Martz, E. L.; Wells, S. J.; Ennis, C. C.; Holder, J.; Levchuk, J. W.; Avis, K. E.; Hoffman, P. S.; Hitchins, A. D.; Madden, J. M. (1994):**

Ability of Laboratory Methods to Predict in-Use Efficacy of Antimicrobial Preservatives in an Experimental Cosmetic.

Applied and Environmental Microbiology 60 (12): 4553-4558

**Franz, T. J. (1975):**

Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data.

The journal of investigative dermatologie 64 (3): 190-195

**Gehrke, H.-H.; Pralle, K.; Deckwer, W.-D. (1992):**

Freeze drying of microorganisms - influence of cooling rate on survival.

Food Biotechnology 6 (1): 35-49

**Gottwald, W. (2000):**

Statistik für Anwender

Wiley-VCH Verlag, Weinheim

**HAB (2010):**

Homöopathisches Arzneibuch, Ausgabe 2010,

Deutscher Apotheker Verlag, Govi Verlag, Eschborn

**Hadaway, L. C. (2003):**

Skin flora and infection.

J Infus Nurs 26 (1): 44-48

**Halpern, A. (1949):**

The Surface Tension of Oils.

The Journal of Physical and Colloid Chemistry 53 (6): 895-897

**Hemker, W. (1981):**

Associative structures of polyglycerol esters in food emulsions.

Journal of the American Oil Chemists' Society 58 (2): 114-119

**IUPAC (1972):**

Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. Appendix II., Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry., Pure and Applied Chemistry. 31: 577-638

**Ivanov, I. B.; Kralchevsky, P. A. (1997):**

Stability of emulsions under equilibrium and dynamic conditions.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 128 (1-3): 155-175

**Jumel, K.; Harding, S. E.; Mitchell, J. R.; To, K. M.; Hayter, I.; O'Mullane, J. E.; Ward-Smith, S. (1996):**

Molar mass and viscometric characterisation of hydroxypropylmethyl cellulose.

Carbohydrate Polymers 29 (2): 105-109

**Junginger, H. E. (1992):**

Systematik der Dermatika-Kolloidchemischer Aufbau

in: Niedner, R. and Ziegenmeyer, J.; Dermatika;

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

**Kammel, D. (2010):**

Leben nach dem Feuer.

intensiv 18 (02): 82-85

**Keary, C. M. (2001):**

Characterization of METHOCEL cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors.

Carbohydrate Polymers 45 (3): 293-303

**Kramer, M.; Šuklje-Debeljak, H.; Kmetec, V. (2008):**

Preservative Efficacy Screening of Pharmaceutical Formulations Using ATP Bioluminescence.

Drug Development and Industrial Pharmacy 34 (5): 547-557

**Kutz, G.; Daniels, R.; Trommer, H. (2011):**

Emulsionen

Editio Cantor Verlag, Aulendorf

**Macierzanka, A.; Szeląg, H.; Moschakis, T.; Murray, B. S. (2006):**

Phase Transitions and Microstructure of Emulsion Systems Prepared with Acylglycerols/Zinc Stearate Emulsifier.

Langmuir 22 (6): 2487-2497

**Maniloff, J. (1997):**

Nannobacteria: Size Limits and Evidence.

Science 276 (5320): 1773-1776

**McEwen, G. N.; Curry, A. S. (1985):**

Determination of the adequacy of preservation testing of aqueous liquid and semi-liquid eye cosmetics

in: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association technical guidelines; Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Washington D.C.

**Naraifumi, A.; Hajime, K.; Tomonori, K.; Satoru, N.; Hiroaki, K. (2002):**

Optimal concentrations of emulsifying agents for use in microbiological tests of water-immiscible products.

Journal of Antibacterial and Antifungal Agents 30 (3): 3-11

**Neissner, R. (1980):**

Polyglycerine und Fettsäure-Polyglycerinpartialester (Herstellung, Kennzahlen, DC-Trennung).

Fette, Seifen, Anstrichmittel 82 (3): 93-100

**NRF (2010):**

Halbfeste Zubereitungen zur Anwendung am Auge

in: Neues Rezeptur Formularium des Deutschen Arzneimittelcodex;

Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn

**NRF (2010):**

Neues Rezeptur Formularium des Deutschen Arzneimittelcodex

Deutscher Apotheker Verlag, Govi Verlag, Eschborn

**Orth, D. S. (1979):**

Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy.

Journal of the Society of Cosmetic Chemists 30 (6): 321-331

**Penna, T. C. V.; Mazzola, P. G.; Martins, A. M. S. (2001):**

The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs.

