

**BEITRAG ZUR
STERILISATIONSTECHNIK UND
STERILISATIONSKONTROLLE
IN EINER SPITALAPOTHEKE**

VON DER

**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH**

ZUR ERLANGUNG

**DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
NATURWISSENSCHAFTEN**

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

FLORENZ FLURY

**DIPL. APOTHEKER
VON DOMAT/EMS GR**

Referent: Herr Prof. Dr. K. Steiger-Trippi
Korreferent: Herr Prof. Dr. J. Büchi

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Kurt Münzel

begonnen und später unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Kurt Steiger

abgeschlossen. Ich danke meinen sehr verehrten Lehrern für ihr Interesse an meiner Arbeit und für ihre wertvolle Unterstützung.

*Meiner lieben Frau
und
meinen lieben Eltern*

Leer - Vide - Empty

VORWORT

Fast alle neueren Arzneibücher enthalten ein eigenes Kapitel, das den Sterilisationsverfahren gewidmet ist. Darin werden allgemeine Richtlinien, z. T. aber auch verbindliche Vorschriften für die Entkeimung von bestimmten Gruppen von Substanzen und Gegenständen gegeben. Es besteht auch eine recht umfangreiche Fachliteratur, die sich ausschliesslich mit dem vielfältigen Problem der Keimtötung oder Keimentfernung beschäftigt, und überdies behandeln unzählige Publikationen Detailfragen dieses Wissensgebietes.

Trotzdem steht der Praktiker, der sich täglich mit der Sterilisation von Arzneilösungen, Arbeitsutensilien, Gerätschaften, Behältern usw. zu befassen hat, immer wieder vor Unklarheiten, Unsicherheiten und neuen Fragen.

Die vorliegende Promotionsarbeit ist im wesentlichen aus den Bedürfnissen der Praxis in der Kantonsapotheke St. Gallen (Kantonsapotheker Dr. *J. Kessler*) entstanden, wo mir unter anderem auch die Herstellung der sterilen Präparate anvertraut ist. Viele Anregungen und Erfahrungen aus meiner praktischen Tätigkeit konnte ich am Pharmazeutischen Institut der ETH während einer zweisemestrigen Beurlaubung von meinem Arbeitsplatz ausgreifender bearbeiten, zuerst unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. *K. Münzel*, dann von Herrn Prof. Dr. *K. Steiger*. Es sei mir an dieser Stelle gestattet, den vorerwähnten Herren für die Leitung der Untersuchungen meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Zu besonderem Dank bin ich auch dem Vorsteher des St. Gallischen Sanitäts-Departementes, Herrn Regierungsrat Dr. *G. Hoby*, verpflichtet. Ebenso möchte ich Herrn Kantonsapotheker Dr. *J. Kessler* und Herrn Prof. Dr. *E. Wiesmann* (Bakt. Institut des Kantons St. Gallen) für ihre wertvolle Unterstützung bestens danken.

In den Dank miteingeschlossen seien auch der Verwalter des Pharmazeutischen Institutes der ETH, Herr *R. Schwegler*, sowie das Personal der Kantonsapotheke St. Gallen.

Leer - Vide - Empty

EINLEITUNG

Untersuchungsmethoden, technische Hilfsmittel und bakteriologisches Testmaterial

Die vorliegende Arbeit, welche hauptsächlich die Ueberprüfung einiger Sterilisationsprobleme aus der Praxis einer Spitalapotheke zum Inhalt hat, wurde bewusst mit möglichst einfachen Hilfsmitteln und nach unkomplizierten Methoden ausgeführt.

Sterilisierapparate

Für die Sterilisation im freiströmenden und im gespannten, gesättigten Dampf wurden einwandige Kleinautoklaven benutzt (Egro-Kleinautoklaven* zu 9½ und 32 Liter Inhalt^{1, 2}). Als Heizquelle diente ein Gasrechaud.

Für die Heissluftsterilisation wurden elektrisch geheizte Trockenschränke mit Thermostat, ohne Luftumwälzung, verwendet.

Messgeräte für die Temperaturkontrolle im Sterilisationsgut

Zur Temperaturkontrolle im Sterilisationsgut wurden zwei Messvorrichtungen verwendet:

1. Ein Thermoelement³ einfachster Ausführung, bestehend aus einem Kupfer- und einem Konstantandraht, die an den beiden Enden zusammengelötet waren. Die eine Lötstelle wurde in ein Eis/Wasser-Gemisch getaucht, die andere in den Sterilisierapparat eingeführt. Der als Folge der Temperaturdifferenz zwischen den beiden Lötstellen entstehende thermoelektrische Strom wurde mit dem in einem der Drähte eingeschalteten Galvanometer in Millivolt gemessen. Die Mess-Skala des Galvanometers war in Temperaturgrade eingeteilt. Das Messgerät wurde im Laufe der Untersuchungen wiederholt geeicht, indem die eine Lötstelle in ein Eis/Wasser-Gemisch und die andere zusammen mit einem Quecksilber-Thermometer in ein langsam auf 150° erhitztes Paraffinöl-Bad getaucht wurde.

* Hersteller: Egloff & Co., Nieder-Rohrdorf (AG)

¹ Münzel K., Schweiz. Apoth. Ztg. 87, 589 (1949)

² Flury F., Schweiz. Apoth. Ztg. 92, 973 (1954)

³ Münzel K., Büchi J. und Schultz O. E., Galenisches Praktikum, S. 165, Stuttgart 1959.

2. Ein Widerstands-Thermometer, bestehend aus einer in eine Schutzhülle eingebauten Platin-Wicklung (Temperatur-Fühler) und einem Empfangsgerät mit Gleichstromquelle. Das Prinzip der Temperatur-Messung mit einem Widerstandsthermometer beruht darauf, dass der elektrische Widerstand der Metalle temperaturabhängig ist und bei reinen Metallen ungefähr proportional zur absoluten Temperatur zunimmt. Diese Temperaturabhängigkeit kann z. B. mit Hilfe einer Platin-Spirale, von welcher der Widerstand bei 0° C und der Temperatur-Koeffizient des Widerstandes genau bekannt sind, zur Temperaturmessung benutzt werden.⁴

Mit dem verwendeten Messgerät, das mit sechs Anschlüssen für die zu den temperatur-empfindlichen Platinspiralen führenden Kabel ausgerüstet ist, konnte die Temperaturmessung in unmittelbarer Folge durch Betätigung eines Drehschalters an sechs verschiedenen Stellen vorgenommen werden. In analoger Weise wie das Thermoelement wurden auch die verschiedenen Kabel des Widerstandsthermometers von Zeit zu Zeit neu geeicht.

Für die Temperaturkontrolle im Autoklaven wurden zwischen dem Dampftopf und dessen Deckel zwei dickere Gummidichtungen gelegt, in die halbrunde, dem Durchmesser der Kabel angepasste Einkerbungen geschnitten waren.

Für die Temperaturmessungen im Trockenschrank wurden die Kabel durch einen gelochten Korkzapfen geführt, der in die oben am Heissluftofen angebrachte Öffnung gestopft worden war.

Testkeime und Sterilitätsprüfung

Für die Sterilitätsprüfung wurde mit einer einzigen, an der betreffenden Stelle erwähnten Ausnahme (Seite 100), die gleiche, auf Wärmeresistenz und Keimzahl getestete Sporenerde verwendet. Es wurde absichtlich natürliche Sporenerde mit sogenannten «nativen» Erdsproren, im Gegensatz zu Kultursproren, als Testmaterial gewählt, um den Gegebenheiten der Praxis, wo die Kontaminierung von ärztlichen und pharmazeutischen Gegenständen und Substanzen ebenfalls durch Staub, also durch evtl. sporenhaltige, feinste Erdpartikelchen erfolgt, nachzukommen. Nachdem eine aus einem St. Galler Gartenbeet stammende Erde sich bei der Prüfung auf Wärmeresistenz als ungenügend erwiesen hatte (Wärmeresistenz in kochendem Wasser lediglich 3 - 4 Stunden), konnten wir vom Hygiene-Institut der ETH* in Zürich ein als «Komposterde 45» deklariertes Erdsprorenmaterial beziehen, das sich in der Folge sehr gut bewährte.

Diese Sporenerde, welche bis auf die oben erwähnte Ausnahme für alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Sterilisationsversuche Verwendung fand, wurde wie folgt geprüft:

⁴ Seiler U. und Hardmeier W., Lehrbuch der Physik, S. 464, Zürich 1943

* Wir danken Herrn Dr. M. N. Metaxas, Zürich, der uns dieses Material zur Verfügung gestellt hat.

1. Bestimmung der Wärmeresistenz der Test-Erde

a) Resistenz im strömenden Wasserdampf von ca. 98°

Je 50 mg der bei 105° getrockneten, fein pulverisierten Komposterde wurde auf 24 quadratische Stoffläppchen von ca. 2 cm Seitenlänge gegeben, die hierauf zu Säckchen geformt wurden. Am oberen, ringförmigen Teil eines Dreifusses wurden nun 24 aus Drahtstücken hergestellte Haken angebracht und daran mit einem Schlick die an langen Sattlerfäden gebundenen Säckchen derart eingehängt, dass sie sich in mittlerer Höhe des Dreifusses befanden. Der Dreifuss mit den Säckchen wurde in einen geräumigen, elektrisch heizbaren, einwandigen Autoklaven gestellt und die Verlängerung der Fäden oberhalb des Schlickes über den Rand des Autoklaven gelegt. Bei angeschraubtem Deckel und offenem Dampfventil wurde die Temperatur während 12 Stunden auf ca. 98° gehalten. In Abständen von je 1 Stunde wurde der Deckel kurz gehoben, wobei jedesmal 2 Säckchen an den Fäden herausgezogen, von diesen aseptisch abgetrennt und je in ein Röhrchen mit Thioglykolat-Bouillon gegeben wurden. Bei dieser Gelegenheit wurde auch das verdampfte Heizwasser ersetzt.

Die Bebrütung der 12 Säckchen-Paare während 10 Tagen bei 37° ergab das in Tab. 1 wiedergegebene Resultat.

Tab. 1 Dampfresistenz der Test-Sporen im strömenden Wasserdampf

Zahlen = Dampfeinwirkung in Stunden											
+ = Wachstum											
(+) = Wachstum fraglich		jedes +-Zeichen entspricht einem Säckchen mit 50 mg Sporenerde									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
++	++	++	++	+(+)	++	++	++	+(+)	++	++	++

b) Resistenz in Wasser bei 120°

Im Laufe der praktischen Untersuchungen wurde die in Wasser aufgeschwemmte Sporenerde wiederholt bei 120° während 20 Minuten autoklaviert (siehe z. B. Tab. 16 S. 55, Tab. 18 S. 63).

Dieses Verfahren ergab bei der Sterilitätsprüfung in Thioglykolat-Bouillon bei 37° während 10 Tagen stets Nicht-Wachstum.

In einem einzelnen Testversuch wurde eine Aufschwemmung von 100 mg Erde in 20 ml Wasser nur während 5 Minuten bei 120° erhitzt. Von 6 Proben zu 1 ml Suspension (5 mg Erde) ergaben 5 Nicht-Wachstum und 1 Wachstum.

c) Resistenz im Trockenschrank bei 105°

Infolge eines Versehens wurde die Sporenerde unbeabsichtigt auf ihre Wär-

meresistenz in Heissluft geprüft. Drei mit einem Sporenerde/Tragantschleim bestrichene Fäden sollten lediglich im Heissluftofen getrocknet werden; dieser blieb aber aus Versehen über Nacht eingeschaltet, so dass die kontaminierten Fäden während 16 Stunden der Trockentemperatur von 105⁰ ausgesetzt blieben. Bei der anschliessend während 10 Tagen vorgenommenen Sterilitätsprüfung in Thioglykolat-Bouillon bei 37⁰ erwiesen sich 2 der 3 Fäden als nicht steril.

2. Bestimmung der Keimzahl in der Test-Sporenerde

1,0 g der fein pulverisierten Komposterde wurde zu 100 ml sterilem Wasser gegeben und die Suspension gut durchgeschüttelt. Um die weniger wärmeresistenten Keime abzutöten, wurde die Erdaufschwemmung während 20 Minuten im strömenden Wasserdampf erhitzt. Aus dieser so behandelten Stammsuspension 1 : 100, entsprechend 0,01 g Erde/ml (1) wurden mit sterilem Wasser folgende Verdünnungen hergestellt:

1 : 1 000, entsprechend 0,001 g Erde / ml (2)

1 : 10 000, entsprechend 0,0001 g Erde / ml (3)

1 : 100 000, entsprechend 0,00001 g Erde / ml (4)

Von den letzteren 2 Verdünnungen (3) und (4) wurde je 1 ml zu je ca. 30 ml durch Erwärmen verflüssigtem, sterilem Nähragar (Thioglykolat-Bouillon mit Agar-Zusatz) gegeben, der beimpfte, noch flüssige Nährboden gut durchgemischt und in sterile Petri-Schalen gegossen. Die wieder verfestigten Nährböden wurden während 14 Tagen bei 37⁰ bebrütet. Die nach dieser Zeit vorgenommene Zählung der auf den Platten gewachsenen Kolonien ergab folgendes Resultat:

Verdünnung (3) entsprechend 0,0001 g Erde / ml : 23 Kolonien, entsprechend 230 000 Keime / 1,0 g Erde.

Verdünnung (4) entsprechend 0,00001 g Erde / ml : 3 Kolonien, entsprechend 300 000 Keime / 1,0 g Erde.

Diese einfache Bestimmungsmethode ergab wenigstens grobe Anhaltspunkte über den Keimgehalt der verwendeten Sporenerde, der zwischen 200 000 und 300 000 Keime pro 1,0 g Material liegen dürfte.

3. Kontaminierung des Versuchsmaterials mit der Test-Sporenerde

Die Sporenerde wurde je nach der Art des zu untersuchenden Sterilisationsgutes in Stoffläppchen verpackt, in Form eines Tragantschleimes auf Fäden aufgetragen oder nackt verwendet. Die Einzelheiten sind bei der Beschreibung der verschiedenen Versuche angegeben.

4. Sterilitätsprüfung

a) Nährmedien

Als Nährmedien für die Sterilitätsprüfung wurden anfänglich sowohl die Pepton-Glukose-Bouillon als auch die Natriumthioglykolat-Nährlösung nach der Vorschrift der Ph. Helv. V, Suppl. II verwendet. Nachdem aber in Vorversuchen festgestellt werden konnte, dass die Erdsproren des benutzten Testmaterials sowohl im Medium für Aerobier als auch in dem für Anaerobier gleich gut gediehen, wurde in der Folge nur noch in Thioglykolat-Bouillon überimpft, die zuerst nach der Vorschrift der Ph. Helv. V hergestellt worden war. Für den weitaus grössten Teil der Untersuchungen wurde aber das käufliche *Bacto Fluid Thioglycollate Medium «Difco»** benutzt, das sich ausgezeichnet bewährte. Es handelt sich dabei um eine Pulvermischung** folgender Zusammensetzung:

Bacto-Hefeextrakt	5	g
Bacto-Kasein	15	g
Bacto-Dextrose	5	g
Kochsalz	2,5	g
l-Zystin «Difco»	0,75	g
Thioglykolsäure	0,3	ml
Bacto-Agar	0,75	g
Resazurin	0,001	g

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Nährlösung werden 29,5 g der Mischung zu 1 l kaltem, destilliertem Wasser gegeben und durch Erhitzen auf den Siedepunkt gelöst. Eine Filtration ist meist nicht nötig. Nach dem Abfüllen in die Prüf-Röhrchen oder Flaschen wird die Nährlösung bei 120° während 20 Minuten in einem Autoklaven sterilisiert.

Die fertige Bouillon ist im oberen Teil, in der Sauerstoff-haltigen Zone, rötlich-violett verfärbt. Es darf nicht mehr als ein Drittel der Flüssigkeitssäule verfärbt sein. Reicht die Sauerstoff-Zone weiter hinunter, so kann die Nährlösung höchstens einmal durch Eintauchen der Röhrchen in ein kochendes Wasserbad entgast werden.

Nach den Angaben der Herstellerfirma weist die fertige Nährlösung ein pH von 7,1 auf. Eigene Messungen ergaben für die nicht sterilisierte Bouillon ein pH von 7,30 und für die autoklavierte Bouillon ein pH von 7,15.

Es wurden stets nur diejenigen Mengen an Nährlösung hergestellt, die für 1 - 2 Wochen benötigt wurden.

b) Ausführung der Sterilitätsprüfung

Im allgemeinen wurde die in Säckchen verpackte oder auf Fäden aufgetragene Erde in die Röhrchen mit steriler Nährbouillon gegeben, gelegentlich

* Hersteller: Difco Laboratories, Detroit, Vertrieb in der Schweiz: R. Brunschwig, Basel, Beinwilerstrasse 1

** Difco Manual, 9th. Ed., S. 195, Detroit 1953

aber auch umgekehrt die Bouillon in die mit der nackten Testerde kontaminierten Behälter gegossen und darin bebrütet.

Die Beimpfung erfolgte gewöhnlich am offenen Arbeitsplatz mit den üblichen bakteriologischen Kautelen. Sekundär-Kontaminierungen konnten darum nicht immer vermieden werden, doch waren sie praktisch immer leicht als solche zu erkennen.

Die beimpften Nährmedien wurden fast durchwegs bei 37° während 10 Tagen bebrütet. Kulturen mit fraglichem Wachstum wurden zur weiteren Beobachtung in neue Bouillonröhrchen überimpft.

c) Diskussion der angewandten Prüfungsmethode

Die beschriebene Technik der Sterilitätsprüfung erscheint im Vergleich zu den betreffenden Vorschriften der Ph. Helv. V als ziemlich vereinfacht. Bei der Ueberprüfung von Sterilisationsverfahren mit Testkeimen bestehen aber auch wesentlich andere Voraussetzungen als bei der bakteriologischen Kontrolle von nicht künstlich kontaminierten, normalen Fabrikations-Chargen. Im letzteren Fall muss auf die Anwesenheit von gänzlich unbekanntem Keimen geprüft werden, deren Anforderungen an das Nährsubstrat sehr verschieden sein können und die zudem möglicherweise nur in verschwindend geringer Anzahl in den Versuchsproben enthalten sind. Im Falle der Sterilitätskontrolle mit geprüften Testkeimen hat man es hingegen mit einem mikrobiellen Material zu tun, das nicht nur in genügender Menge vorhanden, sondern auch hinsichtlich seiner Ansprüche an das Nährmedium und an die Bebrütungstemperatur bekannt ist.

Was die nach der angewandten Prüfungsmethode erzielten Resultate anbelangt, darf aber aus dem Fehlen von Wachstumserscheinungen in der Nährbouillon nach 10 Tagen Bebrütung bei 37° nicht auf die absolute Sterilität derselben geschlossen werden. Wie *Kurzweil*⁵, *Gelinsky und Lockemann*⁶, *Dobberstein*⁷ u. a. nachweisen konnten, geht die Entwicklung der Kulturen von höchst thermoresistenten Sporen sehr langsam vor sich und ist von besonderen Bedingungen hinsichtlich des Nährmediums und der Bebrütungstemperatur abhängig.

So ergaben die Versuche von *Gelinsky und Lockemann* für die von ihnen untersuchten Erds sporen eine Wachstumsgrenze von 13 Wochen bei einer Bebrütungstemperatur von 37°. *Dobberstein* konnte Sporen, die während 4½ Stunden der Einwirkung von gespanntem, gesättigtem Dampf von 134° ausgesetzt worden waren, in geeigneten anaeroben Kulturen bei einer Bebrütungstemperatur von 60° zum Auskeimen bringen.

Es ist also sehr wohl möglich, dass unter den Bedingungen der von uns

⁵ Kurzweil H., Arch. Hyg. Bakt. 138, 77 (1954)

⁶ Gelinsky E. und Lockemann G., Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.) 156, 305 (1951)

⁷ Dobberstein H., Zbl. Bakt. (I. Abt. Orig.) 168, 606 (1957)

angewandten Prüfungsmethode die Sterilität der Untersuchungsproben nur vorgetäuscht war, weil allfällige im Testmaterial vorhandene höchst thermoresistente Sporen innert der zehntägigen Bebrütung bei 37° im Thioglykolat-Medium sich zu wenig entwickeln konnten, um die Bouillon sichtbar zu verändern. Diesen theoretischen Ueberlegungen kann aber die Tatsache gegenübergestellt werden, dass das während 12 Stunden im strömenden Wasserdampf erhitzte Testsporenmaterial unter den gestellten Bedingungen der Sterilitätsprüfung in den Bouillonröhrchen Wachstum zeigte. Das benutzte Testmaterial enthält also relativ wärmeresistente Keime, die innert weniger Tage bei 37° in der Thioglykolat-Bouillon auskeimen und sich rasch vermehren, die aber diese Fähigkeit einbüßen, wenn sie der Autoklavierung bei 120° während 20 Minuten unterworfen worden sind.

Von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet, darf darum die verwendete Sporenerde als für praktische Kontrollzwecke durchaus brauchbares Material bezeichnet werden.

I. Sterilisation verschiedener pharmazeutischer und ärztlicher Utensilien im Autoklaven

ALLGEMEINES ÜBER DIE STERILISATION IM AUTOKLAVEN

Mit Recht nimmt die Autoklavierung, d. h. die Behandlung mit gespanntem, gesättigtem Wasserdampf, unter den thermischen Sterilisationsverfahren die Vorrangstellung ein. Ausser dem relativ selten anwendbaren Abflammen ist sie nicht nur die kürzeste Methode (ca. 20 Min. reine Abtötungszeit), sondern auch noch diejenige, die bei relativ niedrigster Temperatur (120°) unter den normalen Bedingungen der Praxis Gewähr für den Sterilisationserfolg bietet. Wohl ist die Annahme *Konrichs*⁸, dass diese Wärmebehandlung zur sicheren Abtötung der resistentesten Erdsproren ausreichend sei, inzwischen von verschiedenen Autoren, wie *Kurzweil*⁹, *Gelinsky und Lockemann*⁶ und *Dobberstein*⁷ widerlegt worden. Tatsache bleibt aber, dass sich die von *Konrich* aufgestellten Sterilisationsnormen in einer jahrzehntelangen Praxis ausserordentlich gut bewährt haben. Die neuen Erkenntnisse über die Wärmeresistenz der thermophilen Sporen, deren Bedeutung für die bakteriologische Forschung hier keineswegs herabgemindert werden soll, sind aus verschiedenen Gründen nicht ohne weiteres für die pharmazeutische und ärztliche Sterilisationspraxis massgebend:

- Die höchstresistenten Keime dürfen bei sorgfältiger Reinigung, Aufbewahrung und Handhabung der pharmazeutischen und ärztlichen Utensilien vor der Sterilisation und bei fachkundiger Herstellung der galenischen Präparate mit grösster Wahrscheinlichkeit als Contaminantia ausgeschlossen werden.
- Die Anwendung von Dampftemperaturen über 120° ist wegen der Zersetzlichkeit vieler Materialien (Gummi, Textilien, Plastik), wegen der Thermolabilität zahlreicher Arzneisubstanzen und wegen des zunehmenden Innendruckes in mit wässrigen Lösungen gefüllten Flaschen oftmals nicht möglich.
- Die Frage der Wärmeresistenz von Sporen ist noch nicht völlig abgeklärt, so dass die zur Erreichung der absoluten Sterilität erforderlichen Temperatur/Zeit-Faktoren vorläufig überhaupt nicht normiert werden können.

⁸ Konrich F., Die bakterielle Keimtötung durch Wärme, Stuttgart 1938

⁹ Kurzweil H., Zschr. Hyg. u. Inf. Krh. 124, 1 (1942/43)

Die Sterilisation im Autoklaven (120° / 20 Min.) ist darum auch heute noch das Sterilisationsverfahren der Wahl, das immer anzustreben ist, wenn es die Beschaffenheit des Sterilisationsgutes zulässt. Sie ist nicht anwendbar für thermolabile Materialien sowie für Gegenstände und Stoffe, die den Zutritt des Wasserdampfes zu den Mikroorganismen verhindern. Dazu gehören z. B. Oele, Fette, Wachse und andere organische Substanzen und selbstverständlich hermetisch verschlossene, trockene Gefässe, sowie trockene Apparate und Utensilien mit unzugänglichen Hohlräumen. Sie ist ferner nicht geeignet für wasserlösliche Pulver und andere Substanzen, die beim Kontakt mit Wasserdampf zerfliessen oder sonstwie ihre Brauchbarkeit einbüssen. Voraussetzung für den Sterilisationserfolg ist die richtige Konstruktion des Autoklaven und dessen fachgerechte Handhabung. Unseres Erachtens ist es viel wichtiger, auf die Einhaltung dieser Voraussetzungen zu achten, als durch Erhöhung der Sterilisationstemperatur auf allzu hypothetische Wärmeresistenzgrade Rücksicht zu nehmen. Ueber die Theorie des Autoklaven und des Autoklavierens besteht eine umfangreiche Literatur⁸,¹¹⁻¹⁴, und es soll darum hier nur kurz das Wesentliche darüber gesagt werden.

Das Hauptproblem der Sterilisation im Autoklaven ist die sogenannte «Luftfrage», die besonders von *Konrich*⁸ und *Leseurre*¹⁰ eingehend untersucht wurde. Luftbeimischungen zum Dampf wirken sich auf zwei Arten nachteilig aus:

- Die gleichmässige Durchwärmung des Sterilisationsgutes wird verzögert.
 - Die Tötungskraft des Dampfes wird durch Beimengung von Luft vermindert.
- Es ist darum von grösster Bedeutung, für eine möglichst weitgehende Entfernung der Luft zu sorgen, nicht nur aus dem freien Dampfraum des Autoklaven, was verhältnismässig leicht zu bewerkstelligen ist, sondern auch aus dem Sterilisationsgut selbst, was sich als viel schwieriger erweist. Es mag scheinen, dass hier ein etwas willkürlicher Trennungstrich zwischen dem freien Dampfraum des Autoklaven und dem Sterilisationsgut gezogen wird. Diese Unterscheidung ist aber berechtigt und notwendig, weil die Bedingungen der Luftentfernung aus dem einen und dem andern stark voneinander abweichen.

1. Die Entlüftung des freien Dampfraumes des Autoklaven

Bei der Entlüftung des freien Dampfraumes – es wird hier vorerst ein einwandiger Sterilisierapparat, mit dem Heizwasser auf dem Grunde der Sterilisationskammer, ins Auge gefasst – sind verschiedene Faktoren beteiligt, die z. T. ineinanderspielen:

¹⁰ Leseurre M. A., *Sciences pharmacol.* 43, 370 (1936)

¹¹ Stich C., *Bakteriologie, Serologie und Sterilisation im Apothekenbetriebe*, Berlin 1950

¹² Lautenschläger C. L. und Schmidt H., *Sterilisations-Methoden für die pharmaz. und ärztliche Praxis*, Stuttgart 1954

¹³ Reddish G. F. u. Mitarbeiter, *Antiseptics, Disinfectants, Fungicides, and Chemical and Physical Sterilization*, Philadelphia 1954

¹⁴ Bowie J. H., *Pharm. J.* 174, 473, 489 (1955)

a) *Expansion der Luft*

Beim Aufheizen des Autoklaven dehnt sich die Luft durch die Erwärmung aus, und ein Teil davon entweicht durch das offene Dampfventil. Wenn man bedenkt, dass das Volumina-Verhältnis von trockener, kalter Luft zu solcher von 100° nur 1 : 1,3 beträgt, erkennt man sofort, dass die durch Expansion zustande kommende Luftverdrängung aus dem Autoklaven nur sehr bescheiden ist.

b) *Austreiben der Luft durch den Dampf*

Bei fortschreitender Erwärmung und besonders bei beginnendem Sieden des Heizwassers wird die Luft durch die Dampfentwicklung in Bewegung gesetzt und nach aussen abgetrieben (Stosskraft des Dampfes). Gleichzeitig mischt sich der Dampf mit der Luft (Diffusion) und, weil der Ausdehnungskoeffizient der feuchten Luft grösser ist als derjenige der trockenen, tritt die Expansionskraft stärker in Erscheinung. Die nachfolgenden, *Leseurre*¹⁰ entnommenen Werte mögen dies veranschaulichen:

Das Volumina-Verhältnis von wassergesättigter kalter Luft zu wassergesättigter warmer Luft ist:

bei 50° 1 : 1,27

bei 75° 1 : 1,95

bei 90° 1 : 4

bei 100° 1 : praktisch unendlich

c) *Unterschied im spez. Gewicht von Dampf und Luft*

Wenn es sich um einen doppelwandigen Autoklaven handelt, in dem das Luftabflussrohr auf dem Boden der Dampfkammer angebracht ist und bei dem sich das Heizwasser ausserhalb derselben befindet, kommt das grössere spez. Gewicht der Luft gegenüber dem des Dampfes als weiterer Faktor für die Luftentfernung hinzu. Der von oben einströmende, spezifisch leichtere Dampf (1 l Dampf von 100° wiegt 0,606 g) treibt die spezifisch schwerere Luft (1 l Luft von 20° wiegt 1,206 g) auf dem physikalisch zweckmässigen Weg von oben nach unten zum Luftablasser hinaus. Die Bedingungen für die möglichst vollständige Luftentfernung aus dem freien Dampfraum sind darum beim doppelwandigen Autoklaven eher gegeben als beim einwandigen, aus dem die Luft nach oben entweichen muss.

Die bis anhin erörterten Bedingungen für die Luftentfernung gelten nicht nur bei leerer Sterilisationskammer, sondern auch dann, wenn diese mit massivem Gut (gefüllte Flaschen, Instrumente und Utensilien ohne Hohlräume) beschickt ist, weil es ja dann nur auf die Luftverdrängung aus dem freien Dampfraum ankommt. In diesem Fall ist das Luft-Problem sehr leicht zu lösen. Es genügt dafür, das Luftventil des Autoklaven so lange offen zu lassen, bis die Temperatur des

austretenden Dampfes (bzw. die Temperaturangabe des am Autoklavendeckel angebrachten Thermometers) 100° beträgt, und dann bei offenem Ventil noch etwa drei Minuten als Sicherheitsmarge dazuzugeben ¹⁵.

Die Luft ist zu diesem Zeitpunkt praktisch aus dem Autoklaven entwichen, das Dampfventil kann geschlossen werden, denn es sind nun im Dampfraum die Voraussetzungen geschaffen, um nach Erreichen der Sterilisationstemperatur von 120° zuverlässig sterilisieren zu können. Es ist lediglich noch das Nachhinken der Temperatur im Sterilisationsgut (Ausgleichszeit) zu berücksichtigen.

2. Die Verdrängung der Luft aus porösem Material und aus Utensilien mit grösseren Hohlräumen

Die Entlüftung von porösem Gut und von solchem mit grösseren Hohlräumen geht keineswegs parallel mit der Entlüftung der Dampfkammer, was auf den Umstand zurückzuführen ist, dass sich die Luft nur sehr widerwillig mit dem Dampfe mischt. Bei leerer Sterilisationskammer oder wenn diese nur mit massivem Gut beschickt ist, hat die Luft nur eine Ausweichmöglichkeit: durch das Luftventil hinaus ins Freie. Wenn der Autoklav hingegen mit porösem oder Hohlräume enthaltendem Material gefüllt ist, hat die Luft die Tendenz, in den darin vorhandenen «Schlupfwinkeln» zu verweilen, während der Dampf vorzugsweise den Weg des geringsten Widerstandes, d. h. am zu sterilisierenden Material vorbeigeht, wodurch die so treffend als «Luftpöster» und «Luftinseln» bezeichneten Kalt- bzw. Trockenstellen im Sterilisationsgut entstehen. Wie kommt es nun trotzdem zum Eindringen des Dampfes in diese Schlupfwinkel und welche Massnahmen können getroffen werden, um die Durchdämpfung derselben zu fördern? Um diese Frage beantworten zu können, müssen zunächst die Vorgänge in porösem, d. h. faserigem Material (Watte, Verbandstoff, Tücher etc.) einerseits und in solchem mit grösseren Hohlräumen andererseits unterschieden werden.

a) Die Entlüftung von porösem Material

Bei der Luftaustreibung aus porösem Material treten vorerst einmal die bereits erwähnten Kräfte der Expansion und der spez. Schwere der Luft sowie die Stosskraft des Dampfes in Funktion. Diese Kräfte können sich aber darin viel weniger gut auswirken als im freien Dampfraum. Als neuer und Hauptfaktor für die Entlüftung von porösem Gut tritt hier die von *Konrich*⁸ beschriebene Saugkraft des kondensierenden Dampfes auf:

Beim Auftreffen des gesättigten Dampfes auf das Fasermaterial wird er abgekühlt und dadurch in Wasser zurückverwandelt. Aus 1650 Raumteilen Dampf von 100° entsteht 1 Raumteil Wasser. Bei der Kondensation des Dampfes an irgend einem Punkt des Sterilisationsgutes tritt also ein sehr

¹⁵ Flury F., Schweiz. Apoth. Ztg. 92, 973 (1954)

kräftiges Vakuum auf, wodurch ein Sog sowohl auf die im Gut vorhandene Luft als auch auf den nachströmenden Dampf ausgeübt wird.

Bis jetzt war nur von Entlüftungsfaktoren die Rede, die bei der Einwirkung des Dampfes auf das Sterilisationsgut spontan in Erscheinung treten. Die Luft kann aber auch durch Sog von aussen aus der Autoklavenkammer und folglich aus dem Sterilisationsgut entfernt werden. Bei einwandigen Autoklaven wird zu diesem Zwecke eine Wasserstrahlpumpe am Luftablasser angeschlossen; bei grossen, doppelwandigen Autoklaven ist es vielfach möglich, durch Betätigung eines Steuerventils den gespannten Dampf aus dem Mantel in eine Dampfstrahlpumpe zu leiten, die den Sterilisationsraum evakuiert. Mit der aktiven Evakuierung des Autoklaven vor der Sterilisation wird die Entlüftung von porösem Material gefördert und dadurch die Durchdringung des Gutes mit Dampf beschleunigt. Immerhin ist zu bedenken, dass damit – auch wenn der Deckel des Autoklaven ganz dicht schliesst, was bei weitem nicht immer der Fall ist – nur ein Teilvakuum erzeugt werden kann.

Besonders von *Leseurre*¹⁶ wird noch auf ein weiteres Mittel, das zur Entlüftung beiträgt, hingewiesen: die Benetzung jener Stelle im Sterilisationsgut, wohin erwartungsgemäss die Luft bei der Einwirkung des Dampfes von aussen zurückgedrängt wird. Das Benetzungswasser – es kann auch Alkohol verwendet werden – erwärmt sich dann durch Konvektion und verdampft. Der Dampf breitet sich im Sterilisationsgut aus und entweicht nach aussen, wobei er gleichzeitig die Luft mit sich reisst. Bei Verbandstoff-Paketen ist dieses Verfahren wohl weniger gut anwendbar. Es muss mit einer mehr oder weniger grossen Verzögerung in der Erwärmung der Benetzungsflüssigkeit gerechnet werden, weil das Gut zweckmässigerweise am Kaltpunkt zu benetzen ist. Das Problem der Sterilisation von porösem Material ist von *Konrich*⁸ und Mitarbeitern, *Leseurre*¹⁶, *Oesterle*¹⁷, *Bowie*¹⁴, *Shotton*¹⁸ u. a. eingehend untersucht worden und wird auch in den Handbüchern ausführlich behandelt. Es seien darum hier nur einige Grundregeln aufgezählt, die dabei zu befolgen sind:

- Bei der Verpackung von porösem Material ist dafür zu sorgen, dass der Durchdämpfung desselben nicht unnötigerweise Widerstand entgegengesetzt wird. Die Pakete sollen nicht zu gross und nicht zu dicht gepackt sein. Die Hülle darf für den Dampf kein wesentliches Hindernis darstellen.
- Beim Laden des Gutes in den Autoklaven ist darauf zu achten, dass der Dampf die Behälter von oben nach unten passieren kann (Deckel-Boden-Lochung). Die Behälter (Trommeln) dürfen nicht zu hoch sein.
- Bei der Festlegung der Sterilisationszeit ist auf Art und Menge des Sterilisationsgutes Rücksicht zu nehmen. Die reine Sterilisationszeit im gesättigten

¹⁶ Leseurre M. A., *Ann. pharm. franç.* 6, 276 (1948)

¹⁷ Oesterle P., *Pharmazie* 2, 165 (1947)

¹⁸ Shotton E., *Pharm. J.* 182, 315 (1959)

Dampf von 120° soll mindestens 30 Minuten, bei grösseren Chargen noch längere Zeit betragen. Die Betriebszeiten (Anwärmezeit, Sterilisationszeit und Entwärmungszeit) müssen für jeden benutzten Sterilisierapparat und für alle in Frage kommenden Sterilisationsaufgaben vorerst experimentell ermittelt werden. Am besten geschieht dies durch Thermographen, die den Verlauf der Wärmebehandlung an verschiedenen Stellen des Gutes kontinuierlich registrieren.

Wenigstens bei Inbetriebnahme eines neuen Autoklaven ist es sehr ratsam, eine bakteriologische Prüfung mit resistenten Testkeimen, die gleichmässig im Gut verteilt sind, vorzunehmen.

b) *Die Entlüftung von Sterilisationsgütern mit grösseren Hohlräumen*

Dieser Frage ist bisher weniger Beachtung geschenkt worden, wohl deshalb, weil die Sterilisation von Material mit grösseren Hohlräumen seltener vorkommt, und vielleicht auch, weil sie derjenigen von porösem Material gleichgestellt wird. Das letztere ist aber keineswegs richtig, denn für die Luftaustreibung aus grossen Hohlräumen bestehen wesentlich andere Bedingungen, was sofort klar wird, wenn man z. B. ein Paket Verbandstoff und eine leere, etwa mit einer Kappe aus Pergament-Papier nicht hermetisch verschlossene Flasche unter dem Gesichtspunkt der Entlüftung vergleicht. Im ersteren muss der Dampf, um in das Sterilisationsgut einzudringen, den Widerstand des Fasermaterials überwinden, das ihm allerdings durch die Möglichkeit der Kondensation wiederum erlaubt, sich nach und nach in das poröse Material «einzusaugen». In letzterer trifft der Dampf direkt auf die eingeschlossene Luft. Wenn die Flasche nach oben ausmündet, kann die Durchmischung von Dampf und Luft nur durch Diffusion, also nur sehr langsam, zustande kommen. Ist die Mündung der Flasche nach unten gerichtet, kommt die spez. Schwere der Luft als weiterer Faktor für die Luftaustreibung hinzu, und es ist zu erwarten, dass sich diese viel ungehinderter auswirken kann als im Fasermaterial des Verbandstoffpaketes. Eine Saugwirkung durch Dampfkondensation fällt bei der Entlüftung der leeren Flasche ausser Betracht, weil das Innere der Glaswand von aussen her erwärmt wird und darum der ohnehin nur langsam hineindiffundierende Dampf beim Auftreffen auf dasselbe nicht mehr abgekühlt wird.

Selbstverständlich kann und soll auch bei der Sterilisation von offenen, leeren Hohlgefässen die spontane Entlüftung durch die aktive Evakuierung unterstützt werden. Wie schon oben bei der Besprechung des porösen Materials angeführt wurde, ist aber auch hier zu erwarten, dass die Luftmenge wohl bis auf geringe Reste in den Hohlräumen herabgesetzt werden kann, dass aber beim Zutritt des Dampfes diese verdünnte Luft wieder verdichtet und in die dem Dampf am wenigsten zugänglichen unteren Partien der Hohlräume abgedrängt wird. Auf Grund dieser Annahme erscheint es wichtig, bei

der Sterilisation von Hohlgefäßen dafür zu sorgen, dass der gefangenen Luft der Fluchtweg nach unten offen gelassen wird.

Diese Ueberlegungen führen auch dazu, dass für Flaschen und Geräte mit unten geschlossenen Hohlräumen das Benetzungsverfahren grosse Vorteile bieten könnte. Es schien uns darum nützlich, die experimentellen Untersuchungen vorzunehmen, welche die Beantwortung dieses Fragenkomplexes ermöglichen sollten.

EIGENE VERSUCHE

Seitdem in vermehrtem Masse die Keimfiltration und die aseptische Herstellung von Arzneiformen als Sterilisationsmethoden Eingang in die pharmazeutische Praxis gefunden haben, gehört die Wärme-Sterilisation von Hohlgefäßen aller Art (Keimfilter-Apparaturen, Auffangflaschen für die Filtrate, Abgabefläschchen für Collyria etc.) zu den täglichen Aufgaben des Industrie-, Offizin- und Spitalapothekers. Diesem wird zudem öfters noch die Keimfreimachung der Infusionsbestecke, Katheter und anderer ärztlicher Utensilien anvertraut. Wie schon erwähnt, sind nur spärliche und allenfalls nur allgemeine Angaben über die Sterilisation von derartigem Material in der Literatur zu finden. Es schien uns darum angezeigt, dieses Problem am Beispiel einiger praktischer Sterilisationsaufgaben zu untersuchen. Kurz vor Abschluss des vorliegenden Beitrages lasen wir einen Bericht von *Gstirner und Müller*¹⁹ über die Sterilisation von Hohlgefäßen in Heissluft- und Dampfsterilisatoren, wobei die Autoren das Problem unter besonderer Berücksichtigung der Anwärmezeiten untersuchten.

1. Autoklavierung von Erdsporen in verschlossenen, trockenen Gefäßen und in trockenen Apparaten mit abgeschlossenen Hohlräumen bei 120° während 20 Minuten

Die Wärmebehandlung im Autoklaven bei 120° während 20 Minuten kann bei Vorhandensein von resistenten Sporen an den dampfunzugänglichen Stellen selbstverständlich nicht zur Sterilität führen, weil sie ja nur einer Heissluft-Behandlung bei der relativ niedrigen Autoklaven-Temperatur gleichkommt, die zur Abtötung von resistenteren Mikroorganismen ganz unzureichend ist.

Wenn wir trotzdem solche Versuche ausführten, so geschah dies mehr, um unser Erdsporenmaterial auf seine Wärmeresistenz zu testen und um Vergleichsresultate zu anderen Sterilisationsversuchen zu erhalten. Diese Versuche wurden nicht für sich allein vorgenommen, sondern immer wieder in andere Untersuchungsreihen als Vergleichsfall miteinbezogen. Beispiele dafür sind die Versuche No. 8 und No. 11 auf Tab. 5/6 S. 26/27, wo auch die Versuchsbedingungen und die Ausführung der Prüfung auf Sterilität näher beschrieben sind.

Ergebnisse der Versuche

Alle Versuche, unser Erdsporenmaterial im Autoklaven bei 120° während 20 Mi-

¹⁹ Gstirner F. und Müller O., Arch. Pharm. 294/66. Bd., Heft 3, Mitteilungen, 41-53 (1961)

nuten unter Verhinderung des Dampfzutrittes, also trocken zu sterilisieren, führten erwartungsgemäss nicht zur Abtötung der Testkeime.

2. Autoklavierung von Erdsporen in hermetisch verschlossenen, wenig Wasser enthaltenden Gefässen

Diese Untersuchung hatte zum Ziel, den Einfluss der Luftbeimischung auf die bakterizide Wirkung des Dampfes in abgeschlossenen Hohlräumen festzustellen. Nach den schon erwähnten Untersuchungen von *Konrich*⁸ wird die Tötungskraft des Dampfes vermindert, wenn er mit Luft vermischt ist. Bei der Sterilisation von wässrigen Flüssigkeiten in hermetisch verschlossenen Gefässen bleibt aber immer ein mehr oder weniger grosser freier Raum, aus dem die Luft nicht entweichen kann. Normalerweise, z. B. in Infusionsflaschen und in Ampullen, ist dieser Raum im Vergleich zum Volumen des gesamten Hohlraumes sehr begrenzt. In der Praxis wird diesem Sterilisationsfall darum auch keine weitere Beachtung geschenkt. Man nimmt an – und die langjährige Erfahrung hat es bestätigt –, dass bei der Abtötung der Keime kein Unterschied besteht, ob sich diese nun im Wasser bzw. in der wässrigen Lösung selbst oder im Luft- bzw. Dampfraum über der Flüssigkeit befinden.

Einen speziellen Fall stellen hingegen die Flaschen und Apparate dar, die nur nass, also praktisch leer, sterilisiert werden, ohne dass die Luft vom entstehenden Dampf nach aussen abgedrängt werden kann. Darf dann auch an den unbenetzten Stellen und im freien Raum, also auch dort, wo nur das Dampf/Luftgemisch einwirkt, mit der Abtötung von resistenten Bakteriensporen gerechnet werden? Wir haben versucht, diese Frage an einem Modellversuch abzuklären.

Versuchsbedingungen

Als Versuchsgefässe dienten 3 evakuierbare Blutplasma-Flaschen von ca. 400 ml Rauminhalt, mit Spezial-Gummiverschluss (Abb. I), in die je 10 ml destilliertes Wasser gegeben wurde. An jedem Gummizapfen wurden 4 Säckchen mit je 50 mg Sporenerde an einem Faden aufgehängt. Die Länge der Träger-Fäden wurde so bemessen, dass die Säckchen teils im oberen, teils im unteren Drittel des freien Luftraumes hingen. Es wurde darauf geachtet, dass die Säckchen mit der Testerde nicht etwa durch Berührung mit den nassen Wänden benetzt würden.

Eine Flasche wurde evakuiert, wobei wie folgt vorgegangen wurde: eine mit einer Wasserstrahlpumpe durch einen Druckschlauch verbundene, dicke Injektionsnadel wurde seitlich in den Spezial-Gummizapfen (s. Abb. I) gestossen. Die Flasche konnte so bis auf ein Vakuum von ca. 15 mm Hg evakuiert werden, worauf die Nadel rasch herausgezogen und gleichzeitig der Gummizapfen ganz in den Flaschenhals hineingedrückt wurde. Die zwei andern Flaschen wurden nicht evakuiert.

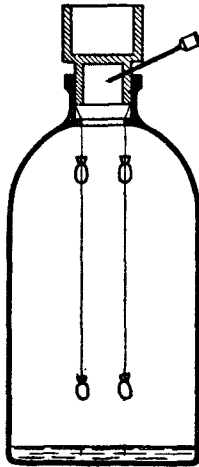


Abb. I. *Evakuierbare Blutplasma-Flasche, wenig Wasser enthaltend, mit Test-Erde in eingehängten Stoffsäckchen. Die Nadel zeigt die Einstichstelle für die Evakuierung an der Wasserstrahlpumpe.*

Eine vierte gleichartige, auch 10 ml Wasser enthaltende Flasche wurde als Kontrollgefäß für die Temperaturmessung mittels Thermoelement während der Sterilisation benutzt.

Die Ueberfall-Gummizapfen der nicht evakuierten Flaschen mussten mit einem Draht befestigt werden. Die Sterilisation erfolgte in einem einwandigen Klein-Autoklaven bei 120° während 20 Minuten.

Ergebnis der Untersuchung

a) Temperaturmessung

Die Temperaturmessung im Dampfraum der Kontrollflasche mittels Thermoelement ergab die in Tab. 2 aufgeführten Zahlenwerte.

b) Sterilitätsprüfung

Zur Sterilitätsprüfung wurden die 12 Säckchen mit Testerde (4 pro Versuchsflasche) in Röhrchen mit Thioglykolat-Bouillon fallen gelassen, indem die Fäden oberhalb des Säckchens an einer Gasflamme durchsenzt wurden. Die Bouillon-Röhrchen wurden während 10 Tagen bei 37° bebrütet. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 3 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Der Temperaturengleich zwischen Autoklavenkammer und Flascheninnern erfolgte sehr rasch. Die Nachhinkezeit betrug nur ca. 2 Minuten. Die eindeutigen Resultate der Sterilitätsprüfung weisen darauf hin, dass im gesamten freien Luftraum der sterilisierten Gefäße zu 400 ml Rauminhalt, die 10 ml Wasser

Tab. 2 Temperaturkontrolle mittels Thermoelement im Luftraum einer 10 ml Wasser enthaltenden Blutplasma-Flasche zu 400 ml Inhalt bei der Sterilisation im Autoklaven (120°/20 Min.)

Sterilisationszeit in Minuten	Temperatur im Dampfraum des Autoklaven (Thermometer am Deckel des Autoklaven)	Temperatur im Luftraum der Flasche (Thermoelement)
0	22°	23°
5	28°	27°
8	94°	61°
10	99°	93°
12	99°	100°
14	107°	103°
16	119°	115°
18	119°	120°
38	119°	120°

Tab. 3 Sterilisation von Sporenerde im Dampfraum von hermetisch verschlossenen, 10 ml Wasser enthaltenden Blutplasma-Flaschen zu 400 ml Rauminhalt bei 120° während 20 Minuten, ohne Vorevakuierung und nach Vorevakuierung der Flaschen

Versuch No.	Untersuchungsmaterial und Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum)			
		Säckchen unten		Säckchen oben	
1	2 Flaschen nicht evakuiert	— —	— —	— —	— —
2	1 Flasche auf 15 mm Hg evakuiert	— —	— —	— —	— —

enthielten, sowohl hinsichtlich der Temperatur als auch der Dampfkonzentration die zur sicheren Abtötung von resistenten Erdsproren notwendigen physikalischen Verhältnisse gegeben waren.

Schlussfolgerung

In hermetisch verschlossenen Hohlgefäßen, die Wasser enthalten und in denen der Dampf innerhalb der Grenzen des Behälters sich frei bewegen kann, wird der Sterilisationserfolg durch die Beimischung von Luft nicht in Frage gestellt.

3. Autoklavierung von leeren, trockenen, nicht hermetisch verschlossenen, aufrechtstehenden Erlenmeyerflaschen und Reagensröhrchen

Diese Untersuchung sollte den Einfluss von Form und von Grösse der Gefässe auf die Diffusionsgeschwindigkeit von Dampf und Luft abklären.

Bei aufrechtstehenden Behältern kann die Luft während der Autoklavierung nur durch die Mündung nach oben entweichen. Die Luftentfernung bzw. die Vermischung von Luft und Dampf kommt also praktisch nur durch Diffusion zustande. Diese ist aber von der Grösse der Kontaktfläche zwischen Dampf und Luft wie auch von der Form und besonders von der Tiefe des Behälters abhängig («Weglänge» des Dampfes). Zur experimentellen Abklärung dieser Frage wurden gleichzeitig relativ niedrige, trockene Erlenmeyerkölbchen und relativ hohe, trockene Reagensgläser in einem einwandigen Klein-Autoklaven sterilisiert.

Versuchsbedingungen

Als Versuchsbehälter dienten fünf Erlenmeyerkölbchen zu je 50 ml Rauminhalt, von 8 cm Höhe und mit einem Bodendurchmesser von 5 cm, und fünf Reagensgläser zu je 22 ml Rauminhalt, von 16 cm Höhe und 1,5 cm Durchmesser. Alle 10 Gefässe wurden mit je 0,2 g Sporenerde kontaminiert und lose mit Watte und einer Kappe aus Pergamentpapier verschlossen. Sterilisiert wurde bei 120° während 20 Minuten.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die Prüfung auf Sterilität wurde in Pepton-Glukose-Bouillon vorgenommen, indem diese in Mengen von ca. 15 ml aseptisch direkt in die sterilisierten, Testerde enthaltenden Versuchsgefässe gegeben wurde. Die Bebrütung erfolgte bei 37° während 7 Tagen.

Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 4 wiedergegeben.

Tab. 4 Sterilisation von trockenen, kontaminierten, lose mit Rohwatte verschlossenen Erlenmeyerkölbchen und Reagensgläsern bei 120° während 20 Minuten in einem einwandigen Kleinautoklaven ohne Vorevakuierung der Dampfammer

Versuch No.	Sterilisationsmaterial	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum)				
3	5 Erlenmeyer zu 50 ml Rauminhalt, von 8 cm Höhe und 5 cm Bodendurchmesser. Jedes Fläschchen mit 0,2 g nackter Sporenerde kontaminiert.	—	—	—	—	—
4	5 Reagensgläser zu 22 ml Rauminhalt, von 16 cm Höhe und 1,5 cm Durchmesser. Jedes Röhrchen mit 0,2 g nackter Sporenerde kontaminiert.	—	+	+	+	—

Diskussion der Resultate

Der in drei der fünf Reagensröhrchen festgestellte Sterilisationsmisserfolg lässt sich damit erklären, dass der Dampf weniger gut in die engen und relativ tiefen

Röhrchen eindringt und sich darin weniger rasch mit der Luft vermischen kann als in den relativ niedrigen und weiten Erlenmeyer-Kölbchen.

Schlussfolgerung

Bei leeren, trockenen, nicht hermetisch verschlossenen und in aufrechter Stellung sterilisierten Gefäßen ist die Durchdämpfung von Form und Tiefe der Hohlräume abhängig. Innert der normalen Autoklavierungszeit von 20 Minuten bei 120° ist sie ungenügend, wenn es sich um relativ enge und hohe Behälter, wie z. B. Reagensgläser, handelt.

4. Autoklavierung von aufrechtstehenden Erlenmeyer-Flaschen unter verschiedenen Versuchsbedingungen: trocken und nass, hermetisch verschlossen und nicht hermetisch verschlossen, ohne Vorevakuierung der Dampfkammer und mit Vorevakuierung der Dampfkammer

Zweck dieser Untersuchung war, alle Faktoren zu erfassen, die bei der Autoklavierung von aufrechtstehenden Flaschen einen Einfluss ausüben.

Versuchsbedingungen

Als Versuchsgefäße wurden Erlenmeyerkolben zu 100 ml Inhalt, mit einem Bodendurchmesser von 6 cm und einer Höhe von 10 cm benutzt. Sterilisiert wurde in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten unter folgenden Bedingungen:

a) Ohne Vorevakuierung der Dampfkammer:

- Versuch No. 5 : 3 trockene Erlenmeyer, nicht hermetisch (mit Wattebausch/Pergament-Kappe) verschlossen, 50 mg Testerde nackt auf dem Boden der Gefäße.
- Versuch No. 6 : 3 nasse Erlenmeyer (1 ml destilliertes Wasser unter Umschwenken darin verteilt), nicht hermetisch verschlossen, 50 mg Testerde nackt auf dem Boden.
- Versuch No. 7 : 1 Erlenmeyer nass, nicht hermetisch verschlossen, Testerde in drei an Fäden im Luftraum hängenden Säckchen verpackt (je 50 mg).
- Versuch No. 8 : 1 Erlenmeyer trocken, hermetisch verschlossen mit durch Draht festgehaltenem Gummistopfen, Testerde (je 50 mg) in drei Säckchen verpackt, im Luftraum hängend.
- Versuch No. 9 : 1 Erlenmeyer nass, hermetisch verschlossen mit Gummistopfen, Testerde (je 50 mg) in drei Säckchen verpackt, im Luftraum hängend.

Tab. 5 Sterilisation von kontaminierten, leeren Erlenmeyerkolben in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten unter verschiedenen Bedingungen, ohne Vor-evakuierung des Autoklaven

Versuch No.	Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung			Bemerkungen zur Sterilitätsprüfung
		1	2	3	
		+ = Wachstum — = kein Wachstum Kontaminierung: 3 Säckchen mit 50 mg Testerde in einem Erlenmeyerkolben bzw. 50 mg nackte Erde in drei Erlenmeyerkolben.			
5	3 Erlenmeyerkolben <i>trocken</i> , Erde nackt auf dem Boden. Verschluss: Watte/Pergamentpapier	+	+	+	Erste Anzeichen von Wachstum nach 48 Stunden
6	3 Erlenmeyer <i>nass</i> , Erde nackt auf dem Boden. Verschluss: Watte/Pergamentpapier	—	—	—	
7	1 Erlenmeyer <i>nass</i> , 3 Säckchen mit Testerde (50 mg) im Luftraum hängend. Verschluss: Watte/Pergamentpapier	—	—	—	
8	1 Erlenmeyer <i>trocken</i> , Erde in 3 Säckchen (50 mg) im Luftraum hängend. Verschluss: Gummistopfen	+	+	+	Starkes Wachstum bereits nach 24 Stunden
9	1 Erlenmeyer <i>nass</i> , Erde in 3 Säckchen (50 mg) im Luftraum hängend. Verschluss: Gummistopfen	—	—	—	

b) Nach Vorevakuierung des Autoklaven an einer Wasserstrahlpumpe:

Versuch No. 10 : 3 trockene Erlenmeyer, nicht hermetisch verschlossen (Watteverschluss), Testerde (50 mg) nackt auf dem Boden.

Versuch No. 11 : 1 trockener Erlenmeyer, hermetisch mit Gummistopfen verschlossen, Testerde (je 50 mg) in drei Säckchen im Luftraum hängend.

Der Autoklav wurde vor der Sterilisation während 25 Minuten an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, wobei ein Vakuum von ca. 40 mm Hg erreicht wurde. Das Dampfventil, an das der zur Wasserstrahlpumpe führende Druckschlauch angeschlossen war, wurde zuge dreht und der evakuierte, verschlossene Topf auf einem Rechaud erhitzt, bis das Manometer etwa 0,2 atü anzeigte. Dann wurde das Ventil etwa 1 Minute geöffnet, um zusammen mit dem ausströmenden Dampf die noch in der Dampfkammer verbliebenen Luftreste auszutreiben. Nach Er-

Tab. 6 Sterilisation von kontaminierten, leeren Erlenmeyerkolben in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten unter verschiedenen Bedingungen, nach Vorevakuierung des Autoklaven

Versuch No.	Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung + = Wachstum — = kein Wachstum Kontaminierung: 3 Säckchen mit 50 mg Sporenerde in einem Erlenmeyerkolben bzw. nackte Erde in drei Erlenmeyerkolben.			Bemerkungen zur Sterilitätsprüfung (die Nährbouillon wurde direkt in die 3 Erlenmeyerkolben mit nackter Erde gegeben, während die 3 Säckchen mit Testerde in Bouillon-Röhrchen übertragen wurden)
		1	2	3	
10	3 Erlenmeyer trocken, Erde nackt auf dem Boden. Verschluss: Watte/Pergamentpapier	—	(+)	+	Im Erlenmeyer "3" erste Anzeichen von Wachstum nach 72 Std. Im Erlenmeyer "2" noch nach 10 Tagen Wachstum fraglich
11	1 Erlenmeyer trocken, Erde in 3 Säckchen (50 mg) im Luftraum hängend. Verschluss: Gummistopfen	+	+	+	Starkes Wachstum schon nach 24 Std. in allen drei Bouillonröhrchen

reichen der Temperatur von 120° wurde während 22 Minuten sterilisiert, wobei 2 Minuten als Ausgleichszeit gedacht waren.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die Prüfung auf Sterilität erfolgte in Thioglykolat-Bouillon. Die Nährlösung wurde unter aseptischen Bedingungen in Mengen von ca. 20 ml direkt in die Erlenmeyerkolben mit nackter Erde gegeben. Die Säckchen mit Testerde wurden, nach Abbrennen des Trägerfadens, in Bouillon-Röhrchen fallen gelassen. Bebrütet wurde während 10 Tagen bei 37° .

Die Resultate der Sterilitätsprüfung sind in Tab. 5 und in Tab. 6 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

a) Sterilisation ohne Vorevakuierung des Autoklaven

Versuch No. 5 : Die trockenen, mit Wattebausch und Pergamentpapier verschlossenen Erlenmeyerflaschen waren nach der Sterilisation, infolge Bildung von Kondenswasser, innen leicht angelaufen. Auch ohne vorangehende Evakuierung des Autoklaven tritt also etwas Dampf in die aufrecht gestellten Flaschen ein, allerdings nicht in genügender Konzentration oder jedenfalls nicht rasch genug, um die Abtötung der Erds sporen zu bewirken. Die Mikroorganismen werden hingegen geschädigt und im Wachstum gehemmt.

Versuch No. 6/7: Die vor der Sterilisation mit 1 ml Wasser benetzten Flaschen wiesen nach der Sterilisation etwa die gleiche Wassermenge auf wie vorher. Die Erde, auch die in den Säckchen im Luft / Dampfraum hängende, war durchwegs feucht. Das Resultat der Sterilitätsprüfung zeigt, dass die Erds sporen sowohl im Benetzungswasser selbst (nackte Erde) als auch im daraus erzeugten Dampf bzw. im Luft/Dampf-Gemisch (Erde in Säckchen) sicher abgetötet werden.

Versuch No. 8 : Hier wurden die Erds sporen eigentlich einer Heissluft-Sterilisation bei 120° unterworfen, was im ungehemmten Wachstum der Keime nach dieser Behandlung auch eindeutig zum Ausdruck kommt.

Versuch No. 9 : Wie schon früher festgestellt (s. Seite 23), hat die Luftbeimischung zum Dampf in hermetisch verschlossenen Gefässen keinen wesentlichen Einfluss auf die Tötungs-

kraft des Dampfes, sofern sich dieser im freien Raum ungehindert ausbreiten kann, denn sämtliche Sporen wurden abgetötet.

b) Sterilisation mit Vorevakuierung des Autoklaven

Es wurden nur die Versuchsbedingungen 5 und 8, bei denen die Autoklavierung ohne Evakuierung erfolglos war, wiederholt.

Versuch No. 10 : Hier war erst vom dritten Tag an in einem Fläschchen Wachstum festzustellen. In einem weiteren Fläschchen war das Wachstum noch nach 10 Tagen ungewiss. Das dritte Fläschchen zeigte auch nach dieser Frist keine Anzeichen von Wachstum. Im Vergleich zur Sterilisation ohne Vorevakuum ist also wohl ein Unterschied festzustellen. Das Wachstum trat nur verzögert ein, und in einem Fall konnte sogar die Abtötung der Testsporen erzielt werden.

Versuch No. 11 : Wie nicht anders zu erwarten war – die Evakuierung konnte ja von keinem Einfluss auf den Luftgehalt des hermetisch verschlossenen Fläschchens sein –, trat wiederum schon am ersten Tag der Bebrütung starkes Wachstum in allen drei Versuchsflaschen auf.

Schlussfolgerung

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen – Autoklavierung mit und ohne Vorevakuum bei 120° während 20 Minuten – war nur durch die Benetzung des Flascheninnern die sichere Abtötung der darin vorhandenen Erds sporen zu erreichen. Interessant ist der Vergleich dieser Resultate mit denen des Sterilisationsversuches No. 3 S. 24. Dort konnten die gleichen Testkeime in kleineren Erlenmeyerkölbchen sogar ohne Vorevakuierung der Dampf kammer abgetötet werden. Die Grösse des zu durchdämpfenden Raumes spielt also eine entscheidende Rolle bei der Sterilisation von Hohlgefässen im gespannten Dampf.

5. Autoklavierung von leeren Messzylindern unter variierenden Versuchsbedingungen: trocken und nass, stehend (mit der Mündung nach oben) und umgekehrt (mit der Mündung nach unten), ohne Vorevakuierung und mit Vorevakuierung der Dampf kammer

Zur Erhärtung der mit Reagensgläsern und Erlenmeyerkolben erhaltenen Befunde wurden bei diesen Versuchen die noch tieferen Messzylinder eingesetzt, weil diese Art von Behälter, dank ihrer gleichmässigen Form und der grossen Tiefe, zur genaueren Abklärung der Durchdämpfung von Hohlgefässen als besonders geeignet erschien.

Versuchsbedingungen

Die Messzylinder wiesen folgende Masse auf: Inhalt 250 ml, Höhe 30 cm, Durchmesser 3,5 cm. Diese Messzylinder – je 2 pro Versuch – wurden wie folgt autoklaviert:

- a) stehend, mit der Mündung nach oben
 - α) trocken, Versuch No. 12 : ohne Vorevakuierung der Dampfkammer
Versuch No. 13 : mit Vorevakuierung der Dampfkammer
 - β) 2 ml destilliertes Wasser enthaltend
Versuch No. 14 : ohne Vorevakuierung der Dampfkammer
Versuch No. 15 : mit Vorevakuierung der Dampfkammer

Tab. 7 Sterilisation von kontaminierten, trockenen, mit durchlöcherter Pergamentpapier verschlossenen Messzylindern in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten

Versuch No.	Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, – = kein Wachstum) Kontaminierung: 6 Säckchen mit je 50 mg Testerde in jedem Zylinder, je 2 unten, 2 in der Mitte, 2 oben					
		unten		Mitte		oben	
		1	2	1	2	1	2
12	2 Zylinder, trocken, Mündung nach oben, keine Vorevakuierung des Autoklaven	++	++	++	++	---	---
13	2 Zylinder, trocken, Mündung nach oben, Vorevakuierung des Autoklaven (65 mm Hg)	++	++	---	---	---	---
14	2 Zylinder, nass (2 ml Wasser) Mündung nach oben, keine Vorevakuierung des Autoklaven	---	---	---	---	---	---
15	2 Zylinder, nass, Mündung nach oben, Vorevakuierung des Autoklaven (65 mm Hg)	---	---	---	---	—+!	---
16	2 Zylinder, trocken, Mündung nach unten, keine Vorevakuierung des Autoklaven	---	---	---	---	---	---

- b) umgekehrt, mit der Mündung nach unten, in trockenem Zustand
Versuch No. 16 : ohne Vorevakuierung der Dampfkammer.

In jeden der stehenden Messzylinder wurden je 6 an Fäden befestigte Stoffsäckchen mit 50 mg Testerde hineingehängt, derart, dass zwei Säckchen 2 cm über dem Boden des Messzylinders, bzw. 1 cm über dem darin enthaltenen Wasser, zwei Säckchen auf halber Höhe (15 cm) des Messzylinders und zwei 2 cm unter der Mündung (28 cm) des Messzylinders waren. Die Zylinder wurden mit einer Tektur von fein durchlöcherter Pergamentpapier bedeckt, um sie vor herabtropfendem Kondenswasser zu schützen und trotzdem dem Dampf ungehindert Zutritt zu gewähren. Durch die Abschnürung der Tektur wurden auch die Fäden mit den Säckchen festgehalten (s. Abb. II). Bei den in umgekehrter Stellung

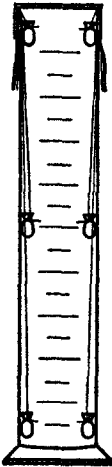


Abb. II. Messzylinder mit Testerde in auf verschiedener Höhe eingehängten Stoffsäckchen.

sterilisierten Zylindern wurden die Säckchen mit der Sporenerde an einem starren Draht aufgehängt, an den gleichen Kontaminationsstellen wie in den aufrechtstehenden Zylindern.

Sterilisiert wurde in einem einwandigen Autoklaven (Egro 32 Liter) bei 120° während 20 Minuten.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die Prüfung auf Keimtötung erfolgte in der Weise, dass die Säckchen mit der Sporenerde in Röhrcchen mit flüssiger Thioglykolat-Bouillon gegeben und diese während 10 Tagen bei 37° bebrütet wurden.

Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 7 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

- Versuch No. 12 : Sterilisation der trockenen, aufrechtstehenden Zylinder, ohne Vorevakuierung der Dampfkammer:
Das Ergebnis der Sterilitätsprüfung beweist eindeutig, dass der Dampf während der 20-minütigen Autoklavierung bei 120° nur in die oberste Partie der zwei trockenen Glaszylinder in genügender Konzentration eingedrungen ist, um die Testsporen abzutöten.
- Versuch No. 13 : Sterilisation der trockenen, aufrechtstehenden Zylinder, mit Vorevakuierung der Dampfkammer:
Im Gegensatz zum Versuch No. 12 sind hier auch die Testsporen auf halber Höhe der trockenen Glaszylinder abgetötet worden. Der Dampf ist also tiefer in die Zylinder eingedrungen, was auch zu erwarten war, weil ja durch den eindringenden Dampf die verdünnte Luftatmosphäre zu einem kleineren Luftpolster zusammengedrängt wird als die unverdünnte. Immerhin ist so viel Luft auf dem Grunde der trockenen Zylinder verblieben, dass die dort befindlichen Erdsporen die 20-minütige Autoklavierung bei 120° zu überleben vermochten.
- Versuch No. 14 : Sterilisation der nassen, aufrechtstehenden Zylinder, ohne Vorevakuierung der Dampfkammer:
In den 2ml Wasser enthaltenden zwei Zylindern wurde die Abtötung der Testsporen in allen Säckchen erreicht. Der am Grunde des Zylinders entstehende und sich expandierende Wasserdampf hat also die Luft aus dem Zylinder hinausgetrieben oder jedenfalls sich so intensiv mit ihr vermischt, dass die Keimtötung in allen Säckchen zustande gekommen ist.
- Versuch No. 15 : Sterilisation der nassen, aufrechtstehenden Zylinder, nach Vorevakuierung der Dampfkammer:
Hier gilt das unter Versuch No. 14 Gesagte. Der einzelne Sterilisationsmisserfolg beruht bestimmt auf einer Sekundärkontaminierung. Dies darf umsomehr angenommen werden, als das betreffende Bouillon-Röhrchen ein Säckchen enthielt, das an der Mündung des Zylinders sterilisiert wurde, an einer Kontaminierungsstelle also, an der in allen übrigen 19 Fällen die Abtötung der Testsporen eintrat.
- Versuch No. 16 : Sterilisation der umgekehrt stehenden, trockenen Zylinder, ohne Vorevakuierung des Autoklaven:

Bei diesem Sterilisationsversuch konnte die im Vergleich zum Dampf schwerere Luft «den Fluchtweg nach unten» ergreifen, und der Durchdämpfung des Innern der Zylinder wurde kein Widerstand entgegengesetzt. Das Resultat der Sterilitätsprüfung – Abtötung der Testsporen in allen Säckchen – widerspiegelt denn auch die günstigen physikalischen Voraussetzungen für die Abtötung der Testkeime.

Schlussfolgerungen

Für die sichere Autoklavierung (120°/20 Minuten) von leeren, offenen Hohlgefässen bestehen zwei Möglichkeiten:

- a) Sterilisation der offenen, trockenen Gefässe mit der Mündung nach unten.
- b) Sterilisation der offenen Gefässe in nassem Zustand mit der Mündung nach oben. Ein Wassergehalt von etwa 1% des Gefässvolumens ist ausreichend, entstehen doch aus einem Raumteil Wasser 1650 Raumteile Dampf.

Die Evakuierung des Autoklaven vor der Sterilisation gewährleistet nicht die Abtötung von resistenten Keimen in den tieferen Lagen von Gefässen, wenn deren Öffnung nach oben mündet.

6. Autoklavierung von Augentropfen-Fläschchen (Tauchpipetten- und Centropi-Fläschchen)

Collyria sollten immer in sterilem Zustand abgegeben werden; ganz besonders trifft dies für diejenigen Lösungen zu, die unmittelbar vor oder nach Augenoperationen zur Applikation gelangen. Die rezepturmässige Herstellung der Augentropfen kann zwar aus zeitlichen und wirtschaftlichen Gründen oft nur auf aseptischem Wege erfolgen, was bedingt, dass sterile Abgabe-Fläschchen zur Verfügung stehen, die man zweckmässigerweise auf Vorrat hält.

Ebenso wichtig wie die aseptische Herstellung der Collyria ist die Verhütung der bakteriellen Verunreinigung derselben in der Hand des Patienten oder des Pflegepersonals. Diese Gefahr ist besonders gross bei den früher üblichen Tauchpipetten-Flacons (s. Abb. IIIA), die aber heute mehr und mehr durch die in dieser Hinsicht weit besser geeigneten Centropi-Flacons²⁰ (siehe Abb. III B), EMKA-Fläschchen usw., verdrängt werden. Von den Flaschen mit separat abgegebener Pipette sei hier nicht die Rede, weil dieser Flaschen-plus-Pipetten-Typ für Collyria nicht mehr zu verantworten ist. In der nachfolgenden Untersuchung werden Sterilisationsversuche mit beiden Fläschchen-Typen, Tauchpipetten- und Centropi-Flacons beschrieben.

²⁰ Kessler J., Schweiz. Apoth. Ztg. 89, 594 (1951)

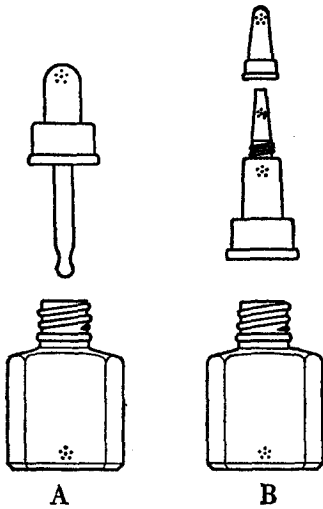


Abb. III. Fläschchen mit Tauchpipette (A) und Centropi-Fläschchen (B), kontaminiert mit «nackter Sporenerde».

a) Autoklavierung von Tauchpipetten-Fläschchen

Versuchsbedingungen

Der Versuch wurde mit sieben Fläschchen zu 10 ml Inhalt und den dazugehörigen Pipetten im Schraubverschluss (Abb. IIIA) durchgeführt. Fünf Fläschchen und fünf Pipetten-Gummikappen wurden an den auf der Skizze (III A) bezeichneten Stellen mit einer Messerspitze fein pulverisierter Testerde kontaminiert, 2 Fläschchen und zwei Pipetten-Gummikappen wurden unbehandelt gelassen. Die insgesamt sieben Fläschchen mit den dazugehörigen Pipetten-Schraubverschlüssen wurden separat in überdeckte, aber einen Spalt weit geöffnete, flache Email-Schalen gelegt, so dass die Mündung der Fläschchen und der Pipetten seitwärts oder leicht schräg nach oben gerichtet war. Sterilisiert wurde in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten, einmal ohne und einmal nach Vorevakuierung des Dampftopfes an einer Wasserstrahlpumpe (siehe S. 27).

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Prüfung auf Sterilität wurde wie folgt vorgegangen: Aus Röhrcchen mit steriler Nährbouillon wurden 2-5 ml Flüssigkeit aseptisch in die Fläschchen gegossen bzw. in die Pipetten aufgezogen und sodann mit der mitgeschwemmten Sporenerde wieder in die entsprechenden Röhrcchen zurückgegeben. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 8 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Bei den nicht kontaminierten Fläschchen und Pipetten (je zwei für die Autoklavierung ohne Vorkvakuum und für diejenige mit Vorkvakuum) wurde bei der

Tab. 8 Sterilisation von kontaminierten, trockenen Tauchpipetten-Flacons in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten mit und ohne Vorevakuierung der Dampfkammer

Versuch No.	Sterilisationsmaterial und Versuchsbedingungen (Pipettenflacon zerlegt in Pipette und Flacon)	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum)		
		ohne Vorevakuum	mit Vorevakuum	
17	5 kontaminierte Pipetten	1	+	—
		2	+	—
		3	—	—
		4	+	—
		5	+	—
18	2 nicht kontaminierte Pipetten (Blindproben)	6	—	—
		7	—	—
19	5 kontaminierte Flacons	1	—	—
		2	—	—
		3	—	—
		4	+	+
		5	—	—
20	2 nicht kontaminierte Flacons (Blindproben)	6	—	—
		7	—	—

Sterilitätsprüfung kein Wachstum festgestellt, ein Beweis dafür, dass das etwas riskante Ueberimpfungsverfahren nicht mit der Gefahr einer sekundären, das Resultat verfälschenden Kontaminierung der Nährbouillon verbunden war. Eindeutig ist das mit den kontaminierten Pipetten (Versuch No. 17) erzielte Resultat. Ohne vorangehende Luftentfernung ist das Eindringen des Dampfes durch die kleine Tropföffnung in das enge Röhrchen offenbar sehr erschwert, so dass bei Vorhandensein von resistenten Keimen nicht mit deren Abtötung gerechnet werden darf. Der Dampf kann hingegen viel leichter in die Fläschchen eindringen, obwohl auch hier eine gewisse Behinderung besteht. Etwas überraschend ist die restlose Abtötung der Sporen in den Pipetten nach der Vorevakuierung des Autoklaven. Sie ist wohl damit zu erklären, dass es in den in horizontaler Lage sterilisierten Pipetten nach der Evakuierung des Autoklaven nicht mehr zur Bildung einer eigentlichen Lufttasche am Grunde der Pipette kommen konnte.