Bmc Infectious Diseases 1 DOI: 10.1186/1471-2334-1-16

**Prickett, P. S.; Murray, H. L.; Mercer, N. H. (1961):**

Potential of preservatives (parabens) in pharmaceutical formulations by low concentrations of propylene glycol.

Journal of Pharmaceutical Sciences 50 (4): 316-320

**Robinson, G.; Ross-Murphy, S. B.; Morris, E. R. (1982):**

Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan.

Carbohydrate Research 107 (1): 17-32

**Roth, R. R.; James, W. D. (1989):**

Microbiology of the Skin - Resident Flora, Ecology, Infection.

Journal of the American Academy of Dermatology 20 (3): 367-390

**Rubinstein, A.; Glikokabir, I. (1995):**

Synthesis and Swelling-Dependent Enzymatic Degradation of Borax-Modified Guar Gum for Colonic Delivery Purposes.

Stp Pharma Sciences 5 (1): 41-46

**Schlegel, H. (1992):**

Allgemeine Mikrobiologie

Thieme Verlag, Stuttgart

**Schlegel, H. (1992):**

Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage

Thieme Verlag, Stuttgart

**Schnuch, A. (1997):**

Benzalkoniumchlorid

Editio Cantor Verlag, Aulendorf

**Schöffling, U. (1998):**

Arzneiformenlehre

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

**Schütze, I. (1977):**

Analytische Charakterisierung von Polyglycerinester-Emulgatoren.

Food / Nahrung 21 (5): 405-415

**Silley, P.; Forsythe, S. (1996):**

Impedance microbiology - A rapid change for microbiologists.

Journal of Applied Bacteriology 80 (3): 233-243

**Smith, D. (2000):**

the Self-Preserving Challenge.

Cosmetic & Toiletries 1 (115)

**Statham, B. N.; Smith, E. V.; Bodger, O. G.; Green, C. M.; King, C. M.; Ormerod, A. D.; Sansom, J. E.; English, J. S. C.; Wilkinson, M. S.; Gawkrödger, D. J.; Chowdhury, M. M. U. (2010):**

Concomitant contact allergy to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone and formaldehyde- releasing preservatives.

Contact Dermatitis 62 (1): 56-57

**Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. (2007):**

Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

**Thoma, K. (2010):**

Apothekenrezeptur und -defektur

Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn

**Tomlin, J.; Edwards, C. A.; Duerden, B. I.; Read, N. W. (1986):**

Degradation of Guar Gum by Fecal Bacteria.

Proceedings of the Nutrition Society 45 (3): A105-A105

**USP (2011):**

Antimicrobial effectiveness testing

in: the United States Pharmacopeia; the United States Pharmacopeial Convention, Rockville

**van Doorne, H.; Collge, J.; Calter, R. C. W. (1998):**

A simple method to establish the vulnerability of hydrophobic aqueous dermatological emulsions to potential microbial contamination.

Pharmeuropa 10 (3): 480-483

**Verrips, C. T.; Smid, D.; Kerkhof, A. (1980):**

The intrinsic microbial stability of water-in-oil emulsions II. Experimental.

Applied Microbiology and Biotechnology 10 (1): 73-85

**Voigt, R. (2010):**

Pharmazeutische Technologie

Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

**Wallhäußer, K. H. (1995):**

Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

**Winter, G. (2006):**

Steriltechnik in der Herstellung pharmazeutischer Produkte.

Chemie Ingenieur Technik 78 (11): 1690-1696

Auflistung meiner akademischen Lehrer:

Prof. Dr. H. P. T. Ammon	Pharmakologie & Toxikologie
Dr. N. Breier	Mathematik
Prof. Dr. R. Daniels	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. C. Friedrich	Geschichte der Pharmazie
Prof. Dr. L. Heide	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. J. Heinicke	Anorganische Chemie
Prof. Dr. W. Jabs	Anorganische Chemie
Prof. Dr. T. Jira	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. K. A. Kovar	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. W. Langel	Physikalische Chemie
Prof. Dr. S. Laufer	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. U. Lindequist	Pharmazeutische Biologie
Dr. O. Morgenstern	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. H.H. Otto	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. Dr. h.c. P. Pfliegel	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. P. Ruth	Pharmakologie & Toxikologie
Dr. K.-D. Salewski	Physik
Prof. Dr. P. C. Schmidt	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. P. Schreiber	Mathematik und Informatik
Prof. Dr. J. E. Schultz	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. M. A. Wahl	Pharmazeutische Technologie