Schlussfolgerung

Die Autoklavierung bei 120° während 20 Minuten von einseitig geschlossenen, trockenen Pipetten (Pipetten für Augen- und Nasen-Tropflösungen) bietet keine sichere Gewähr, wenn das Innere derselben mit resistenten Keimen be-

haftet ist. Dies trifft besonders dann zu, wenn die Sterilisation ohne Vorevakuierung der Beschickungskammer durchgeführt wird; mit der Vorevakuierung wird die Durchdämpfung der Pipetten bedeutend verbessert, so dass im Normalfall – ohne massive Kontaminierung wie unter den extremen Versuchsbedingungen – diese Sterilisationsart als ausreichend angesehen werden darf.

b) Autoklavierung von Centropi-Fläschchen

Versuchsbedingungen

Es wurden wiederum je sieben, z. T. in die drei Bestandteile (Kappe, Tropfer, Fläschchen) auseinandergenommene Centropi-Flacons, z. T. mit zusammengeschraubten Kappen und Tropfern, in einem einwandigen Kleinautoklaven, einmal ohne, einmal mit Vorevakuierung des Dampftopfes, bei 120° während 20 Minuten sterilisiert. Fünf Fläschchen, Kappen und Tropfer waren an den auf der Abb. (III B) bezeichneten Stellen mit der feingepulverten Testerde kontaminiert, während zwei Fläschchen als Vergleichsproben unbehandelt blieben. Die Fläschchen, Kappen und Tropfer wurden zur Sterilisierung in flache, einen Spalt weit geöffnete Email-Schalen gelegt, so dass ihre Öffnungen seitwärts mündeten.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Prüfung auf Sterilität wurden die Fläschchen und die Tropfer, wie oben bei den Tauchpipetten-Flacons beschrieben, mit Nährbouillon ausgespült, die Kappen hingegen sofort nach Entnahme aus dem Autoklaven mit einer sterilen Pinzette direkt in die Röhrchen mit Bouillon gebracht.

Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 9 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Der im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen mit den Tauchpipetten viel bessere Sterilisationserfolg erklärt sich damit, dass die Innenfläche der Centropi-Tropfvorrichtung dem Dampf besser zugänglich ist als die der Tauchpipetten. Die Kappe ist wohl einseitig geschlossen, aber nur wenig tief, auch wenn sie, wie bei Versuch No. 22, auf dem Tropfer aufgeschraubt ist. Der Tropfer ist beidseitig offen und weist auf einer Seite einen weiten Zugang auf. Die beiden einzelnen Sterilisationsmisserfolge (No. 24) sind allerdings ein Zeichen dafür, dass der Dampf doch nicht ganz ungehindert einwirken kann und dass die Luft in der mittleren Partie, wo das Gummistück mit dem Plastik-Tropfer durch eine ganz schmale Öffnung verbunden ist, zurückbleiben kann. Wenn man aber bedenkt, dass der Versuch unter sehr erschwerten Bedingungen ausgeführt wurde, darf die

Tab. 9 Sterilisation von kontaminierten, trockenen Centropi-Flacons in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten mit und ohne Vorevakuierung der Dampfkammer

Versuch No.	Sterilisationsmaterial und Versuchsbedingungen Tropfglas (s. Abb. III B) zerlegt in Verschlusskappe, Tropfer und Flacon, bzw. Verschlusskappe und Tropfer zusammengeschraubt	Ergebnis der Sterilitätsprüfung	
		ohne Vorvakuum	mit Vorvakuum
21	3 kontaminierte Verschlusskappen allein	1 —	—
		2 —	—
		3 —	—
22	2 kontaminierte Verschlusskappen auf Tropfer aufgesetzt	4 —	—
		5 —	—
23	2 nicht kontaminierte Verschlusskappen o. Tropfer	6 —	—
		7 —	—
24	5 kontaminierte Tropfer	1 —	—
		2 —	—
		3 +	—
		4 —	(+)
		5 —	—
25	2 nicht kontaminierte Tropfer	6 —	—
		7 —	—
26	5 kontaminierte Flacons	1 —	—
		2 —	—
		3 —	—
		4 —	—
		5 —	—
27	2 nicht kontaminierte Flacons	6 —	—
		7 —	—

Schlussfolgerung

gezogen werden, dass die Autoklavierung bei 120° während 20 Minuten für die zerlegten, gut gereinigten Bestandteile der Centropi-Fläschchen, auch ohne Vorevakuierung der Dampfkammer, höchst wahrscheinlich ausreichend ist. Centropi-Fläschchen für Augentropfen, die vor oder nach Augenoperationen angewandt werden, sollten aber, um eine zusätzliche Sicherheit zu schaffen, im vorevakuieren Autoklaven sterilisiert werden.

7. Autoklavierung von Pipetten

Aus dem eben beschriebenen Sterilisationsversuch mit Augentropfen-Pipetten geht hervor, dass auch beim Autoklavieren der Sterilisationserfolg in röhrenför-

migen, beidseitig offenen Hohlgefäßen nicht immer garantiert werden kann, weil der Dampf, der durch die beiden Oeffnungen eindringt, die Luft gegen die Mitte des Kanals zurückdrängt. Es schien uns darum angezeigt, diese Frage in einem Sterilisationsversuch mit relativ langen und eng-lumigen Pipetten weiter abzuklären.

Versuchsbedingungen

In drei Pipetten zu 1 ml Inhalt, von 18 cm Länge und 3 mm lichter Weite, an einem Ende spitz auslaufend, wurde je ein bei 105° getrocknetes Stück Faden, auf den ein massiv mit Sporenerde kontaminierter Tragantschleim aufgetragen worden war, eingezogen.

Die Pipetten wurden in eine einseitig zugeschmolzene, weite Glasröhre gebracht, in deren freien Raum ebenfalls zwei kontaminierte Fäden als Vergleichsproben eingehängt wurden. Die Röhre wurde mit einer Kappe aus Pergamentpapier verschlossen und vertikal, mit der Oeffnung nach unten, in den Einsatz-Korb eines einwandigen Kleinautoklaven gestellt. Nachdem der Dampftopf an einer Wasserstrahlpumpe auf 40 mm Hg evakuiert worden war, wurde während 20 Minuten bei 120° sterilisiert.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Prüfung auf Sterilität wurden die kontaminierten Teile der Fäden mit einer sterilen Schere abgetrennt und in Röhrchen mit Thioglykolat-Nährbouillon gebracht, die in der Folge während 10 Tagen bei 37° bebrütet wurden. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 10 wiedergegeben.

Tab. 10 Sterilisation von kontaminierten, trockenen Pipetten in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten nach Vorevakuierung der Dampfkammer

Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+= Wachstum, —= kein Wachstum)		
Versuch No. 28 1 kontaminierter Faden, bei 105° getrocknet, nicht sterilisiert	Versuch No. 29 2 kontaminierte Fäden, bei 105° getrocknet; bei 120°/ 20 Minuten ausserhalb der Pipette sterilisiert	Versuch No. 30 3 kontaminierte Fäden, bei 105° getrocknet; bei 120°/ 20 Minuten in 3 Pipetten sterilisiert
+	— —	— — —

Diskussion der Resultate

Der Erfolg der Sterilisation überrascht nicht, wurde diese doch unter optimalen Bedingungen ausgeführt:

- Die senkrechte Lage der Pipetten ermöglichte der Luft die «Flucht nach unten».
- Die Entlüftung der Pipetten wurde durch die Vorevakuierung der Dampfkammer gefördert.

Schlussfolgerung

Eng-lumige, relativ lange, beidseitig offene Pipetten lassen sich im vorevakuieren Autoklaven bei 120° während 20 Minuten sicher sterilisieren, wenn sie in senkrechter Lage in der Dampfkammer stehen. Die von Kessler²¹ beschriebene, sterilisierbare Pipettenhülse mit Deckel/Boden-Lochung und Pipettenhalter eignet sich vorzüglich für die Autoklavierung von Pipetten.

8. Autoklavierung einer Injektionsspritze

Im allgemeinen müssen vor der Sterilisation die Metallkolben aus den Glaszylindern der Injektionsspritzen herausgenommen werden, weil sonst die Gefahr besteht, dass das Glas infolge der grösseren thermischen Ausdehnung des Metalls springt. Es sind aber auch Spritzen im Handel, die in zusammengesetztem Zustand erhitzt werden dürfen. Diese weisen den Vorteil auf, dass die Gefahr der Kontaminierung während der Aufbewahrung und beim Zusammensetzen der Spritze vermindert ist bzw. wegfällt. Andererseits geben sie grössere Probleme für die Sterilisation im Dampf, weil sie zum Typus der Hohlkörper mit enger Öffnung zählen.

Versuchsbedingungen

Der Versuch wurde mit einer Exa-Mediglass-Spritze zu 5 ml Inhalt vorgenommen, die mit dem Kolben im Zylinder sterilisierbar ist. In die auf Abb. IV skizzierte Spritze wurden beidseitig des in der Mitte des Glaszylinders befindlichen

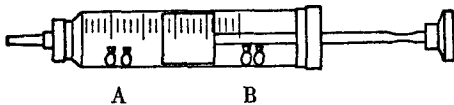


Abb. IV. Injektionsspritze, kontaminiert mit Testerde in je 2 Stoffsäckchen beidseits des Kolbens.

chen Kolbens je 2 Stoffsäckchen mit 50 mg Sporenerde eingeführt. Der eine Raum (A) besitzt nur beim Nadelansatz eine kreisrunde Öffnung von 1,5 mm Durchmesser, der andere (B) hingegen einen 10 mm langen und 3 mm breiten Spalt, durch den Luft entweichen und Dampf eintreten kann.

In einem Versuch wurde die Spritze in horizontaler Lage ohne, in einem anderen mit Evakuierung des einwandigen Kleinautoklaven (Vakuum ca. 70 mm Hg) bei 120° während 20 Minuten sterilisiert.

²¹ Kessler J., Schweiz. Apoth. Ztg. 89, 593 (1951)

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die Sterilitätsprüfung der Säckchen mit Sporenerde in Thioglykolat-Bouillon bei 37° während 10 Tagen ergab das in Tab. 11 wiedergegebene Resultat.

Tab. 11 Sterilisation einer kontaminierten, zusammengesetzten, trockenen Injektionsspritze bei 120° während 20 Minuten in einem einwandigen Kleinautoklaven ohne und mit Vorevakuierung der Dampfchamber

Versuch No.	Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+= Wachstum, -= kein Wachstum) Kontaminierung: je 2 Säckchen beidseits des Spritzenkolbens gemäss Skizze			
		Raum A		Raum B	
31	keine Vorevakuierung des Autoklaven	+	+	-	-
32	Vorevakuierung des Autoklaven	-	-	-	-

Diskussion der Resultate

Wir haben es hier mit ähnlichen Bedingungen zu tun wie bei der Sterilisation der Pipetten und Tropfer der Collyria-Fläschchen, und die Resultate sind auch analog ausgefallen:

In den Raum, der nur durch die sehr kleine Oeffnung des Nadelansatzes mit dem freien Dampfraum verbunden ist, dringt innert der 20-minütigen Sterilisation ohne Vorevakuum zu wenig Dampf ein, um die Abtötung der resistenten Testkeime zu bewirken. Die Evakuierung des Dampftopfes vor der Sterilisation vermag hingegen die Bildung eines Luftpolsters in diesem Raum zu verhindern, so dass die Autoklavierung wirkungsvoll wird. Im anderen Raum, der mit einem relativ langen und breiten Spalt offen ist, kommt die Abtötung des Testsporen auch ohne Vorevakuum zustande.

Schlussfolgerung

Bei der Autoklavierung von Spritzen, die unzerlegt mit dem Kolben im Zylinder sterilisierbar sind, muss berücksichtigt werden, dass das Eindringen des Dampfes durch die kleine Oeffnung des Nadelansatzes während der üblichen Sterilisationszeit von 20 Minuten ungenügend ist. Zur Vermeidung von Fehlsterilisationen ist eine der folgenden Massnahmen angezeigt:

- a) Der Kolben wird vollständig in den Glaszylinder gestossen, damit der ganze

Hohlraum desselben durch die relativ grosse, hintere Oeffnung der Spritze mit dem freien Dampfraum verbunden ist.

- b) Der Dampftopf wird vor der Autoklavierung evakuiert.
- c) Die Spritzen werden vor der Autoklavierung mit destilliertem, filtriertem Wasser benetzt.

9. Autoklavierung von Keimfilterapparaturen

Bei der Sterilisation von Keimfilterapparaturen geht das Bestreben dahin, die Geräte als Ganzes zu sterilisieren, um eine mögliche Sekundär-Kontaminierung beim Zusammenstellen der sterilisierten Einzelteile zu vermeiden. Damit ist hingegen wiederum die Gefahr verbunden, dass der Dampf nicht zu allen Partien der Apparatur Zutritt findet, was unter Umständen eine Fehlsterilisation zur Folge haben kann.

Die hier beschriebenen Sterilisationsversuche mit zwei verschieden konstruierten Filtrationseinrichtungen wurden als Modellversuche durchgeführt, d. h. mit der Absicht, allgemein gültige Aufschlüsse über das «Luftproblem» zu erhalten, das sich bei der Sterilisation von komplizierter gebauten Hohlgefässen stellt.

a) Autoklavierung einer improvisierten Keimfilterapparatur unter variierenden Versuchsbedingungen

Versuchsbedingungen

In das auf Abb. V skizzierte Filtrationsgerät wurden an den mit den Zahlen bezeichneten Stellen Stoff-Säckchen mit 50 mg Sporenerde eingeführt. Die Stoff-säckchen waren an Fäden befestigt, dank denen sie nach der Sterilisation asep-

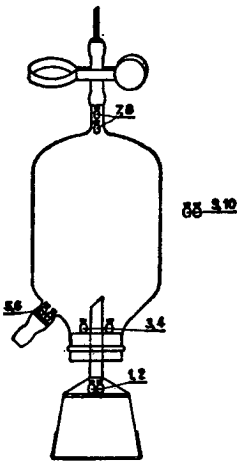


Abb. V

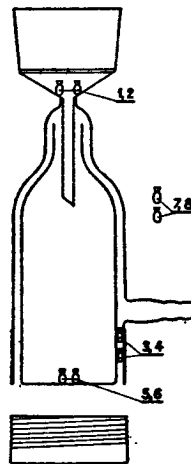


Abb. VI

Links: Abb. V. Improvisierte Keimfilterapparatur kontaminiert mit Testerde in Stoffsäckchen (1-3). Vergleichsproben (9-10) aussen am Gerät angehängt. Die Apparatur wurde mit der Filternutsche nach unten sterilisiert.

Rechts: Abb. VI. Jenaer Filtrationsglocke, kontaminiert mit Testerde in Stoffsäckchen (1-6). Vergleichsproben (7-8) aussen am Gerät angehängt. Aus Gründen der besseren Darstellung ist der Schraubverschluss auf der Abb. von der Filtrationsglocke getrennt.

tisch herausgezogen werden konnten. Die Apparatur wurde mit der Filternutsche nach unten in einen einwandigen Kleinautoklaven (Egro 32 Liter) gestellt und unter folgenden Bedingungen bei 120° während 20 Minuten sterilisiert:

- Versuch No. 33 : Gerät trocken, Schlauchstück am Abfüllröhrchen zugewickelt, ohne Vorevakuierung des Autoklaven.
- Versuch No. 34 : Gerät trocken, Schlauchstück am Abfüllröhrchen nicht zugewickelt, ohne Vorevakuierung des Autoklaven.
- Versuch No. 35 : Gerät trocken, Schlauchstück am Abfüllröhrchen nicht zugewickelt, mit mässiger Vorevakuierung (300 mm Hg) des Autoklaven.
- Versuch No. 36 : Gerät trocken, Schlauchstück am Abfüllröhrchen nicht zugewickelt, mit starker Vorevakuierung (35 mm Hg) des Autoklaven.
- Versuch No. 37 : Gerät nass, d. h. mit destilliertem Wasser ausgespült, Schlauchstück am Abfüllröhrchen nicht zugewickelt, ohne Vorevakuierung des Autoklaven.

Zur Evakuierung des Dampftopfes (Versuche No. 35/36) wurde dessen Luft/Dampfhahn während 30 - 45 Minuten an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Der evakuierte, geschlossene Topf wurde dann erhitzt, bis das Manometer einen leichten Ueberdruck von ca. 0,2 - 0,3 atü anzeigte, worauf der Hahn zur weiteren Entlüftung während 2 - 3 Minuten geöffnet wurde, um mit dem herausströmenden Dampf die Restluft aus dem Autoklaven entweichen zu lassen. Nach Erreichen der Sterilisationstemperatur von 118 - 120° wurde diese während 22 Minuten (2 Minuten als Ausgleichszeit berechnet) eingehalten.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Prüfung auf Sterilität wurden die Säckchen mit der Testerde in Röhrchen mit Thioglykolat-Nährbouillon übertragen. Das Resultat der Sterilitätsprüfung nach 10-tägiger Bebrütung bei 37° ist in Tab. 12 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Die vier Vergleichsproben (9 und 10) ausserhalb der Keimfilterapparatur (s. Abb. V, Versuch No. 33 und 35), sowie die dem Dampf am ehesten zugänglichen Proben unter der Glassinterplatte haben bei der Sterilitätsprüfung ausnahmslos kein Wachstum ergeben, ein Beweis dafür, dass im Dampfraum des Sterilisierapparates die physikalischen Verhältnisse für die Abtötung von resistenten Sporen geherrscht haben.

Auffallend und etwas entmutigend ist die Feststellung, dass in keinem Fall die Abtötung aller Testsporen im Innern des Hohlkörpers erreicht werden konnte. Insbesondere überrascht dies im Versuchsfall No. 37 bei der Sterilisation des benetzten Filtriergerätes, ein Verfahren, das sich sonst stets als ausreichend erwie-

Tab. 12 Sterilisation einer kontaminierten Filtereinrichtung (Abb. V) in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten unter verschiedenen Bedingungen.

Versuch No.	Sterilisationsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum) Zahlen = Kontaminierungsstellen gemäss Abb. V										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
33	Aufstellung des Apparates mit der Filternutsche nach unten, Schlauchstück zugeklemmt, Apparat trocken, keine Vorevakuierung des Autoklaven	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
34	wie 33, aber keine Klemme am Schlauchstück	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
35	wie 33, aber ohne Klemme am Schlauchstück, mässige Vorevakuierung (300 mm Hg) des Autoklaven	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
36	wie 33, aber ohne Klemme am Schlauchstück, kräftige Evakuierung (35 mm Hg) des Autoklaven	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+!	—
37	wie 33, aber ohne Klemme am Schlauchstück, Apparat nass	—	—	—	+!	—	—	—	—	—	—	—

Fehlen der +- und —-Zeichen (Versuche 34, 35, 36, 37) bedeuten, dass bei diesen Versuchen an den betreffenden Stellen keine Säckchen mit Sporenerde waren.

sen hat. Immerhin wurden damit auch hier die relativ besten Resultate erzielt: an allen Kontaminierungsstellen konnten die Testsporen wenigstens in einem der zwei Säckchen abgetötet werden, was in Anbetracht der die Grenzen des Normalfalles weit sprengenden Versuchsbedingungen als Erfolg gebucht werden darf. Für den teilweisen Misserfolg an den Kontaminierungsstellen 4 und 7 können folgende Gründe angeführt werden:

- Mangelhafte Benetzung des Apparates und dadurch ungenügende Dampf-Bildung.
- Verstopfung des engen Abfüllröhrchens, so dass der Dampf auf eines der zwei Säckchen nicht oder doch weniger gut einwirken konnte.

Die Evakuierung des Dampftopfes vor der Sterilisation fördert wohl die Durchdämpfung des Gerätes, ist aber nur von beschränktem Nutzen, was die früher gemachten Erfahrungen bei der Sterilisation von Flaschen nur bestätigt. Auch das Offenhalten des Schlauchstückes durch Weglassen der Metallklemme trägt nicht viel zur besseren Durchdämpfung bei: diese Oeffnung mündet nach oben, ist klein und zudem durch die Säckchen an den Stellen 7 und 8 mehr oder weniger verstopft, so dass die Durchmischung von Dampf und Luft durch Diffusion nur langsam vor sich gehen kann.

Schlussfolgerung

Die Autoklavierung von Hohlgefässen mit engen Oeffnungen und mit dem Dampfstrom schwer zugänglichen Luftwinkeln ist bei Vorhandensein von resistenten Keimen nicht ohne Risiko. Dieses wird aber praktisch ausgeschaltet, wenn das Innere des Hohlgefässes genügend benetzt wurde, d. h. mindestens mit 1 Volumen-Teil Wasser pro 1000 Volumen-Teile Hohlraum. Die Evakuierung des Dampftopfes vor der Sterilisation genügt allein nicht, trägt aber zur besseren Durchdämpfung der Hohlräume bei.

b) Autoklavierung des Jenaer Filtrationsgerätes

Das Jenaer Filtrationsgerät (Abb. VI) besteht aus einer Filtrationsglocke, an der oben eine Filternutsche angeschmolzen ist und an die unten eine Metallkappe angeschraubt wird. Als Auffanggefäss für das Filtrat unter der Glocke dient eine, ihr in der Form angepasste, enghalsige Nährbodenflasche.

Versuchsbedingungen

Die Säckchen mit der Testerde wurden im Gerät gemäss den Angaben auf der Abb. VI verteilt. Die Filternutsche und der Saugstutzen wurden für die Versuche mit Pergamentpapier tektiert. Die Sterilisation erfolgte in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten unter folgenden Bedingungen:

- Versuch No. 38 : Gerät vollständig zusammengesetzt, trocken, Verschlusskappe an Filtrationsglocke fest angeschraubt, ohne Vorevakuierung des Autoklaven.
- Versuch No. 39 : Gerät vollständig zusammengesetzt, aber Verschlusskappe nur lose an Filtrationsglocke angeschraubt, Gerät trocken, ohne Vorevakuierung des Autoklaven.
- Versuch No. 40 : Gerät auseinander genommen: Filtrationsglocke auf einer Petrischale als Unterlage, Filtrat-Flasche für sich allein in aufrechter Stellung mit einer losen Glaskappe über der Mündung. Alle Teile trocken, keine Vorevakuierung des Autoklaven.
- Versuch No. 41 : Gerät vollständig zusammengesetzt, Verschluss lose angeschraubt, alle Teile trocken, mit mässiger Vorevakuierung (300 mm Hg) des Autoklaven.
- Versuch No. 42 : Gerät vollständig zusammengesetzt, Verschluss lose angeschraubt, alle Teile trocken, mit kräftiger Vorevakuierung (35 mm Hg) des Autoklaven.
- Versuch No. 43 : Gerät vollständig zusammengesetzt, Verschluss fest angeschraubt, in die Filtrat-Flasche 2 ml destilliertes Wasser eingefüllt, übrige Teile mit destilliertem Wasser ausgespült, ohne Vorevakuierung des Autoklaven.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die Prüfung auf Sterilität erfolgte auf übliche Weise in Thioglykolat-Nährbouillon während 10 Tagen bei 37°. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 13 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Die insgesamt 8 Sporensäckchen (7 und 8 auf Abb. VI), die ausserhalb des Filtrierapparates miterhitzt wurden, erwiesen sich nach dem Autoklavieren alle als steril. Daraus geht hervor, dass das angewandte Sterilisationsverfahren an und für sich wirkungsvoll war. Die Tatsache jedoch, dass unter den gestellten Versuchsbedingungen in keinem Fall die Sterilität aller Testproben innerhalb der sterilisierten Hohlgefässe erreicht werden konnte, spricht eine deutliche Sprache. Am besten bewährt hat sich wiederum die «Nass-Sterilisation». Angenommen, dass das Wachstum der einen Probe der Kontaminierungsstelle 2 im Versuch No. 43 nur auf eine sekundäre Kontaminierung zurückzuführen ist, was wahrscheinlich zutrifft, darf diese Sterilisationsmethode als ausreichend angesehen werden.

Der Nutzeffekt der Vorevakuierung des Dampftopfes ist gering. Wichtiger ist, der Luft den Weg nach unten frei zu halten, indem die Verschlusskappe nur lose angeschraubt wird.

Tab. 13 Sterilisation des kontaminierten Jenaer Filtrationsgerätes in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten unter verschiedenen Bedingungen

Versuch No.	Sterilisationsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung							
		1	2	3	4	5	6	7	8
38	Filtrationsgerät vollständig zusammengesetzt, trocken, keine Vorevakuierung des Autoklaven	—	—	+	+	+	+	—	—
39	Wie 38, aber Verschluss des Filtrationsgerätes lose angeschraubt	—	—	—	—	+	+	—	—
40	Filtrationsgerät auseinander genommen: Filtrationsglocke auf Petrischale als Unterlage, Filtratflasche separat sterilisiert mit Glaskappe über der Mündung. Alle Teile trocken, keine Vorevakuierung des Autoklaven	+	—	—	—	+	+	—	—
41	Filtrationsgerät vollständig zusammengesetzt, trocken, Verschluss lose angeschraubt, mässige Vorevakuierung des Autoklaven (ca. 300 mm Hg)	—	—	—	—	+	+	—	—
42	Filtrationsgerät vollständig zusammengesetzt, trocken, Verschluss fest angeschraubt, kräftige Vorevakuierung des Autoklaven (35 mm Hg)	—	—	+	—	+	+	—	—
43	Filtrationsgerät vollständig zusammengesetzt, nass, Verschluss fest angeschraubt	—	(+)	—	—	—	—	—	—

Die trockene Filtratflasche hat sich erwartungsgemäss als die dem Dampf am schwersten zugängliche Stelle erwiesen. Die resistenten Testkeime haben dort jede Autoklavierung keimfähig überstanden. Unerwartet ist das Wachstum der Probe 1 des Versuchsfalles 40. Dieser vereinzelte Versager hängt wohl damit zusammen, dass die Säckchen den Röhrenteil der Nutsche verstopft hatten, so dass der freie Dampfzutritt zur Erde in einem Säckchen verwehrt wurde.

Schlussfolgerung

Bei der Autoklavierung von zusammengesetzten Geräten mit Hohlräumen muss mit einer schlechten Durchdämpfung derselben gerechnet werden. Besonders problematisch wird die Autoklavierung, wenn die zu sterilisierenden Hohlgefässe keine Oeffnung nach unten aufweisen. Zur Vermeidung von Fehlsterilisationen sind folgende Massnahmen angezeigt:

- a) Sterilisation der Apparaturen bzw. der Bestandteile derselben in einer Stellung, die der Luft den Weg nach unten freilässt.
- b) Benetzung des Innern der Hohlgefässe bzw. Einfüllen von etwas destilliertem Wasser (ca. 1% des Hohlraumvolumens), so dass genügend Dampf in den Gefässen entstehen kann.

10. Autoklavierung von Infusionsbestecken

(Durchdämpfung von langen Schlauchstücken)

Alle Sorgfalt bei der Herstellung und Sterilisation von Infusionslösungen wird illusorisch, wenn diese dem Patienten mit einem mangelhaft gereinigten oder nicht sterilen Infusionsbesteck eingespritzt werden. Die hin und wieder auftretenden Infusionszwischenfälle (Schüttelfrost und Fieber) sind denn auch in der überwiegenden Mehrzahl auf das Besteck zurückzuführen, wobei allerdings zugegeben werden muss, dass die Reinigung und die Sterilisation desselben mit grösseren Schwierigkeiten verbunden ist als die entsprechenden Manipulationen bei der Bereitstellung der Infusionsflaschen und der sterilen Infusionslösungen. Die Infusionsflasche kann praktisch mit allen Lösungsmitteln behandelt werden und ist der reinigenden Bürste in allen Teilen zugänglich, nicht aber der Gummi- oder Plastikschlauch. Bei Glaswaren lässt sich leicht feststellen, ob die Reinigung ausreichend war, und bei den Lösungen ebenso, ob sie faserfrei sind; das Gummi- und Plastikmaterial bietet aber diese Erleichterung nicht. Was die Sterilisationsbedingungen anbelangt, darf schon aus den Resultaten der vorangehenden Untersuchungen geschlossen werden, dass die Durchdämpfung der relativ langen Schläuche erschwert sein könnte.

Versuchsbedingungen

Als Versuchsmaterial dienten fünf komplette Infusionsbestecke, wie sie auf Abb. VIIS. 49 skizziert sind. Die Sporenerde für den Sterilitätstest wurde an den mit den

Zahlen bezeichneten Stellen mittels eines auf starken Statlerfäden aufgetragenen Tragantschleimes in die verschiedenen Teilstücke des Infusionsbesteckes eingeführt, wobei wie folgt vorgegangen wurde:

Die mit nassem Erde/Tragantschleim bestrichenen Fadenstücke wurden zunächst während zwei Stunden bei 105° getrocknet und darauf mit Hilfe eines Drahtes in die Schlauchteile und Glasröhrchen eingezogen, worauf das Besteck wieder zusammengesetzt wurde. Die Gesamtlänge des eigentlichen Infusionsbesteckes betrug ca. 1,5 m, der Durchmesser der Nadeln an beiden Enden ca. 2,5 mm bzw. ca. 1,5 mm. Der Luftschlauch, ca. 20 cm lang, wurde für sich allein behandelt. Er war ebenfalls beidseitig offen und trug auf der einen Seite eine Glasröhre von 3 mm Durchmesser, die einen Wattebausch als Luftfilter enthielt. Am andern Ende des Luftschlauches war eine Nadel von ca. 2 mm Durchmesser angesteckt. Je ein komplettes Infusionsbesteck und ein dazugehöriger Luftschlauch wurden flach zusammengerollt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Knickstellen entstanden, und in ein Tuch eingewickelt. Zusammen mit dem Infusionsbesteck wurde ein kontaminiertes, in Fließpapier verpacktes Fadenstück als Vergleichsprobe mitsterilisiert. Die fünf Pakete wurden auf einem erhöhten Rost (Schutz vor Durchnässung durch Wasserspritzer) in einen einwandigen Autoklaven gelegt, so dass die gerollten Schläuche horizontal zu liegen kamen. Die Oeffnungen waren seitwärts gerichtet. Es wurden zwei Sterilisationsversuche, jeder mit je fünf Infusionsbestecken, bei 120° während 20 Minuten vorgenommen:

- ohne Vorevakuierung der Dampfkammer.
- nach Vorevakuierung der Dampfkammer, wobei ein Vakuum von ca. 70 mm Hg erreicht wurde.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die Fäden wurden mit einer sterilen Pinzette aus den Schlauchstücken bzw. Glas-teilen herausgezogen und die kontaminierten Fadenteile an der Flamme eines Bunsenbrenners abgetrennt und in Röhrchen mit Thioglykolat-Bouillon fallen gelassen. Bebrütet wurde während 10 Tagen bei 37° . Die Resultate der beiden Versuche sind in Tab. 14 und Tab. 15 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Es ist frappant, mit welcher Gleichmässigkeit die Resultate der Sterilitätsprüfung ausgefallen sind. Die mittlere Partie der Infusionsbestecke (Stellen 5, 6, 7 und, in einem Fall, 4) konnte in keinem Fall wirksam sterilisiert werden. Auch mit der Vorevakuierung des Dampftopfes vor der Sterilisation wurde keine Verbesserung des Sterilisationseffektes erzielt.

Nach den in den vorangehenden Versuchen gemachten Erfahrungen überrascht das Resultat nicht. Es zeigt mit aller Deutlichkeit einmal mehr, wie schwer sich Dampf und Luft miteinander vermischen.

Tab. 14 Sterilisation von kontaminierten, trockenen Infusionsbestecken in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten, ohne Vorevakuierung der Dampfkammer

Versuch No. (je 1 Infusionsbesteck)	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+= Wachstum, -= kein Wachstum) Zahlen = Kontaminierungsstellen gemäss Abb. VII									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
44	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
46	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
47	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
48	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—

Tab. 15 Sterilisation von kontaminierten, trockenen Infusionsbestecken in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten, nach Vorevakuierung der Dampfkammer (ca. 70 mm Hg)

Versuch No. (je 1 Infusionsbesteck)	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+= Wachstum, -= kein Wachstum) Zahlen = Kontaminierungsstellen gemäss Abb. VII									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
49	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
50	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—
51	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
52	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
53	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—

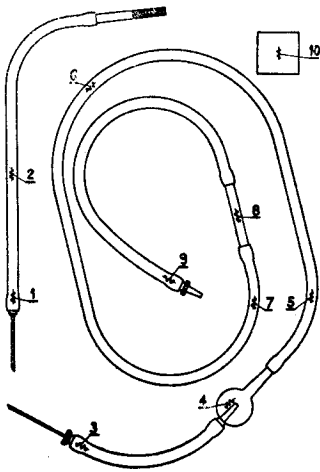


Abb. VII. Infusionsbesteck, bestehend aus Luft- und Transfusionsschlauch, kontaminiert mit auf Fäden aufgetragener Test-Erde (1-9). Vergleichsprobe (10) in ein Stück Fließpapier eingewickelt.

Auf Grund der Resultate können die physikalischen Vorgänge im Infusionsbesteck während der Dampfbehandlung wie folgt gedeutet werden: Vor Beginn der Dampfeinwirkung ist das Innere des Infusionsbesteckes mit reiner Luft unter Atmosphärendruck ausgefüllt. Beim Einsetzen der Dampfbehandlung dringt der Dampf zu den beiden offenen Enden des Besteckes bzw. des Luftschlauches ein, wobei einerseits die Luft mit dem steigenden Dampfdruck gegen die zentrale Partie des Schlauches zurückgedrängt wird, andererseits durch Diffusion eine Vermischung von Luft und Dampf zustande kommt. Zu einem gegebenen Zeitpunkt werden im Infusionsbesteck also folgende Verhältnisse vorliegen: In den zwei äusseren Zonen, entsprechend den Kontaminationsstellen 3 u. 4, 8 u. 9, ist praktisch nur Dampf vorhanden, und die Abtötung der Testkeime ist gewährleistet. In der Mitte des Schlauches, Kontaminationsstelle 6, ist praktisch nur Luft, und dort liegt die schwächste Stelle in bezug auf die Abtötung der Testkeime. In den zwei Uebergangszonen, Kontaminationsstellen 5 und 7, wird die Abtötung der Testkeime nur teilweise erreicht, weil der Dampf nicht immer in genügender Konzentration bis zu diesen Stellen vorgedrungen ist, um seine volle bakterizide Wirkung entfalten zu können.

Die Autoklavierung der fünf Luftschläuche erwies sich in allen Fällen als ausreichend. Der Dampf konnte also innert der 20-minütigen Sterilisation bis in die zentrale Partie des allerdings viel kürzeren Luftschlauches vordringen (Längenverhältnis von Infusionsbesteck zu Luftschlauch = 15:2).

Mehr Erfolg wäre von der Sterilisation nach Vorevakuierung des Autoklaven zu erwarten gewesen. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist aber – wohl mehr zufälligerweise – sogar um ein wenig schlechter ausgefallen als bei der Sterilisation ohne Vakuum-Anwendung! Damit wurde erneut bestätigt, dass die verdünnte Luft beim Zusammentreffen mit dem Dampf weit mehr das Bestreben hat, sich wieder zu einem entsprechend verkleinerten Polster reiner Luft komprimieren zu lassen, als sich, in verdünntem Zustand, gleichmässig von Dampf durchdringen zu lassen.

Schlussfolgerung

Bei der Autoklavierung von trockenen Infusionsbestecken ist auch nach Vorevakuierung der Dampfkammer mit einer schlechten Dampfzirkulation im Schlauchmaterial zu rechnen, so dass der Sterilisationserfolg bei Vorhandensein von resistenten Keimen durch die 20-minütige Autoklavierung bei 120° nicht gewährleistet ist.

Bessere Resultate dürfen erwartet werden, wenn das Besteck im nassen Zustand (Vorspülen mit filtriertem, destilliertem Wasser unmittelbar vor der Sterilisation) autoklaviert wird.

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Das Problem der Autoklavierung von Sterilisationsgut mit Hohlräumen wurde

an einer Anzahl von verschiedenartig geformten Gefässen und Utensilien praktisch untersucht. Es konnten folgende Feststellungen gemacht werden:

1. Die Durchdämpfung bzw. Entlüftung der Hohlräume ist innerhalb der üblichen Sterilisationszeit von 20 Minuten bei 120° oft ungenügend (Ueberleben von resistenten Testkeimen).
2. Die Faktoren, welche die Durchdämpfung beeinflussen, sind:
 - a) die Diffusion von Dampf und Luft.
Die Durchdämpfung der Hohlräume ist abhängig von der Kontaktfläche zwischen Dampf und Luft, d. h. von der Grösse der Geräteöffnungen und von der Form der zu sterilisierenden Gegenstände (Weglänge, die der eindringende Dampf zurückzulegen, und Hindernisse, die er zu überwinden hat).
 - b) die spezifische Schwere der Luft.
Die vollständige Entlüftung der Hohlräume kann nur gewährleistet werden, wenn die im Vergleich zum Dampf schwerere Luft nach unten aus den Hohlräumen entweichen kann.
 - c) die aktive Entlüftung durch Evakuierung.
Die Vorevakuierung der Dampfkammer an einer Wasserstrahlpumpe ist nur von begrenztem Nutzen, weil sie die Luft nicht aus den tiefer gelegenen, nach unten verschlossenen Teilen der Hohlräume und aus den zentralen Partien von längeren schlauch- oder röhrenförmigen, beidseitig offenen Utensilien (z. B. Infusionsbestecken) zu entfernen vermag.
 - d) die Benetzung des Sterilisationsgutes.
Die Benetzung des Innern der Geräte bzw. das Einfüllen von etwas destilliertem Wasser (ca. 1‰ berechnet auf das Volumen des Hohlraumes) ist eine einfache und ausgezeichnete Methode, um eine für die sichere Abtötung von resistenten Keimen ausreichende Dampfbildung zu erzeugen.

II. Sterilisation verschiedener pharmazeutischer Grundstoffe

I. Sterilisation von Glycerin

Obwohl nicht sehr häufig, wird steriles Glycerin als solches noch heute zu Instillationen in der Human- und Veterinärmedizin verwendet. Es ist ferner Bestandteil von Injektionslösungen, von Gleitmitteln für Katheter, von sterilen Anreibungen und von weiteren Zubereitungen, für deren Verwendung, z. B. auf offenen Hautstellen, die Keimfreiheit geboten ist.

Die eher spärlichen Angaben der Arzneibücher über die Sterilisation von Glycerin sind alles andere als einheitlich, wie folgende Aufstellung zeigt.

Sterilisationsvorschriften einiger Pharmakopoen für Glycerin:

- Ph. Belge IV : Die belgische Pharmakopoe lässt Glycerin entweder während
1931 2 Stunden im Trockenschrank bei 120° oder während 20 Minuten bei 115° im Autoklaven sterilisieren.
- Ph. Helv. V : Sowohl für das konzentrierte Glycerin (98 - 100% Propan-
1935 triol) als auch für das gewöhnliche Glycerin (84-88%) wird Autoklavieren während 20 Min. bei 110 - 120° oder Erhitzen im freiströmenden Wasserdampf während 20 Min. vorgeschrieben.
- Norske Farm. : Die Vorschrift der norwegischen Pharmakopoe deckt sich mit
1939 derjenigen der schweizerischen, mit dem Unterschied, dass einständiges Erhitzen im freiströmenden Wasserdampf verlangt wird.
- Ph. Dan. : Die dänische Pharmakopoe gibt für konzentriertes Glycerin
1948 die Trockensterilisation bei 140° während 3 Stunden, für Glycerin mit mindestens 20% Wassergehalt Autoklavierung während 20 Min. bei 120° an.
- DAB 6, Nach- : Für die Sterilisation von wasserfreiem Glycerin wird eine
trag DDR Temperatur von 140° während 45 Min. oder von 130° während 1 Stunde gefordert.
1954
- DAB 6, 3. Nach- : In den «Allgemeinen Bestimmungen» über die Heißluftsteri-
trag DBR lisation bzw. in den dort beigefügten Richtlinien wird für die
1960 Sterilisation von Glycerin (Glycerin DAB 6 enthält 13% bzw. 16% Wasser) die Temperatur von 180° angegeben. Ueber

die Gefährlichkeit dieser Methode soll weiter unten berichtet werden.

Brit. Ph. Codex : Darin wird für die Sterilisation von Glycerin einstündiges Erhitzen auf 150° vorgeschrieben.

Auch in den Lehrbüchern begegnet man auseinandergehenden Ansichten über das geeignete Sterilisationsverfahren für Glycerin. Nach *Stich*¹¹ «ist Glycerin am besten durch direkte Einwirkung (?) gespannten oder ungespannten Dampfes steril zu machen».

*Lautenschläger und Schmidt*¹² empfehlen, Glycerin im Autoklaven zu sterilisieren, da es oft nicht steril sei und Sporenbildner enthalten könne. Nach ihren Angaben soll Glycerin mit 12% Wasser nach einer Stunde bei 130° oder nach 45 Min. bei 140° keimfrei sein. *Reddish und Schmidt*¹³ geben für Glycerin die Sterilisationstemperatur von 170° während 60 Min. und von 160° während 120 Min. an.

Ueber eine recht unerfreuliche, aber interessante und nützliche Erfahrung berichtete kürzlich *Geist*²². Bei der Sterilisation von Glycerin (DAB 6 mit 13 - 16 % Wasser) gemäss Vorschrift des DAB 6, 3. Nachtrag ereignete sich eine Explosion. Die Nachforschungen nach deren Ursache führten zu folgender Erklärung:

Glycerin DAB 6 mit 13% bzw. 16% Wasser siedet bereits bei 130,5° bzw. 126°, während wasserfreies Glycerin einen Siedepunkt von 290° hat.

Dass für die Sterilisation von Glycerin bald niedrigere Temperaturen von 100 bis 120° wie für wässrige Lösungen als genügend erachtet, bald hohe Trockenschrank-Temperaturen wie für Fette und Öle gefordert werden, ist wohl darauf zurückzuführen, dass im einen Fall Glycerin mehr als hydrophile und praktisch stets wasserhaltige Substanz angesehen wird, im andern Fall mehr sein lipophiler Charakter und seine «ölige» Konsistenz berücksichtigt wird. Dem Glycerin als dreiwertigem Alkohol werden, wohl zu Recht, etwelche antiseptische Eigenschaften zugeschrieben – man verwendet es in Vaccinen und ophotherapeutischen Zubereitungen als Konservierungsmittel –, was ebenfalls zur Ansicht verleitet haben mag, dass niedrigere Temperaturen zur Keimtötung ausreichend seien. Ähnlich wie beim antiseptisch bedeutend wirksameren Aethylalkohol spielt aber auch beim Glycerin in dieser Hinsicht der Wassergehalt sicher eine entscheidende Rolle. Schon aus diesen Ueberlegungen scheint hervorzugehen, dass die Entkeimung von konzentriertem Glycerin andere Massnahmen erfordert als diejenige von stärker wasserhaltigem Glycerin.

EIGENE VERSUCHE

Problemstellung

Ursprünglich war nur beabsichtigt, die Vorschrift der Ph. Dan., wonach Glycerin mit einem Gehalt von mehr als 20% Wasser bei 120° während 20 Minuten im

²² Geist G., Dtsch. Apoth. Ztg., 101, No. 5, zit. in Schw. Apoth. Ztg. 99, 169 (1961)

Autoklaven sterilisiert werden kann, bakteriologisch zu überprüfen. Da mit resistenten Erdsproren kontaminierte, mehr als 20% Wasser enthaltende Glycerinproben nach diesem Verfahren nicht sterilisiert werden konnten, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, wobei sowohl die Temperatur und die Dauer der Temperatureinwirkung als auch der Wassergehalt des Glycerins variiert wurden.

Versuchsbedingungen

Glycerin und Glycerinverdünnungen

Es wurde frisch gekauftes Glycerinum conc. Ph. Helv. V mit einem durch Bestimmung des spez. Gewichtes festgestellten Propantriolgehalt von mindestens 98% verwendet. Ausgehend von diesem konzentrierten Glycerin, der Einfachheit halber als 100%ig betrachtet, wurden mit destilliertem Wasser die aus Tab. 16 ersichtlichen Verdünnungen hergestellt.

Kontaminierung der Versuchsproben

Die Kontaminierung der Glycerinproben — je 10 ml Versuchsmaterial in 20 ml Stechampullen — erfolgte durch Zusatz der geprüften trockenen, feingepulverten Sporenerde (s. Seite 4) im Verhältnis 1:200. Durch kräftiges Schütteln wurde für eine gleichmässige Verteilung der Testerde im Glycerin gesorgt.

Ueber die angewandten Sterilisationsverfahren gibt Tab. 16 Auskunft. Für die Dampfsterilisation wurde ein einwandiger Kleinautoklav (Egro) benutzt. Die Trockensterilisation erfolgte in einem elektrisch geheizten Heissluftschrank mit regulierbarer Temperatureinstellung.

In allen Fällen wurde der Temperaturverlauf im Sterilisationsgut selbst (Kontrollfläschchen mit konz. Glycerin) thermoelektrisch gemessen, womit die genaue Einhaltung der effektiven Sterilisationszeit und Sterilisationstemperatur ermöglicht wurde.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Aus jedem sterilisierten Fläschchen wurde mit steriler Pipette je 1 ml der aufgeschüttelten Erde/Glycerinsuspension (entsprechend 10% der Suspension oder 5 mg Sporenerde) entnommen und der Sterilitätskontrolle unterworfen. Vergleichsweise wurden auch vom frisch gekauften, nicht kontaminierten und nicht sterilisierten Glycerin (2 Lieferungen) insgesamt 9 Proben zu 1 ml auf Keimfreiheit geprüft. Anfänglich wurde die Prüfung sowohl in einem Aerobier- als auch in einem Anaerobier-Medium vorgenommen (Nährmedien nach Ph. Helv. V, Suppl. II). Da aber zwischen dem einen und andern kein Unterschied hinsichtlich Wachstum festzustellen war, wurden die Glycerin-Proben in den weiteren Versuchen, schon der Einfachheit halber, nur noch in Thioglykolat-Bouillon

Tab. 16 Sterilisation von Glycerin mit variierendem Wassergehalt im Trockenschrank und Autoklaven

Versuch No.	Sterilisationsverfahren	Ergebnis der Sterilitätsprüfung: Zahl vor dem Querstrich: Anzahl der sterilisierten Proben (= Penicillinflac. mit 10 ml kontaminiertem Glycerin bzw. Glycerin/Wasser-Mischung) Zahl nach dem Querstrich: Anzahl der sterilisierten Proben, die bei der Sterilitätsprüfung Wachstum ergaben.	Glycerin-Konzentration (Gew. %)																
			100%	90%	85%	80%	75%	70%	65%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	0% (H ₂ O)			
54	nicht sterilisiert, nicht kontaminiert		9/0																
55	Trockenschrank		6/0																
56	150°/2 Std.		5/0																
57	140°/1 Std.		14/0																
58	140°/3 Std.		12/2	6/0			2/0												
59	140°/2 Std.		6/3				2/0												
60	130°/1 Std.		6/5				6/0												
	130°/2 Std.																		
61	Autoklav		2/2				2/2												
62	130°/20 Min.		2/2				2/2												
63	125°/20 Min.		16/16	6/6	12/12	10/10	14/14	14/14	2/2	16/15	24/14	14/4	22/1	8/1	2/0				12/0
	120°/20 Min.																		

(Difco) überimpft, worin übrigens sowohl aerobes als auch anaerobes Wachstum möglich ist.

Die Bebrütung der beimpften Nährböden erfolgte im Brutschrank bei 37° während 10 Tagen.

Das Resultat der Untersuchung ist in Tab. 16 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

In den ausgeführten Sterilisationsversuchen, in denen konz. Glycerin auf 150° und wasserhaltiges Glycerin (bis zu 50% Wasser) auf 140° im Trockenschrank erhitzt wurde, also weit über den Siedepunkt der vorliegenden Glycerin/Wassermischungen, trat nie ein Glasbruch auf. Allerdings wurden als Gefäße die für ihre Robustheit bekannten Penicillinflacons zu 20 ml, die zudem nur zur Hälfte mit Glycerin gefüllt waren, benutzt. Nach der von *Geist*²² mitgeteilten Erfahrung ist es aber ratsam, nur annähernd wasserfreies Glycerin bei höheren Trockenschranktemperaturen zu sterilisieren, und zwar in Mengen nicht über 100 ml und in nicht ganz gefüllten Flaschen.

Die ausgeführten Sterilisationsversuche mit resistenten Testkeimen in Glycerin von verschiedenem Wassergehalt haben ergeben, dass auch stark wasserhaltiges Glycerin sterilisationstechnisch zur Gruppe der Fette und Öle gehört. Zur sicheren Sterilisierung von wasserfreiem oder sehr wasserarmem Glycerin ist einständiges Erhitzen bei 150° (Versuch 56) oder dreistündiges Erhitzen bei 140° (Versuch 57) erforderlich. Für Glycerin mit 10% Wasser genügt zweistündiges Erhitzen bei 140° (Versuch 58), für solches mit 20% Wasser zweistündiges Erhitzen bei 130° (Versuch 60). Autoklavieren bei 120° während 20 Minuten wird erst bei einem Wassergehalt von ca. 80-90% sicher wirksam (Versuch 63). Besonders das letztere, eigentlich überraschende Resultat kann nicht anders gedeutet werden, als dass dem Glycerin eine Schutzwirkung für die abzutötenden Keime eignet. Die Tatsache, dass die thermische Keimtötung wenigstens teilweise auf der Denaturierung des Bakterienplasma-Eiweisses beruht, lässt vermuten, dass diese Veränderung im Glycerin und im glyzerinhaltigen Wasser hintan gehalten wird. Mit einem einfachen Versuch konnte diese Vermutung, wenn nicht bestätigt, so doch gestützt werden. Etwas Eiweiss eines Hühnereies wurde in zwei Reagensröhrchen gegeben und das eine Mal mit gleichviel Wasser und das andere Mal mit gleichviel Glycerin Ph. Helv. V versetzt. Die beiden Röhrchen wurden in einem allmählich aufgeheizten Wasserbad erhitzt, wobei festzustellen war, dass die Eiweiss/Wassermischung deutlich früher als die Eiweiss/Glycerin-Mischung koagulierte.

Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen der vorgenommenen Versuche geht eindeutig hervor, dass die Sterilisation von Glycerin nach der Vorschrift der Ph. Helv. V bei Vorhandensein von resistenten Keimen (Erds sporen) ungenügend ist.

Als ausreichend dürfen folgende Sterilisationsverfahren gelten:

- a) Glycerinum conc. Ph. Helv. V (mindestens 98% Propantriol):
einstündiges Erhitzen auf 150⁰ oder
dreistündiges Erhitzen auf 140⁰ im Trockenschrank.
- b) Glycerinum Ph. Helv. V (84-88% Propantriol):
zweistündiges Erhitzen auf 140⁰ im Trockenschrank.

Beim letzteren Verfahren ist allerdings zu bedenken, dass Glycerin mit 16% Wasser bereits bei 126⁰ siedet und somit bei 140⁰ ein erheblicher Druck im Sterilisationsgefäß herrscht.

2. Sterilisation von Propylenglykol

Propylenglykol, CH₃ - CHOH - CH₂OH, stellt einen wichtigen pharmazeutischen Hilfsstoff dar, der zu mannigfachen Zwecken verwendet wird und der bereits in verschiedene Pharmakopoen Eingang gefunden hat und auch in die Ph. Helv. VI aufgenommen werden wird. *Leuenberger*²³ hat das Propylenglykol im Hinblick auf den Pharmakopoe-Artikel untersucht und berichtet in seiner Arbeit eingehend über Eigenschaften, Prüfungsvorschriften und pharmazeutische Anwendungsmöglichkeiten der neuen Pharmakopoe-Substanz. Die vorliegende Untersuchung beschränkt sich auf das Problem der Sterilisation von Propylenglykol. Für den Pharmakopoe-Artikel ist folgende Sterilisationsvorschrift vorgesehen: unverdünntes Propylenglykol nach c (2 Stunden bei 120⁰ im Trockenschrank), Gemische mit mindestens 20% Wasser nach g (15-20 Minuten bei 110-120⁰ im Autoklaven).

EIGENE VERSUCHE

Problemstellung

Nach den mit Glycerin vorgenommenen Sterilisationsversuchen, die zu eher überraschenden Resultaten geführt haben, lag es nahe, analoge Versuche mit Propylenglykol vorzunehmen. Dies um so mehr, als die zwei Substanzen einerseits sich chemisch und physikalisch sehr nahe stehen, andererseits aber doch wieder verschiedene Eigenschaften aufweisen, die sehr wohl einen Einfluss bei der thermischen Keimtötung ausüben könnten. So werden dem Propylenglykol, das z. B. in Form von Sprays für die Luftentkeimung verwendet wird, ausgeprägtere bakterizide und bakteriostatische Eigenschaften als dem Glycerin zugeschrieben.

Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial diente frisch eingekauftes Propylenglykol, das als USP XV-konform deklariert war. Für die Sterilisationsversuche im Trockenschrank kam es unverdünnt – als 100% angenommen –, für solche im Autokla-

²³ *Leuenberger Ch., Analytische Untersuchungen über Polyäthylenglykole und verwandte Hilfsstoffe für Pharmakopoezwecke, Diss Bern (1959)*

ven teils unverdünnt, teils mit steigenden Anteilen Wasser (s. Tab. 17) zur Anwendung.

Kontaminierung der Versuchsproben

Das Propylenglykol bzw. die Propylenglykol-Wassermischungen wurden im Verhältnis 1:200 mit der trockenen, fein pulverisierten Sporenerde versetzt. Das kontaminierte, gründlich durchgeschüttelte Untersuchungsmaterial wurde in Portionen zu 10 ml in 20 ml fassende Penicillinfläschchen mit Gummikappe und Metallring-Verschluss abgefüllt.

Sterilisation der Propylenglykol-Proben

Die Sterilisation nach g (120°/20 Minuten) wurde in einem einwandigen Klein-autoklaven, die Heissluftsterilisation (140°/2 Stunden und 140°/3 Stunden, 150°/1 Stunde) in einem elektrisch geheizten Trockenschrank mit automatischer Temperaturregulierung vorgenommen. Bei jedem Versuch wurde der Temperaturverlauf in einem Kontrollfläschchen mit 10 ml unverdünntem Propylenglykol elektrometrisch (Thermoelement) verfolgt, womit die genaue Einhaltung der Sterilisations-Temperatur und der Dauer der Temperatureinwirkung ermöglicht wurde.

Für jedes der angewandten Sterilisationsverfahren wurden mindestens 5 Fläschchen mit 10 ml unverdünntem Propylenglykol und mindestens je 5, z. T. 7 und 8 Fläschchen mit 10 ml von jeder Propylenglykol-Wasserverdünnung eingesetzt.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Für die Sterilitätsprüfung wurde aus jedem der kontaminierten, sterilisierten Testfläschchen 1 ml der vorerst gut aufgeschüttelten Erde-Propylenglykol-Suspension unter aseptischen Kautelen entnommen und zu 10 ml Thioglykolat-Bouillon gegeben. Die Bebrütung erfolgte bei 37° während 10 Tagen.

Die Resultate der Sterilitätsprüfung sind in Tab. 17 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

- a) Sterilisation des unverdünnten Propylenglykols im Trockenschrank (Versuche No. 64 - 66): Alle angewandten Heissluftverfahren, also schon das 2stündige Erhitzen bei 140°, haben in allen Fällen zur Abtötung der Testsporen im unverdünnten Propylenglykol geführt.
- b) Sterilisation des unverdünnten Propylenglykols und der Propylenglykol/Wasserverdünnungen im Autoklaven: Die Sterilisation des wasserhaltigen Propylenglykols bei 120° während 20 Minuten im Autoklaven wurde erst bei einem Wassergehalt von mindestens 20% wirksam.

Auffallend ist der einzelne Sterilisationserfolg im Autoklaven mit dem 100%igen Propylenglykol. Auch in den anderen Nährbouillon-Röhrchen, die mit dem bei

Tab. 17 Sterilisation von kontaminiertem, wasserfreiem Propylenglykol im Trockenschrank und von kontaminiertem Propylenglykol mit verschiedenem Wassergehalt im Autoklaven

Versuch No.	Sterilisations-Verfahren	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum) jedes + und — entspricht einem sterilisierten Fläschchen mit 10 ml kontaminiertem Propylenglykol bzw. Propylenglykol/Wasser-Gemisch								
		100%	95%	90%	85%	80%	75%	50%	0% (H ₂ O)	
64	Trockenschrank 150°/1 Std.	---								
65	140°/3 Std.	---								
66	140°/2 Stunden	---								
67	Autoklav 120°/20 Min.	++++	++++	++++	+	---	---	---	---	---

120⁰ sterilisierten, kontaminierten, unverdünnten Propylenglykol beimpft worden waren, entwickelten sich die Kulturen viel langsamer (erste Anzeichen von Wachstum erst nach 2, 3 bis 5 Tagen) als in den Nährbouillon-Röhrchen mit dem 95- und 90%igen Propylenglykol. Auf einer Wachstumshemmung in der Bouillon infolge ihres höheren Propylenglykolgehaltes kann diese Erscheinung nicht beruhen, weil der Unterschied zu den mit dem 95- und 90%igen Propylenglykol beimpften Röhrchen zu gering ist (9 % und 9,5 %, anstelle von 10%). Das verzögerte Wachstum scheint vielmehr darauf hinzuweisen, dass bei der thermischen Behandlung der Erdsproren im unverdünnten Propylenglykol ihre Abtötung bzw. Schädigung nach einem anderen Wirkungsmodus erfolgt als im wasserhaltigen Propylenglykol.

Im Vergleich zu den Sterilisationsversuchen mit Glyzerin ist festzustellen, dass die Abtötung der Erdsproren im Proylenglykol mehr gefördert wird als im Glyzerin und dass die Autoklavierung bei 120⁰ während 20 Minuten die Sterilität des Propylenglykols bei einem viel geringeren Wassergehalt gewährleistet (beim Propylenglykol: 20% Wasser, beim Glyzerin: ca. 80% Wasser!).

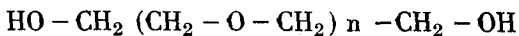
Schlussfolgerung

Für die Sterilisation von Propylenglykol können folgende Verfahren als ausreichend betrachtet werden:

- a) unverdünntes Propylenglykol: Sterilisation im Trockenschrank bei 140⁰ während 2 Stunden.
- b) Propylenglykol mit mindestens 20% Wasser: Sterilisation im Autoklaven bei 120⁰ während 20 Minuten.

3. Sterilisation von Polyäthylenglykol 400 und von Polyäthylenglykol 4000

Die Polyäthylenglykole (Polyglykole, Carbowaxe, Cremolane usw.), in der vorliegenden Arbeit mit PAeGl abgekürzt, sind Kondensationspolymere des Äthylenoxyds von der allgemeinen Formel:



Die im Handel angebotenen, auf einen bestimmten mittleren Polymerisationsgrad begrenzten Produkte werden im allgemeinen nach ihrem mittleren Molekulargewicht bezeichnet, z. B. als PAeGl 400 (mittlerer Polymerisationsgrad $n = \text{ca. } 7,7$) oder PAeGl 4000 (mittlerer Polymerisationsgrad $n = \text{ca. } 90$).

Die PAeGl finden bereits eine vielfältige Anwendung in der Pharmazie, besonders als Grundlagen für nichtfettende, abwaschbare Salben, wobei die Konsistenz durch Verwendung von PAeGl-Typen verschiedener Polymerisationsgrade nach Wunsch variiert werden kann. Als weiteren Vorteil der PAeGl ist zu erwähnen, dass sich darin viele in Wasser schlecht lösliche Wirkstoffe lösen, wodurch deren Resorption gefördert wird. Die PAeGl finden ferner Verwendung als Constituen-

tia für Suppositorien und Pillen, zu Tablettenüberzügen und als Lösungsvermittler in flüssigen Arzneizubereitungen.

*Beutner und Steiger*²⁴ haben in einem Uebersichtsreferat eingehend über Nomenklatur, Herstellung, Eigenschaften, pharmazeutische Verwendungsmöglichkeiten und Prüfung der PAeGl berichtet. Hier soll nur das Problem der Sterilisation der PAeGl behandelt werden. Dieser Frage kommt insofern eine grössere Bedeutung zu, als die PAeGl mehr und mehr als gut verträgliche Inkorporierungsmittel für Antiseptica, Antibiotica und Hormone verwendet werden, für Arzneiformen also, die einerseits öfters auf offene Hautstellen appliziert werden und bei denen anderseits der Abbau bzw. die Inaktivierung der Wirkstoffe durch bakterielle Verunreinigung verhindert werden muss.

Aber nicht der praktische Nutzen allein war der Beweggrund der hier beschriebenen Sterilisations-Versuche. Nach den bei der Sterilisation von Glycerin und Propylenglykol erzielten Resultaten war das Interesse gross, das Verhalten der resistenten Testkeime in den erhitzten wasserfreien und wasserhaltigen PAeGl kennen zu lernen. Alle diese Substanzen weisen Ähnlichkeiten miteinander auf, besonders in dem Sinne, dass sie einerseits mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar sind, anderseits aber ausgeprägte lipophile Eigenschaften besitzen. Was speziell die PAeGl betrifft, stellt sich bei ihnen das Problem der Sterilisation in grösserer Vielfalt, da man mit einer ganzen Reihe von Verbindungen zu tun hat, die wohl strukturell gleich aufgebaut sind, aber infolge der verschiedenen Molekulargewichte physikalisch recht verschiedene Eigenschaften aufweisen.

EIGENE VERSUCHE

Problemstellung

Hauptzweck der Untersuchung war, die Bedingungen der thermischen Abtötung von resistenten Erdsproren in Polyäthylenglykolen von verschiedenem Molekulargewicht und mit wechselndem Wassergehalt abzuklären. Zudem galt es, eventuelle Auswirkungen der Hitzebehandlung auf die PAeGl durch Messung der Viskosität und durch Bestimmung der Hydroxylzahl festzustellen.

a) Thermische Abtötung von resistenten Erdsproren in Polyäthylenglykol 400 und Polyäthylenglykol 4000

Untersuchungsmaterial

Der Einfachheit halber wurde die Untersuchung nur mit 2 Typen der PAeGl ausgeführt, nämlich mit den Vertretern der mittleren Molekulargewichte 400 und 4000. Es sind dies die in der Pharmazie gebräuchlichsten Typen, die häufig miteinander kombiniert verwendet werden. Sie können als zwei extreme Vertreter der PAeGl angesehen werden und schienen darum am besten geeignet, die Auf-

²⁴ Beutner W. u. Steiger K., *Subsidia Pharmaceutica*, Prüfungsvorschriften 4. 58

deckung von Verschiedenheiten bei der Hitzesterilisation zu ermöglichen. Beim PAeGl 400 handelt es sich um eine farblose, klare, visköse Flüssigkeit, beim PAeGl 4000 um weisse, paraffinähnliche Schuppen. Das untersuchte PAeGl 400 war als Polyäthylenglykol 400 pract. mit dem Molgewicht 480 - 420 und F. 4-8° deklariert, das untersuchte PAeGl 4000 (Siegfried) war nicht näher bezeichnet.

Das Untersuchungsmaterial wurde unverdünnt und mit den in Tab. 18 und Tab. 19 angeführten gewichtsprozentigen Anteilen destillierten Wassers in Mengen von 10 ml in 20 ml fassende Fläschchen mit Gummikappe und Metallring-Verschluss abgefüllt. Soweit das Material fest oder zu dickflüssig war, wurde es vor dem Abfüllen durch Erwärmen verflüssigt.

Kontaminierung der Versuchsproben

Alle Proben – Art und Anzahl derselben sind aus Tab. 18 und Tab. 19 ersichtlich – wurden mit 0,5% der trockenen, fein pulverisierten Sporenerde versetzt, wobei das feste und dickflüssige Material zu diesem Zwecke vorerst auf dem Wasserbade verflüssigt wurde, um eine gute Verteilung der Testerde beim Durchschütteln zu gewährleisten.

Sterilisation der Proben

Für die Dampfbehandlung (120° während 20 Minuten) wurde ein einwandiger Kleinautoklav, für die Heissluftsterilisation (140° während 2 und 3 Stunden, 150° während 1 Stunde) ein elektrisch betriebener Trockenschrank mit Thermostat verwendet. In allen Versuchen wurde der Verlauf der Wärmebehandlung in einem 10 ml PAeGl 400 bzw. 10 ml PAeGl 4000 enthaltenden Kontrollfläschchen mittels eines Thermoelementes verfolgt. Bei der Sterilisation der wasserfreien PAeGl 400 und 4000 im Trockenschrank wurde nur je ein Versuch pro Verfahren ausgeführt, bei der Sterilisation der wasserhaltigen PAeGl 400 und 4000 im Autoklaven wurde der für die Abtötung der Testsporen notwendige Wassergehalt in einem ersten Versuch approximativ an einer groben Verdünnungsreihe ermittelt (0%, 25%, 50%, 75%, 100% Wasser für das PAeGl 400; 0%, 20%, 50%, 75%, 100% Wasser für das PAeGl 4000). Nachher wurde im eingeeengten kritischen Verdünnungsbereich nach dem genaueren, für die Abtötung der Testsporen erforderlichen Wassergehalt gesucht (2%, 5%, 10%, 15% Wasser für das PAeGl 400 und PAeGl 4000).

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Aus jedem Fläschchen wurde 1 ml, d.h. ca. 10% der nötigenfalls verflüssigten, gut aufgeschüttelten PAeGl-Erde-Suspension (entsprechend 5 mg Sporenerde) aseptisch entnommen und in Röhrchen mit ca. 10 ml Thioglykolat-Bouillon hineinpipettiert. Die sorgfältig durchmischten beimpften Bouillon-Röhrchen wurden während 10 Tagen bei 37° bebrütet. Die Resultate der Sterilitätsprüfung sind in Tab. 18 für das PAeGl 400 und in Tab. 19 für das PAeGl 4000 wiedergegeben.

Tab. 18 Sterilisation von kontaminiertem, wasserfreiem Polyäthylenglykol 400 im Trockenschrank und von kontaminiertem Polyäthylenglykol 400 mit verschiedenem Wassergehalt im Autoklav

Vers. No.	Sterilisationsverfahren	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum) Konzentration = Gew. % Polyäthylenglykol 400; von jeder Konzentration wurden 5 Fl. mit 10 ml kontaminiertem Material sterilisiert und je 1 ml aus jedem Fläschchen für die Sterilitätsprüfung entnommen.								
		100%	98%	95%	90%	85%	75%	50%	25%	H ₂ O
68	Trockenschrank 150°/1 Std.	---								
69	140°/3 Std.	---								
70	140°/2 Std.	---								
71	Autoklav 120°/ 20 Min.	++++	++++	+++	---	---	---	---	---	---

Diskussion der Resultate der Sterilitätsprüfung

a) Polyäthylenglykol 400

- Sterilisation von wasserfreiem PAeGl 400 im Trockenschrank: Alle angewandten Sterilisationsverfahren, also schon das zweistündige Erhitzen auf 140°, führten zur Abtötung der Testsporen in sämtlichen Proben. Die Resultate entsprechen den bei der Heissluftsterilisation des wasserfreien Propylenglykols erzielten.

- Sterilisation von wasserfreiem und wasserhaltigem PAeGl 400 im Autoklaven:

Im wasserfreien PAeGl 400 überlebten die resistenten Erds sporen die Autoklavierung bei 120° während 20 Minuten. Schon nach 24 Stunden zeigten alle beimpften Bouillon-Röhrchen deutliches Wachstum. Die Autoklavierung unter den erwähnten Bedingungen wurde aber bei einem Wassergehalt von 10% voll wirksam. In der analogen Versuchsreihe mit Propylenglykol waren dafür mindestens 20% Wasser erforderlich.

b) Polyäthylenglykol 4000

- Sterilisation von wasserfreiem PAeGl 4000 im Trockenschrank:

Aus den Resultaten geht hervor, dass die Testsporen im wasserfreien PAeGl 4000 äusserst hitzeresistent sind, viel mehr als im PAeGl 400, im Propylenglykol und im konzentrierten Glyzerin. Ein Grund hiefür mag darin liegen, dass die letzteren Substanzen infolge ihrer grösseren Hygroskopizität wohl etwas wasserhaltig sind. Es ist aber auch denkbar, dass das höhere Molekulargewicht bzw. die Molekülgrösse des PAeGl 4000 einen Schutzfaktor für die abzutötenden Keime darstellt.

Bei der Sterilitätsprüfung war festzustellen, dass das Wachstum in den Röhrchen, die mit dem während 2 Stunden bei 140° sterilisierten PAeGl 4000 beimpft worden waren, schon in den ersten Tagen begann, während es in den Röhrchen mit den während 3 Stunden sterilisierten Proben erst nach 5 - 8 Tagen deutlich wurde. Von den während 1 Stunde auf 150° erhitzten Proben erwiesen sich nur deren zwei von fünf als unsteril. Bei der Sterilitätsprüfung war in einem der beiden Röhrchen das Wachstum schon am ersten Tage deutlich, im andern jedoch erst nach sechstägiger Bebrütung.

- Sterilisation von wasserfreiem und wasserhaltigem PAeGl 4000 im Autoklaven:

Bei diesem Sterilisationsverfahren (120°/20 Minuten) sind die Resultate ganz ähnlich ausgefallen wie im gleichartigen Versuch mit dem Polyäthylenglykol 400: bei einem Wassergehalt von 5% im PAeGl 4000 überlebten die Testkeime in allen sieben Versuchsproben (im Falle des PAeGl 400 waren es 2 von 5 Proben), bei einem Wassergehalt von 10% war die Autoklavierung hingegen voll wirksam.

b) **Auswirkung der Hitzebehandlung auf die Polyäthylenglykole 400 und 4000 in bezug auf die Viskosität und die Hydroxylzahl**

Aus den vorangehend beschriebenen Versuchen ging hervor, dass besonders für das PAeGl 4000 relativ hohe Sterilisationstemperaturen erforderlich sind. Es schien darum angezeigt, allfällige Auswirkungen hoher Temperaturen auf das PAeGl 400 und das PAeGl 4000 (Aufspaltung der Molekülketten) durch Messung der Viskosität und der Hydroxylzahl vor und nach der Wärmebehandlung zu untersuchen. Sowohl die Viskosität als auch die Hydroxylzahl bilden wichtige Konstanten der verschiedenen Polyäthylenglykole, weil sie Aufschluss über deren Molekulargewicht bzw. deren Polymerisationsgrad geben.

*Ausführung der Untersuchung**

Die Untersuchung wurde unabhängig von den weiter oben beschriebenen Sterilisationsversuchen ausgeführt.

Sterilisation

Es wurden je 50,0 g PAeGl 400 und PAeGl 4000 nach folgenden Sterilisationsverfahren sterilisiert:

- 120° / 20 Minuten im Autoklaven
- 150° / 60 Minuten im Trockenschrank
- 150° / 120 Minuten im Trockenschrank
- 160° / 90 Minuten im Trockenschrank

Es konnte dabei beobachtet werden, dass sich die Proben von PAeGl 400 nach der Hitzebehandlung im Trockenschrank verfärbt hatten, nämlich:

- bei 150° / 60 Minuten: sehr schwach gelb
- bei 150° / 120 Minuten: schwach gelb
- bei 160° / 90 Minuten: deutlich gelb

Nach der Autoklavierung war keine Veränderung festzustellen. Die Proben von PAeGl 4000 blieben bei allen Verfahren unverändert.

Bestimmung der Viskosität von PAeGl 400

Diese wurde mit dem Ostwald-Viskosimeter bei 20° ausgeführt und ergab folgende Resultate:

- PAeGl 400 nicht sterilisiert : Viskosität = 123,8 cP (20°)
- PAeGl 400 sterilisiert bei 150° / 120 Min. : Viskosität = 118,3 cP (20°)
- PAeGl 400 sterilisiert bei 160° / 90 Min. : Viskosität = 123,5 cP (20°)

Für das PAeGl 400 wird eine Viskosität von 105 - 140 cP (20°) gefordert. Mit dem PAeGl 4000, das bei gewöhnlicher Temperatur fest ist, wurde keine Viskositätsbestimmung ausgeführt.

* Die Untersuchung wurde in verdankenswerter Weise von Fr. B. Dewald am galenischen Institut der ETH ausgeführt.

Bestimmung der Hydroxylzahl

Die Bestimmung der Hydroxylzahl wurde nach der Methode der Ph. Helv. V Suppl. III, 2. Serie durchgeführt (Acetylierung der freien Hydroxylgruppen durch Zusatz eines Ueberschusses an Acetylchlorid in Pyridinlösung und Titration der bei der Acetylierung verbrauchten Essigsäure mit weingeistiger Kalilauge).

Die Untersuchung ergab folgende Resultate für das PAeGl 400:

– nicht sterilisiert	:	Hydroxylzahl =	266,1
– autoklaviert bei 120° / 20 Minuten	:	Hydroxylzahl =	259,9
– sterilisiert bei 150° / 60 Minuten	:	Hydroxylzahl =	258,7
– sterilisiert bei 150° / 120 Minuten	:	Hydroxylzahl =	275,3

Für die Hydroxylzahl des PAeGl 400 ist der Bereich zwischen 265 - 300 zulässig.

Für das PAeGl 4000 wurden folgende Hydroxylzahlen gemessen:

– nicht sterilisiert	:	Hydroxylzahl =	42,2
– autoklaviert bei 120° / 20 Minuten	:	Hydroxylzahl =	49,0
– sterilisiert bei 150° / 60 Minuten	:	Hydroxylzahl =	48,9
– sterilisiert bei 150° / 120 Minuten	:	Hydroxylzahl =	46,2

Der vorgeschriebene Bereich für die Hydroxylzahl des PAeGl 4000 liegt zwischen 25-31.

Diskussion der Resultate

Die gemessenen Viskositätswerte und Hydroxylzahlen berechtigen zur Annahme, dass bei den angewandten Sterilisationsverfahren keine Aufspaltung der Molekülketten eintritt.

Die Resultate der Hydroxylzahl-Bestimmung für das untersuchte PAeGl 400 liegen zwar im Mittel eher an der unteren zulässigen Grenze, die Werte für das untersuchte PAeGl 4000 gehen über den vorgeschriebenen Bereich hinaus; da sie jedoch vor und nach der Wärmebehandlung von derselben Grössenordnung sind, kann nicht von einer Veränderung durch diese thermische Einwirkung gesprochen werden.

Schlussfolgerung

Für die Sterilisation der Polyäthylenglykole 400 und 4000 kommen folgende Verfahren in Betracht:

Polyäthylenglykol 400: 150° während 1 Stunde oder 140° während 2 Stunden im Trockenschrank. Bei einem Wassergehalt von mindestens 10% : 120° während 20 Minuten im Autoklaven.

Polyäthylenglykol 4000: 2 Stunden bei 150° im Trockenschrank. Bei einem Wassergehalt von mindestens 10% : 120° während 20 Minuten im Autoklaven.

4. Sterilisation von Isopropylmyristinat, Isopropylpalmitat, Olivenöl und Paraffinöl

Es wäre ein endloses Unterfangen, für jede einzelne Substanz eine Sterilisationsvorschrift «nach Mass» ausarbeiten zu wollen. Und doch ist es eine Tatsache, dass die thermische Abtötung der Keime, je nach dem Substrat, worin sie vor sich geht, anders verläuft und dass sie mehr oder weniger stark von den Milieufaktoren, wie chemischen (u. U. antiseptischen) Eigenschaften des Substrates, Wassergehalt, pH, Konzentration, Viskosität usw. beeinflusst wird. Die Sterilisationsversuche mit Glycerin, Propylenglykol und Polyäthylenglykolen 400 und 4000 haben einige interessante Einblicke in diese Zusammenhänge vermittelt. Es schien uns darum von Interesse, jene Versuche mit Versuchen an lipophilen Substanzen zu ergänzen.

Untersuchungsmaterial

Die Untersuchung wurde mit folgenden Substanzen vorgenommen:

Isopropylmyristinat
Isopropylpalmitat
Olivenöl
Paraffinöl

Für diese Auswahl waren folgende Ueberlegungen massgebend:

Das Olivenöl wurde als Vertreter der vegetabilischen, das Paraffinöl als Vertreter der Mineral-Oele gewählt.

Neben diesen beiden altvertrauten Pharmakopoe-Substanzen wurden zwei neuerdings als kosmetische Hilfsstoffe in den Handel gebrachte Ester des Isopropylalkohols, das Isopropylmyristinat und das Isopropylpalmitat* in die Untersuchung einbezogen. Es handelt sich dabei um praktisch geruchlose, wasserhelle Substanzen von dünnflüssig-ölicher Konsistenz. Sie sind mit vegetabilischen Oelen klar mischbar und erniedrigen deren Viskosität. Auch in Mineralölen sind sie in jedem Verhältnis klar löslich. Gegen hydrolytische und oxydativ-katalytische Einwirkungen sind die beiden Ester beständig. In ihren Eigenschaften sind sie sich sehr ähnlich. Die Verschiedenartigkeit in chemischer Hinsicht — die Myristinsäure $C_{13} H_{27} COOH$ ist kurzkettig, die Palmitinsäure $C_{15} H_{31} COOH$ langkettig—liess hingegen eine vergleichende Sterilisationsuntersuchung als lohnenswert erscheinen.

Versuchsbedingungen

Die der Untersuchung unterzogenen Substanzen wurden in Mengen von 10 ml in

* *Hersteller:* Dragoco, Holzminden. Vertrieb in der Schweiz: Geobell AG, Marktgasse 4, Zürich 1. Die allgemeinen Angaben sind einem Schreiben der Hersteller-Firma entnommen.

20 ml fassende Penicillin-Flacons mit Gummikappe** und Metallringverschluss abgefüllt, nachdem sie mit 0,5% der trockenen, fein pulverisierten Testsporenerde kontaminiert worden waren. Die Anzahl der Fläschchen ist aus Tab. 20 ersichtlich.

Die Proben wurden nur in der Heissluft sterilisiert, und zwar im einen Versuch bei 140° während 1, 2 und 3 Stunden, im andern bei 150° während 1 und 2 Stunden. Die Sterilisation erfolgte in einem elektrisch geheizten Trockenschrank mit Thermostat. Bei jedem Versuch wurde der Temperaturverlauf mit einem in einem Kontrollfläschchen steckenden Thermoelement überprüft, was die genaue Einhaltung der Sterilisationsbedingungen im Sterilisationsgut selbst ermöglichte.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Aus jedem kontaminierten, sterilisierten Fläschchen wurde die in Tab. 20 angegebene Anzahl Proben zu 1 ml des gut aufgeschüttelten Inhaltes entnommen und aseptisch zu je 10 ml Thioglykolat-Bouillon pipettiert. Die beimpften Bouillon-Röhrchen wurden zwischen den Handflächen gut durchmischt, eine Prozedur, die bei der täglichen Wachstumskontrolle während der 10 Tage dauernden Bebrütung bei 37° wiederholt wurde.

Das Ergebnis der Sterilitätsprüfung ist aus Tab. 20 ersichtlich.

Diskussion der Resultate

Die Resultate lassen allgemein eine starke Wärmeresistenz der Testsporen in den verschiedenen lipophilen Substraten erkennen. Ueberraschend ist vor allem das «Aus-der-Reihe-Tanzen» des Isopropylpalmitates, in dem die Abtötung der Testsporen schon nach der 2stündigen Behandlung bei 140° eintrat, im Gegensatz zu den drei anderen Substanzen, in denen die Testsporen in allen Fällen auch das 3stündige Erhitzen auf 140° überlebten. Dieses Resultat kann nur damit erklärt werden, dass im Falle des Palmitinsäureesters ein «chemischer Faktor» die Abtötung der Keime fördert.

Auffallend ist ferner, dass sich die einstündige Sterilisation bei 150° als wirksamer erwies als die dreistündige bei 140°. Die besondere «Hartnäckigkeit» der Testsporen im Paraffinöl darf wohl auf dessen grosse chemische Indifferenz zurückgeführt werden.

** Gummi eignet sich sonst keineswegs als Verschlussmaterial für Flaschen mit «Oel»-Inhalt und verträgt auch nicht schädlos hohe Trockenschrank-Temperaturen. Bei unseren Versuchen, bei denen die Veränderung des Gummis keine Rolle spielte, hat er sich aber ganz gut bewährt.

Tab. 20 Sterilisation von kontaminiertem Isopropylmyristinat, kontaminiertem Isopropylpalmitat, kontaminiertem Olivenöl und kontaminiertem Paraffinöl (subliq.) im Trockenschrank

Versuch No.	Versuchsmaterial	Ergebnis der Sterilitätsprüfung				
		+	=	Wachstum	(+) = Wachstum fraglich — = kein Wachstum	
		Sterilisation				
		von jeder kontaminierten Substanz wurde 1 Flaschen zu 10 ml sterilisiert und daraus wurden je 3 Proben zu 1 ml für die Sterilitätsprüfung genommen.	von jeder kontaminierten Substanz wurden 2 Flaschen zu 10 ml sterilisiert und daraus je 2 bzw. je 3 Proben für die Sterilitätsprüfung entnommen.			
		140°/1 Std.	140°/2 Std.	140°/3 Std.	150°/1 Std.	150°/2 Std.
77	Isopropylmyristinat	+++	+++	+++	—(+)	---
78	Isopropylpalmitat	+++	---	---	---	---
79	Olivenöl	+++	+++	+++	---	---
80	Paraffinöl	+++	+++	+++	+ -- +	---

Schlussfolgerung

Nach den allerdings nur in bescheidenem Ausmass durchgeführten Sterilisationsversuchen dürfen für die untersuchten lipophilen Substanzen folgende Heissluft-Sterilisations-Verfahren als ausreichend angesehen werden.

Olivenöl	:	150 ^o während 1 Stunde
Paraffinöl	:	150 ^o während 2 Stunden
Isopropylpalmitat	:	140 ^o während 2 Stunden
Isopropylmyristinat	:	150 ^o während 1 - 2 Stunden

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Es wurden Untersuchungen über die Abtötung von resistenten Testkeimen (Sporenerde) in verschiedenen pharmazeutischen Grundsubstanzen (Glyzerin, Propylenglykol, Polyäthylenglykole 400 und 4000, Olivenöl, Paraffinöl, Isopropylmyristinat und Isopropylpalmitat) vorgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den Stoffen mit hydrophilen Eigenschaften der Wassergehalt für die Keimtötung einen entscheidenden Faktor darstellt. Der für die Keimtötung bei 120^o während 20 Minuten erforderliche prozentuale Wassergehalt ist von Substanz zu Substanz verschieden und z. B. für Glyzerin überraschend hoch. Aus den Sterilisations-Versuchen mit ausgeprägt lipophilen Substanzen, in denen die Abtötung der resistenten Testsporen erst nach Anwendung von hohen Trockenschrank-Temperaturen erreicht werden konnte, ging hervor, dass die zur wirksamen Sterilisation erforderlichen Temperatur/Zeit-Faktoren von Substanz zu Substanz recht verschieden sind, was am Beispiel von zwei chemisch sehr ähnlichen Stoffen wie dem Isopropylpalmitat und dem Isopropylmyristinat am auffälligsten zum Ausdruck kam.

III. Sterilisation von Glukoselösungen

In der Ph. Helv. V finden sich sowohl im Artikel «Glycosum ad iniectioem» als auch im Artikel «Solutio Glycosi isotonica» Angaben über die Sterilisation von Traubenzuckerlösungen. Die Gegenüberstellung der beiden Vorschriften zeigt, dass sie von einander abweichen.

Sterilisationsvorschriften der Ph. Helv. V für Glukoselösungen

Glycosum ad iniectioem:

Bis zu 15% Gehalt nach g (15 - 20 Minuten bei 110-120°), konzentriertere Lösungen nach f (freiströmender Wasserdampf von ca. 100° während 30 Min.) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

Solutio Glycosi isotonica:

In Gefässen aus alkaliarmem Glase nach f an zwei aufeinanderfolgenden Tagen oder nach g während 15 Minuten bei 115°.

Im Artikel «Glycosum ad iniectioem» wird somit für Lösungen bis zu 15% Gehalt *nur* die Sterilisation nach g zugelassen, während die Vorschrift für die 5%ige isotonische Lösung dazu noch die zweimalige Sterilisation nach f gestattet. Ausserdem wird für die isotonische Glukoselösung durch den Pharmakopoetext die sonst übliche Maximaltemperatur von 120° nicht verlangt, während sie im Text für Glycosum ad iniectioem ausdrücklich zugelassen wird. Beim Lesen der eben zitierten Pharmakopoe-Texte wird man unwillkürlich an jene Grundregel der Sterilisation erinnert, die eingangs der «Allgemeinen Bestimmungen betreffend Sterilisationsverfahren» in der Ph. Helv. V steht:

«In jedem Einzelfalle der Sterilisation muss die Eigenart des zu sterilisierenden Gegenstandes berücksichtigt und ein Verfahren gewählt werden, das den Gegenstand einerseits gar nicht oder so wenig wie möglich schädigt und das andererseits einen möglichst sicheren Sterilisationserfolg erwarten lässt.» Je nachdem, ob man nun der optimalen Schonung der Traubenzuckerlösungen oder der gesicherten Sterilität mehr Bedeutung beimisst, wird man das eine oder das andere der von der Ph. Helv. V angegebenen Sterilisationsverfahren wählen.

Wenn man in andern Arzneibüchern und in der weiteren Fachliteratur nach Herstellungs- und Sterilisationsvorschriften für sterile Traubenzuckerlösungen sucht, stellt man eine grosse Uneinheitlichkeit fest. Die Glukoselösungen werden teils

ohne, teils mit Zusätzen hergestellt, wobei letztere bald sauren (HCl, CO₂), bald alkalischen Charakter (Natriumbikarbonat, Natriumzitat) haben²⁵. Die Sterilisationsvorschriften variieren mit Temperaturen, die meistens zwischen 100° und 120° liegen. Vereinzelt wird auch die Keimfiltration empfohlen. Diese Mannigfaltigkeit der Angaben für eine doch so wohlbekanntes Arzneisubstanz – Glukose nimmt von allen parenteral verabreichten Medikamenten mengenmässig weitaus den ersten Rang ein – mutet erstaunlich an. Sie findet aber ihre Erklärung darin, dass man sich über das Ausmass der Thermolabilität der Traubenzuckerlösungen und besonders über die toxikologische Bedeutung der Zersetzungsprodukte keineswegs einig ist.

Die thermischen Veränderungen von Glukoselösungen

Ueber die thermischen Veränderungen der Glukoselösungen wurden in den letzten Jahren wiederholt Untersuchungen²⁶⁻³¹ durchgeführt.

Die Thermolabilität dieser Lösungen ist durch zwei Hauptmerkmale gekennzeichnet:

- die Neigung zur Verfärbung
- die Erniedrigung des pH

1. Die Verfärbung von thermisch behandelten Glukoselösungen

Dieses augenfällige Zersetzungssymptom wird teils als Schönheitsfehler, teils aber auch als zumindest verdächtiges Zeichen für die Bildung von vielleicht nicht ganz harmlosen Abbauprodukten angesehen.

Als Faktoren, welche die Verfärbung der sterilisierten Traubenzuckerlösungen beeinflussen, konnten ermittelt werden:

- a) Der Reinheitsgrad des Traubenzuckers.
*Völksen*²⁷, der *Saccharum amylicum puriss.* und eine handelsübliche, chemisch reine Dextrose mit einem Mol Kristallwasser (Hydratdextrose) unter gleichen Bedingungen sterilisierte, stellte fest, dass bei letzterer eine stärkere Verfärbung eintrat.
- b) Die Konzentration der Lösungen.
Je höher die Konzentration, desto stärker ist die Verfärbung der sterilisierten Lösungen.
- c) Die Höhe der angewandten Temperatur und die Dauer ihrer Einwirkung.
Nach *Völksen*²⁷ erweist sich die Abhängigkeit der Farbtiefe von der Sterilisationstemperatur als eine Exponentialfunktion. Aus den Versuchen von

²⁵ Hager H., Die Injektionslösungen, Diss. ETH Zürich, S. 108, Immensee 1955

²⁶ Steiger K. und Bergmann M., Schweiz. Ztg. 84, 812 (1946)

²⁷ Völksen W., Arch. Pharm. 285, 392 (1952)

²⁸ Völksen W., Arch. Pharm. 287, 459 (1954)

²⁹ Hornauer H., Pharmazie 9, 574 (1954)

³⁰ Lehmann H., Boll. Soc. ital. Farm. ospital. 5, 129 (1959)

³¹ Webb N. E., J. amer. pharm. Ass. (sci. Ed.) 47, 101 (1958)

*Hager*²⁵ geht hervor, dass bei längerer Wärmeeinwirkungsdauer die Verfärbungsintensität besonders bei den höher konzentrierten Lösungen stark zunimmt.

- d) Das Ausgangs-pH der zu sterilisierenden Lösungen.
Die Neigung zur Verfärbung ist am geringsten bei stärker sauren pH-Werten. Lösungen, die mit Salzsäure auf ein pH von 3 - 3,5 eingestellt werden, ertragen das Erhitzen auf 120° ohne Verfärbung.
- e) Die Erhöhung des pH während des Sterilisationsvorganges. Minderwertige Glasqualität verursacht stärkere Verfärbung. Noch viel nachteiliger wirkt sich der Zusatz von alkalischen Puffersubstanzen zu den Glukoselösungen aus (Natriumzitrat, Natriumlaktat, Alkaliphosphate usw.), weil diese Substanzen, bzw. die OH-Ionen, die Bildung der gefärbten Zersetzungsprodukte katalytisch fördern³¹.

Die Natur der gefärbten und farblosen Abbaustoffe

Es steht heute noch nicht eindeutig fest, welche Abbaustoffe die Gelb-Verfärbung der sterilisierten Traubenzuckerlösungen bewirken. Diese Frage bildet übrigens nur einen Aspekt des Kernproblems, das lautet: welcher Art sind die (gefärbten oder farblosen) Zersetzungsprodukte, die in den sterilisierten Glukoselösungen entstehen; sind sie harmlos oder weisen sie in den auftretenden Konzentrationen toxikologische Eigenschaften auf? In erster Linie ist es darum wichtig, diese Abbaustoffe durch spezifische, chemische Reaktionen zu erkennen und nach Möglichkeit quantitativ zu erfassen.

In dieser Hinsicht sind in den letzten Jahren auch Fortschritte erzielt worden, indem wenigstens ein Zersetzungsprodukt, das 5-Hydroxymethylfurfurol (HMF), aus erhitzten Glukoselösungen isoliert und identifiziert werden konnte²⁸. Das HMF kann z. B. durch Umsetzung zum entsprechenden p-Nitrophenylhydrazon nachgewiesen werden. Ob die gelbliche Verfärbung der erhitzten Traubenzuckerlösungen auf der Anwesenheit des HMF beruht, ist noch nicht völlig abgeklärt. *Völksen* vermutet dies und begründet seine Vermutung damit, dass auch Furfurol und wässrige Furfurolösungen bei längerem Stehen an der Luft sich braun verfärben. Nach *Webb*³¹ und Mitarbeitern ist die gelbe Färbung auf Polymerisationsprodukte des HMF zurückzuführen. Auch über die Mengen des gebildeten HMF herrscht noch einiges Dunkel. Nach *Völksen* sind sie durchwegs gering, fand er doch in keiner der von ihm untersuchten Lösungen mehr als 50 mg %.

Mit dem sicheren Nachweis eines chemisch genau definierten Zersetzungsproduktes hat das Problem der Thermolabilität von Glukoselösungen eine wichtige Aufklärung erfahren. Ganz gelöst ist es aber sicher noch nicht, denn es ist anzunehmen, dass neben dem HMF und dessen sekundären sauren Zerfallsprodukten, von denen weiter unten die Rede sein soll, noch andere Abbaustoffe entstehen. Vor allem ist an die Entstehung von höher molekularen Verbindungen durch Kondensation zu denken. Dafür spricht, dass die Gelb-Färbung vermehrt in Ge-

fässen aus minderwertigem Glas und noch ausgeprägter bei Anwesenheit von Puffersubstanzen (Phosphat-, Zitrat-, Laktatverbindungen usw.) auftritt, d. h. in Gegenwart von OH-Ionen, die bekanntlich Kondensations- und Polymerisations-Reaktionen katalysieren. Die von *Hornauer*²⁹ auf jodometrischem Wege ermittelten enorm anmutenden Glukoseverluste in den sterilisierten Traubenzuckerlösungen – ca. 10% nach der 8minütigen Sterilisation bei 120°! – lassen ebenfalls auf solche Zersetzungs- bzw. Umsetzungsprodukte schliessen.

Die Bedeutung der gefärbten und farblosen Abbaustoffe

Die Verfärbung der Glukoselösungen ist nur dann von Belang, wenn damit eine wirkliche Beeinträchtigung ihrer Qualität verbunden ist. Die Qualitätsverminderung kann verschiedener Natur sein: entweder deutet die Verfärbung auf die Anwesenheit von Abbaustoffen mit pharmakologisch unerwünschter Wirkung hin, oder sie ist einfach als Zeichen von eingetretenen Glukoseverlusten zu werten. Ueber die Toxizität vom HMF ist nichts Genaueres bekannt. Vom Furfurol weiss man hingegen, dass es in grösseren Mengen – 0,2 g beim Kaninchen, 3 - 4 g beim Hund – Krämpfe erzeugt, die Speichel- und Schweissekretion verstärkt, den Blutdruck senkt und die Körperwärme vermindert³². Wenn das HMF eine ähnliche Wirkung entfalten sollte, darf doch festgestellt werden, dass die in den auf 120° erhitzten Glukoselösungen enthaltenen Mengen HMF sehr gering sind und dass bis anhin in der Literatur keine Angaben über derartige Nebenwirkungen von verfärbten Traubenzuckerlösungen zu finden sind. Um die allfälligen Glukoseverluste zu kompensieren, hat *Hornauer* vorgeschlagen, diese zum vornherein bei der Herstellung der Lösungen durch eine 10%ige Erhöhung der Konzentration auszugleichen. Eine solche Massnahme ist aber wohl übertrieben, weil die «Verluste» wahrscheinlich zum grössten Teil auf eine Kondensation oder Polymerisation der Zuckermoleküle zurückzuführen sind, wobei anzunehmen ist, dass dadurch der Nährwert der Lösungen, auf den es ankommt, kaum verändert wird.

2. Die pH-Erniedrigung von thermisch behandelten Glukoselösungen

Bei der thermischen Behandlung von Glukoselösungen wird das pH nach der sauren Seite verschoben. Ein Bild des Ausmasses dieser Veränderung gibt Tab. 21, in der die Angaben verschiedener Autoren zusammengefasst sind.

Die Uebersicht zeigt, dass die Glukoselösungen ohne Zusätze nach der Wärmebehandlung pH-Werte zwischen 3,95 und 4,6 aufweisen, wenn man von den zwei von *Hornauer* gefundenen, mit einem Ausrufzeichen markierten Resultaten für die 66%ige Lösung absieht. Was die Faktoren anbelangt, welche die pH-Veränderungen beeinflussen, kann ganz allgemein gesagt werden, dass die Konzentration der Traubenzuckerlösungen und die Höhe und die Dauer der Temperatureinwirkung dabei eine Rolle spielen. Aus der Tab. 21 geht jedoch hervor, dass die von diesen Faktoren beeinflussten Abweichungen relativ gering sind.

³² Lewin L., *Gifte und Vergiftungen*, Berlin 1929

Tab. 21 pH-Veränderungen von Glukoselösungen verschiedener Konzentration unter variierenden Sterilisationsbedingungen (Zusammenstellung aus der Literatur)

Autor	Glukose-Konzentr.	Sterilisationsbedingungen			pH-Werte	
		Zusätze zur Lösung	Temp.	Dauer in Min.	vor St.	nach St.
Steiger ²⁸	5 %	keine	100 ⁰	2x30	5,8	4,6
	5 %	keine	120 ⁰	15	5,8	4,2
	10 %	keine	100 ⁰	2x30	5,6	4,4
	10 %	keine	120 ⁰	15	5,6	4,1
	20 %	keine	100 ⁰	2x30	5,6	4,3
	20 %	keine	120 ⁰	15	5,6	4,0
	50 %	keine	100 ⁰	2x30	5,6	4,4
	50 %	keine	120 ⁰	15	5,6	4,1
Hornauer ²⁸	10 %	keine	100 ⁰	8	6,0	4,4
	10 %	keine	100 ⁰	30	6,0	4,2
	10 %	keine	100 ⁰	60	6,0	4,1
	10 %	keine	120 ⁰	8	6,0	4,1
	10 %	keine	120 ⁰	15	6,0	4,1
	20 %	keine	100 ⁰	8	6,0	4,5
	20 %	keine	100 ⁰	30	6,0	4,2
	20 %	keine	100 ⁰	60	6,0	4,2
	20 %	keine	120 ⁰	8	6,0	4,2
	20 %	keine	120 ⁰	15	6,0	4,1
	66 %	keine	100 ⁰	8	5,8	5,2!
	66 %	keine	100 ⁰	30	5,8	4,6
	66 %	keine	100 ⁰	60	5,8	4,6
	66 %	keine	120 ⁰	8	5,8	5,0!
	66 %	keine	120 ⁰	15	6,0	4,3
Hager ²⁸	5,4 %	keine	120 ⁰	20	5,6	4,4
	5,4 %	CO ₂ -Begasung	120 ⁰	20	4,35	4,7
	30 %	keine	120 ⁰	20	6,2	4,3
	30 %	CO ₂ -Begasung	120 ⁰	20	4,1	4,5
	50 %	keine	120 ⁰	20	5,3	4,2
	50 %	CO ₂ -Begasung	120 ⁰	20	4,1	4,3
Lehmann ³⁰	5 %	keine	105 ⁰	60	4,95	4,025
	5 %	Auskochen + N ₂ -Begasung	105 ⁰	60	7,5	4,85
	5 %	0,03 ‰ NaHCO ₃	105 ⁰	60	5,95	5,35
	5 %	keine	110 ⁰	20	4,95	4,05
	5 %	0,03 ‰ NaHCO ₃	110 ⁰	20	5,95	4,95
	5 %	keine	120 ⁰	15	4,95	4,05
	5 %	0,03 ‰ NaHCO ₃	120 ⁰	15	5,95	4,35
	5 %	1 ‰ HCl in			3,0	3,0
	10 %	keine	105 ⁰	60	4,95	4,1
	10 %	keine	110 ⁰	20	4,95	4,025
	10 %	keine	120 ⁰	15	4,95	4,05
	20 %	keine	105 ⁰	60	4,85	3,95
	20 %	keine	110 ⁰	20	4,85	4,0
	20 %	keine	120 ⁰	15	4,85	3,95

Mit dem Auskochen und der Stickstoffbegasung vor der Sterilisation wie auch mit dem Zusatz von Natriumbikarbonat findet wohl eine deutliche, aber doch bescheidene Verschiebung des pH nach der alkalischen Seite hin statt, was allerdings gegen eine stärkere Verfärbung der Lösungen eingetauscht wird. Bei Einstellung auf pH 3 tritt keine weitere pH-Veränderung bei der Sterilisation ein.

Die Natur der sauren Abbaustoffe

Von den die pH-Erniedrigung verursachenden Abbaustoffen wurde von *Völksen* durch Wasserdampfdestillation die Ameisensäure in Spuren isoliert, die er als Zerfallsprodukt des HMF betrachtet. Neben Ameisensäure vermutet *Völksen* noch Laevulinsäure. Nach *Hornauer* soll zudem Milchsäure entstehen.

Die Bedeutung der sauren Abbaustoffe

An und für sich kommt der Anwesenheit der oben genannten Säuren in den Infusionslösungen sicher keine grosse Bedeutung zu, weil sie nur in sehr geringen Mengen vorkommen und an sich nicht toxisch sind.

Der eigentliche Nachteil der gebildeten Säuren liegt in der Erniedrigung des pH der Glukoselösungen. Stärker saure und stärker alkalische Lösungen verursachen bei der parenteralen Verabreichung Schmerzen und können zu Venenschäden Anlass geben³³. Dies gilt ganz besonders für Infusionslösungen, die in grossen Mengen und manchmal über Tage und Wochen in die Blutbahn eingeführt werden. Das Blut besitzt zwar ein ausgezeichnetes Puffersystem, durch das besonders pH-Verschiebungen gegen die saure Seite hin abgefangen werden. Im Normalfall wird deshalb die «saure» Glukoselösung, die ja meist als Tropf-Infusion verabreicht und daher im Blutstrom rasch verdünnt wird, mit Leichtigkeit neutralisiert und vom Organismus anstandslos vertragen. Es muss aber auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass das Puffersystem des Blutes aus irgend einem Grunde (Acidose) erschöpft ist. Die Injectabilia und in vermehrter Masse die Infusionslösungen sollen darum tunlichst dem physiologischen Blut-pH angepasst werden (pH 7,2 bis 7,5).

EIGENE VERSUCHE

1. Untersuchung über einen möglichen Einfluss der Konzentration von Traubenzuckerlösungen auf die Abtötung von nativen Erdsproren bei der Sterilisation nach g (120° / 20 Minuten)

Der Untersuchung lag die Annahme zugrunde, dass bei höher konzentrierten Traubenzuckerlösungen, ähnlich wie bei den Glycerin-Wassermischungen (s. S.

³³ Vere D. W., Lancet, Heft 7151, S. 627 (1960): Der Autor konnte beweisen, dass annähernd neutrale Glukose-Infusionen statistisch gesicherte bessere Verträglichkeit zeigen als solche von pH 3,3 - 3,6, nach deren Infundierung gehäuft Thrombophlebitis auftrat.

55), die bakterizide bzw. bakterienschädigende Wirkung der thermischen Sterilisation herabgemindert sein könnte. Dabei wurde vor allem an ein verschlechtertes Eindringen des Wassers bzw. der Wasserstoff-Ionen in den Bakterienzelleib hinein gedacht (verändertes Osmose-Potential zwischen der Glukoselösung und dem Zell-Plasma). Ferner könnte infolge der starken Hydratisierung der Glukose in konzentrierten Lösungen zu wenig freies Wasser für die Abtötung der Mikroorganismen zur Verfügung stehen.

Versuchsbedingungen

Der Versuch wurde mit 5, 20, 35 und 50 Gew. %igen (W/W) Traubenzuckerlösungen ausgeführt.

Alle Lösungen wurden im Verhältnis 1:200 mit der fein pulverisierten Test-Sporenerde kontaminiert.

Von jeder Konzentration wurden je 10 ml der kontaminierten Lösung in 5 Injektionsfläschchen mit Gummiverschluss (Penicillin-Fläschchen) abgefüllt.

Die Sterilisation der Lösungen wurde in einem einwandigen Kleinautoklaven vorgenommen, wobei die Temperatur fortlaufend in einem Kontrollfläschchen mit nicht kontaminierter 50 Gew.%iger Glukoselösung thermoelektrisch überprüft wurde.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Prüfung auf Sterilität wurde aus jedem Fläschchen ca. 1 ml der aufgeschüttelten Sporenerde-Suspension entnommen und zu je ca. 10 ml Thioglykolat-Nährbouillon gegeben. Die Proben wurden 10 Tage lang bei 37° bebrütet. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 22 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Aus den Resultaten geht mit aller Deutlichkeit hervor, dass die Abtötung von resistenten Erdsproren beim Sterilisationsverfahren nach g (120° / 20 Minuten) in allen üblichen Glukose-Konzentrationen gewährleistet ist.

Schlussfolgerung

Bis zu einem Glukosegehalt von 50 Gew.% ist die Konzentration bei der Sterilisation nach g (120°/20 Minuten im Autoklaven) von keinem Einfluss auf die Abtötung von nativen Erdsproren.

2. Vergleichende bakteriologische Ueberprüfung der Sterilisationsverfahren der Ph. Helv. V für Traubenzuckerlösungen (ein- und mehrmalige Sterilisation nach f und Sterilisation nach g)

Im vorangegangenen Versuch konnte die Wirksamkeit der Autoklavierung bei 120° während 20 Minuten auch für hochkonzentrierte und massiv mit resistenten Erd-

Tab. 22 Sterilisation von kontaminierten Glukoselösungen steigender Konzentration bei 120° während 20 Minuten in einem einwandigen Kleinautoklaven.

Versuch No.	Glukosekonzentration (Gew. %)	Ergebnis der Sterilitätsprüfung				
		(je 1 Probe zu 1 ml aus je 5 Fl. zu 10 ml kontaminierter Glukoselösung)				
		+ = Wachstum -- = kein Wachstum				
81	Glukose 5%	—	—	—	—	—
82	Glukose 20%	—	—	—	—	—
83	Glukose 35%	—	—	—	—	—
84	Glukose 50%	—	—	—	—	—

sporen kontaminierte Traubenzuckerlösungen nachgewiesen werden. Das erwähnte Sterilisationsverfahren entspricht allerdings nicht genau der Vorschrift der Ph. Helv. V, welche die isotonische Glukoselösung bei 115° während 20 Minuten und Traubenzuckerlösungen anderer Konzentration nach dem allgemeinen Verfahren, d. h. bei 110 - 120° während 15 - 20 Minuten, sterilisieren lässt. Die von uns geprüfte Sterilisationstemperatur von 120° gilt aber wohl in allen Betrieben heute als Norm für die Autoklavierung.

Es blieb noch abzuklären, wie sich das von der Ph. Helv. V angegebene Alternativ-Verfahren, die zweimalige Sterilisation nach f (im strömenden Wasserdampf während 30 Minuten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen), bei der bakteriologischen Ueberprüfung mit resistenten Testsporen bewähren würde. Um ein abgerundetes Bild zu erhalten, wurden zudem die einmalige und die dreimalige Sterilisation nach f in den Versuch einbezogen.

Während von der einmaligen Sterilisation nach f der mit Erdsproren kontaminierten Glukoselösungen von vornherein kein Erfolg erwartet werden durfte, sollte nach dem Prinzip von Tyndall die zweimalige und in noch höherem Masse die dreimalige Sterilisation zur Abtötung aller Keime führen. Glukoselösungen gelten ja als gute Nährböden für das Bakterienwachstum.

Versuchsbedingungen

Der Versuch wurde mit 5 und 20 Vol.%igen Traubenzuckerlösungen vorgenommen.

Die Menge der zur Kontaminierung der Lösung verwendeten Sporenerde wurde auf 0,1% angesetzt, um nicht allzu krass von den normalen Sterilisationsbedingungen der Praxis abzuweichen.

Von jeder Konzentration wurden je 10 ml der kontaminierten Lösungen in 9 Injektionsfläschchen mit Gummiverschluss (Penicillin-Flacons) abgefüllt.

Sterilisiert wurde in einem Egro-Kleinautoklaven bei offenem Dampfahh. Der Temperaturverlauf während des Anwärmens der Lösungen wurde in einem Kontroll-Fläschchen mittels eines Thermo-Elementes verfolgt, was das genaue Einhalten der Sterilisationszeit von 30 Minuten ermöglichte. Die Sterilisation erfolgte nach folgendem Schema:

Erste Sterilisation: Es wurden alle 18 Fläschchen – 9 Stück mit 5%iger und 9 Stück mit 20%iger Lösung – sterilisiert. Je 3 Fläschchen von jeder Konzentration wurden für die Sterilitätsprüfung nach einmaliger Sterilisation nach f ausgeschieden.

Zweite Sterilisation: Nach 24 Stunden wurden die verbliebenen 12 Fläschchen zum zweiten Mal sterilisiert und wiederum je 3 von jeder Konzentration für die Sterilitätsprüfung nach zweimaliger Sterilisation nach f ausgeschieden.

Dritte Sterilisation: Nach 48 Stunden seit der ersten Sterilisation wurden die restlichen 6 Fläschchen zum dritten Mal sterilisiert.

In den Sterilisationsintervallen wurden die Lösungen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Sterilitätsprüfung wurde aus jedem Fläschchen je ca. 1 ml der aufgeschüttelten Erde-Suspension entnommen und zu ca. 10 ml Thioglykolat-Nährbouillon gegeben. Die Röhrchen wurden bei 37° während 20 Tagen bebrütet. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist in Tab. 23 wiedergegeben.

Diskussion des Resultates der Sterilitätsprüfung

Das Resultat der Sterilitätsprüfung, Wachstum in allen beimpften Bouillon-Röhrchen, zeigt eindrucklich die Fragwürdigkeit des Tyndallisation-Verfahrens bei 100°.

Nach der zweiten, besonders aber nach der dritten Sterilisation, ist wohl ein deutlich verzögertes Wachstum der Kulturen festzustellen. Es findet also, entsprechend dem Prinzip von Tyndall, während der Sterilisationsintervalle in den Glukoselösungen eine Umwandlung der sporulierten in die vegetative Bakterien-Form statt. Davon wird aber jeweils nur ein Teil der vorhandenen Dauerformen

Tab. 23 Sterilisation von kontaminierten 5 und 20 Vol.%igen Glukoselösungen durch Tyndallisation im frei strömenden Wasserdampf : 1 mal, 2 mal und 3 mal, an drei aufeinanderfolgenden Tagen, während 30 Minuten bei 99°

Vers. No.	Beobachtung der Kulturen nach der Beimpfung	Ergebnis der Sterilitätsprüfung					
		+ = sehr starkes Wachstum + = deutliches Wachstum (+) = Wachstum fraglich jedes Zeichen entspricht einer Probe zu 1 ml, die aus je einem Fläschchen mit 10 ml kontaminierter, sterilisierter Lösung entnommen wurde.					
		Glukose 5%			Glukose 20%		
		1 mal erhitzt	2 mal erhitzt	3 mal erhitzt	1 mal erhitzt	2 mal erhitzt	3 mal erhitzt
85	1. Tag	+++	+++	(+)(+)(+)	+++	+++	(+)(+)+
	10. Tag	+++	+++	+++	+++	+++	++(+)
	20. Tag	+++	+++	+++	+++	+++	+++

erfasst, so dass die nachfolgende Sterilisation nach f die Keimzahl wohl zu vermindern, nicht aber die Bakterien gesamthaft abzutöten vermag.

Schlussfolgerung

Bei massiv mit resistenten Erds sporen kontaminierten Glukoselösungen führt auch die dreimalige, an drei aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommene Sterilisation nach f nicht zur Sterilität.

- Vergleichende Untersuchung über die thermischen Veränderungen (Verfärbung und pH-Erniedrigung) von Glukoselösungen verschiedener Konzentration bei der einmaligen und zweimaligen Sterilisation nach f (freiströmender Wasserdampf während 30 Minuten) und nach der Sterilisation nach g (120° im gespannten gesättigten Dampf während 20 Minuten)**

Erfahrungsgemäss bleibt der Erfolg auch der wiederholten Sterilisation nach f bei Vorhandensein von resistenten Erds sporen in Glukoselösungen – und diese Möglichkeit kann nie ganz ausgeschlossen werden – weitgehend dem Zufall überlassen. Man kann ja nie wissen, ob alle sporulierten Formen im Sterilisa-

tions-Intervall auskeimen. Darum ist dem Sterilisationsverfahren nach g unbedingt der Vorzug zu geben, falls damit nicht schwerwiegende Nachteile für das Sterilisationsgut verbunden sind. Zur Abklärung dieser Frage wurden nun die Veränderungen von Glukoselösungen verschiedener Konzentration hinsichtlich ihrer Verfärbung und pH-Erniedrigung bei der einmaligen und zweimaligen Sterilisation nach f und bei der Sterilisation nach g untersucht.

Versuchsbedingungen

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde Wert auf die Einheitlichkeit aller Faktoren gelegt, welche die thermischen Veränderungen der Glukoselösungen beeinflussen: Qualität der Glukose und des Lösungswassers, Alkalinität des Flaschenglases, Ausgangs-pH der Lösungen, Höhe und Dauer der Temperatureinwirkung.

Für die Herstellung der Versuchslösungen wurde «Glycosum anhydricum puriss. Sandoz» verwendet. Als Lösungsmittel wurde stets frisch in einer Glasapparatur destilliertes Wasser benutzt. Die Lösungen wurden nach der Filtration ohne Begasung in 100 ml fassende No-Sol-Vit-Flaschen mit Gummiverschluss abgefüllt. Sterilisiert wurde in einem einwandigen Egro-Kleinautoklaven, wobei mittels Thermoelement in einem Kontrollfläschchen für die genaue Einhaltung der Sterilisationstemperatur und der Sterilisationszeit Sorge getragen wurde.

Die Untersuchung wurde mit 5, 20 und 60 Vol.%igen Glukoselösungen vorgenommen. Es wurden folgende Sterilisationsverfahren angewandt:

- einmal im freiströmenden Wasserdampf (99°) während 30 Minuten
- zweimal im freiströmenden Wasserdampf während je 30 Minuten
- einmal bei 120° im Autoklaven während 20 Minuten.

Ergebnis der Untersuchung

a) Farbveränderung von Glukoselösungen verschiedener Konzentration bei verschiedenen Sterilisationsverfahren.

Von blossen Auge konnten die Lösungen (Schichtdicke der betrachteten Lösung = 5 cm) hinsichtlich ihrer «farblichen Eigenschaften» wie folgt charakterisiert werden:

- nach der einmaligen Sterilisation bei 99° während 30 Minuten:
die Lösungen aller drei Konzentrationen (5, 20 und 60 Vol.%) sind farblos; sie können nicht voneinander unterschieden werden.
- nach der zweimaligen Sterilisation bei 99° während 30 Minuten:
die 5- und 20 Vol.%igen Lösungen bleiben unverändert, während bei der 60 Vol.%igen Lösung eine eben wahrnehmbare Verfärbung aufgetreten ist.
- nach der Sterilisation bei 120° während 20 Minuten:
die 5 Vol.%ige Lösung bleibt farblos, die 20 Vol.%ige weist einen sehr leich-

ten Gelbstich auf, während die 60 Vol.%ige deutlich, aber schwach gelblich verfärbt ist.

Um genauere Vergleichswerte der Verfärbungen zu erhalten, wurde der Extinktionskoeffizient der zweimal nach f und der einmal nach g sterilisierten Lösungen mit dem «Zeiss-Opton-Wechsellicht-Photometer» gemessen (Küvette zu 49,95 mm und Filter S 43).

Das Resultat der Messung ist in Tab. 24 wiedergegeben.

Tab. 24 Extinktionskoeffizient von Glukoselösungen verschiedener Konzentration nach Anwendung verschiedener Sterilisationsverfahren (Zeiss-Opton-Wechsellicht-Photometer, Filter S 43)

Versuch No.	Sterilisationsverfahren	Glukoselösungen		
		5 Vol.%	20 Vol.%	60 Vol.%
86	1 mal 99 ⁰ /30 Minuten	nicht messbar	nicht messbar	nicht messbar
87	2 mal 99 ⁰ /30 Minuten	0,020	0,020	0,035
88	1 mal 120 ⁰ /20 Minuten	0,020	0,045	0,065

Diskussion der Resultate

Die isotonische 5%ige Glukoselösung bleibt bei allen angewandten Sterilisationsverfahren (ein- und zweimalige Sterilisation nach f, einmalige nach g) ohne Verfärbung. Bei der 20%igen Lösung bewirkt die ein- und die zweimalige Sterilisation nach f keine Verfärbung, während nach der Sterilisation im Autoklaven bei 120⁰/20 Minuten ein schwacher Gelbstich auftritt. Bei der 60%igen Lösung hinterlässt schon die zweimalige Sterilisation nach f, allerdings fast unmerklich, Spuren, während diejenige nach g solche deutlich sichtbar werden lässt.

b) pH-Veränderung von Glukoselösungen verschiedener Konzentration bei verschiedenen Sterilisationsverfahren.

Die pH-Werte der Glukoselösungen (5, 20 und 60 Vol.%) und vergleichsweise des Lösungswassers wurden vor und nach der Sterilisation (einmal und zweimal bei 99⁰/30 Minuten, einmal bei 120⁰/20 Minuten) mit dem Metrohm pH-Meter, Typ E 196 S, vorgenommen. Die gemessenen Werte sind in Tab. 25 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Die mit nicht ausgekochtem destilliertem Wasser hergestellten 5- und 20%igen Glukoselösungen weisen vor der Sterilisation nahe beieinanderliegende, nur we-

Tab. 25 pH-Werte von Glukoselösungen verschiedener Konzentration und vergleichsweise von destilliertem Wasser vor und nach Anwendung verschiedener Sterilisationsverfahren

Versuch No.	Sterilisationsverfahren	Glukosekonzentration (Vol. %)			
		0 % (H ₂ O)	5 %	20 %	60 %
		pH	pH	pH	pH
89	vor der Sterilisation	5,45	5,50	5,55	5,75
90	1 mal im freiströmenden Wasserdampf während 30 Minuten	5,60	4,65	4,20	4,30
91	2 mal do.	5,70	4,40	4,00	4,05
92	1 mal 120° während 20 Minuten	5,85	4,00	3,85	4,00

nig vom pH des Lösungswassers abweichende Werte (pH ca. 5,5) auf, was auf das im Wasser gelöste CO₂ zurückzuführen ist. Der leicht erhöhte Wert für die 60 Vol.%ige Lösung ist darauf zurückzuführen, dass diese unter Erwärmen hergestellt wurde, was eine teilweise Entfernung der gelösten Kohlensäure zur Folge hatte.

Zu den nach Anwendung der verschiedenen Sterilisationsverfahren erhaltenen pH-Werten ist zu bemerken:

- Die leichte Verschiebung des pH des reinen destillierten Wassers nach der alkalischen Seite hin geht zurück auf CO₂-Verluste durch den Gummiverschluss hindurch.
- Die pH-Messung in den sterilisierten Traubenzuckerlösungen bestätigen die Resultate der früheren Autoren: das pH der 5%igen Lösung sinkt nach der ein- und zweimaligen Sterilisation nach f deutlich weniger tief ab als dasjenige der 20- und 60%igen Lösungen, deren pH-Werte bei den jeweilig angewandten Sterilisationsverfahren sich sehr nahe kommen. Nach der Sterilisation nach g erniedrigt sich auch das pH der 5%igen Lösung auf ähnliche Werte wie jene der beiden andern Konzentrationen.

Schlussfolgerung

Der Vorteil der einmaligen und zweimaligen Sterilisation bei 100° während 30 Minuten gegenüber derjenigen bei 120° während 20 Minuten ist in Bezug auf Verfärbung und auf pH-Veränderung als gering zu bewerten.

Nach den Ergebnissen der ausgeführten Versuche (bakteriologische Ueberprüfung mit resistenten Testsporen und Untersuchung über die thermische Veränderung) fällt der Vergleich der Sterilisationsvorschriften der Ph. Helv. V für Traubenzuckerlösungen eindeutig zugunsten des Verfahrens g (120° während 20 Minuten im Autoklaven) aus. Die Tatsache, dass dieses Verfahren allein die Sterilität der Lösung gewährleistet, wiegt bei weitem die damit verbundenen, übrigens eher geringfügigen Nachteile auf. Die Sterilisationsvorschrift der Ph. Helv. VI für Glukoselösungen sollte darum in dem Sinne abgeändert und vereinheitlicht werden, dass nur noch die Sterilisation nach g als zulässig erklärt wird.

4. Vermeidung der Verfärbung und Korrektur des pH von sterilisierten Glukoselösungen

Vermeidung der Verfärbung

Die Verfärbung selbst hochkonzentrierter Glukoselösungen (bis 60 Vol.%) ist auch bei der Sterilisation nach g (120°/20 Minuten) gering, wenn bei deren Herstellung und Sterilisation auf folgende Punkte geachtet wird:

- Verwendung von einwandfreiem Traubenzucker (Glycos. anhydric. puriss.)
- Abfüllung der Lösungen in Flaschen von guter Glasqualität.
- Sorgfältige Sterilisation, wobei vor allem die Anwärme- und Abkühlzeiten so kurz wie möglich gehalten werden müssen. Lösungen mit hohem Traubenzuckergehalt (über 20%) sollen möglichst in einwandigen Kleinautoklaven sterilisiert werden, in denen die Sterilisationstemperatur schneller erreicht wird und auch die Abkühlung nach der Sterilisation rascher vor sich geht, oder es sind Autoklaven zu benützen, bei denen der heisse Dampf sofort nach beendeter Sterilisation durch kalte Luft unter Druck ersetzt wird.

Von andern Massnahmen, wie Einstellen der Lösung auf pH 3 durch Zusatz von Salzsäure, sei eher abzuraten, weil damit das wahrscheinlich grössere Uebel des tiefenpH-Wertes gegen das kleinere der schwachen Verfärbung eingetauscht wird.

Korrektur des pH von sterilisierten Glukoselösungen

Zur Vorbeugung der pH-Erniedrigung wurde von *Steiger und Bergmann*²⁶ ein Zusatz von 0,03% Natriumbikarbonat zu den Glukoselösungen vorgeschlagen. Damit wird aber der pH-Erniedrigung nur in beschränktem Ausmass entgegengewirkt und die Verfärbung der Lösungen nach *Hager*²⁵, *Webb*³¹ u. a. katalytisch gefördert.

EIGENE VERSUCHE

Titration der sauren Abbauprodukte in nach g sterilisierten Traubenzuckerlösungen

a) *Titration mit 0,01 n-Na OH auf pH 7,2*

Die Versuche wurden mit 5, 20 und 60 Vol.%igen Traubenzuckerlösungen sowie vergleichsweise mit dem Lösungswasser allein ausgeführt. Sterilisiert

wurde in einem Kleinautoklaven bei 120° während 20 Minuten (Temperaturkontrolle mit Thermolement).

Die pH-Bestimmung des Lösungswassers und der Glukoselösungen vor und nach der Sterilisation wie auch die Ermittlung des End-pH der Titration erfolgten elektrometrisch.

Das Wasser und die Glukoselösungen wurden bis zu pH 7,2 (Blut-pH) titriert.

Ergebnis der Untersuchung

Die Resultate der pH-Messungen und der Titration sind in Tab. 26 wiedergegeben.

Tab. 26 pH-Werte und Titration mit 0,01 n-NaOH auf pH 7,2 von nicht sterilisierten und von nach g (120°/20 Min.) sterilisierten Traubenzuckerlösungen verschiedener Konzentration (5, 20 und 60 Vol. %) sowie des Lösungswassers

Versuch No.	Lösungswasser und Glukoselösungen	pH vor der Sterilisation	verbrauchte ml 0,01 n-NaOH um 50 ml nicht sterilisiertes Wasser bzw. Glukoselösung auf pH 7,2 einzustellen	pH des nicht neutralisierten Wassers u. der nicht neutralisiert. Glukoselösung nach der Sterilisation	verbrauchte ml 0,01 n-NaOH um 50 ml Wasser, bzw. Glukoselösung nach der Sterilisation auf pH 7,2 einzustellen
93	Aqua dest.	5,05	0,85 ml	5,60	0,75 ml
94	Glukose 5%	5,15	0,85 ml	4,05	1,50 ml
95	Glukose 20%	5,30	0,90 ml	3,95	1,65 ml
96	Glukose 60%	5,60	0,90 ml	4,00	1,50 ml

Diskussion der Resultate

Der Verbrauch an 0,01 n - NaOH, um die erhitzten Glukoselösungen auf pH 7,2 einzustellen, ist gering: ca. 3 ml für 100 ml Lösung. Annähernd die Hälfte der verbrauchten Lauge ist für die Neutralisation der im Wasser und in den Traubenzuckerlösungen vorhandenen Kohlensäure erforderlich, wie die Differenzen des Laugenverbrauchs für die Neutralisation des reinen Wassers und der nicht sterilisierten Traubenzuckerlösungen beweisen. Die benötigte Menge NaOH ist von der Glukosekonzentration fast unabhängig.

b) Neutralisation mit Natriumbikarbonat

Da im Blut die Neutralisation der parenteral verabreichten «sauren Infusionslösungen» wenigstens z. T. auf einer Reaktion mit Natriumbikarbonat beruht, wurde auch noch versucht, die Glukoselösungen sowie das Lösungswasser vor und nach der Sterilisation mit Natriumbikarbonat auf pH 7,2 zu bringen. Als Reagens wurde eine frisch hergestellte 1%ige Natriumbikarbonat-Lösung (pH 8,05) verwendet.

Von einer eigentlichen Titration kann hier allerdings kaum die Rede sein, denn die Neutralisation des kohlenensäurehaltigen Wassers und der «sauren Glukoselösungen» mit der 1%igen Natriumbikarbonatlösung verläuft, mehr noch als diejenige mit der 0,01 n-Natronlauge, wegen der Puffereigenschaften des Reaktionsgemisches sehr schleppend.

Ergebnis der Untersuchung

Die wiederholte Ausführung der Titration ergab keine genau übereinstimmenden Resultate. Die Ergebnisse, die in Tab. 27 wiedergegeben werden, sind als Durchschnittswerte aufzufassen.

Tab. 27 pH-Werte und Titration mit NaHCO_3 1% auf pH 7,2 von nicht sterilisierten und von nach g (120⁰/20 Min.) sterilisierten Traubenzuckerlösungen verschiedener Konzentration (5, 20 und 60 Vol. %) sowie des Lösungswassers

Versuch No.	Lösungswasser und Glukoselösungen	pH vor der Sterilisation	verbrauchte ml NaHCO_3 1%, um 50 ml nicht sterilisiertes Wasser bzw. nicht sterilisierte Glukoselösung auf pH 7,2 einzustellen	pH von nicht neutralisiertem Wasser u. nicht neutralis. Glukoselösung nach der Sterilisation	verbrauchte ml NaHCO_3 1%, um 50 ml sterilisiertes Wasser, bzw. sterilisierte Glukoselösung auf pH 7,2 einzustellen
97	Aqua dest.	5,35	0,30 ml	5,55	0,35 ml
98	Glukose 5%	5,65	0,35 ml	4,10	0,95 ml
99	Glukose 20%	5,55	0,40 ml	3,975	1,10 ml
100	Glukose 60%	5,90	0,40 ml	4,10	1,15 ml

Diskussion der Resultate

Die mit der 1%igen Natriumbikarbonatlösung ermittelten Titrationswerte sind mit Vorsicht zu interpretieren. Sie bestätigen immerhin die bei der Titration mit der 0,01 n-Natronlauge gemachte Feststellung, dass die Mengen der bei der Sterilisation entstandenen sauren Abbaustoffe in den Glukoselösungen gering sind: sie erfordern rund 2 ml der 1%igen Lösung, also ca. 0,02 g NaHCO_3 pro 100 ml Glukoselösung. Wenn man bedenkt, dass bei azidotischen Zuständen 5%ige Natriumbikarbonat-Infusionen in Mengen von 500 ml verabreicht werden, was 25 g NaHCO_3 entspricht, ist die zur Neutralisation bzw. Abpufferung der «sauren Glukoselösungen» erforderliche Menge NaHCO_3 als gering einzuschätzen.

Praktische Anwendung der Titrationsversuche

Wie oben dargelegt, ist es nicht möglich, Traubenzuckerlösungen herzustellen, die nach Anwendung eines thermischen Sterilisationsverfahrens annähernd neutral reagieren. Die sauren Abbauprodukte entstehen zwar nur in minimalen Mengen und sind wahrscheinlich in physiologischer Hinsicht im allgemeinen nicht von grossem Nachteil. Sollten aus irgend einem Grund Glukoselösungen von neutralem pH gewünscht werden, kommen für deren Herstellung zwei Methoden in Frage:

- a) Die Keimfiltration der Lösungen.
 - β) Die thermische Sterilisation der Lösungen und nachfolgende Neutralisation derselben unter aseptischen Bedingungen.
- Zu α): Die Keimfiltration ist viel zu umständlich, als dass damit – z. B. in einer Spitalapotheke – das tägliche grosse Fabrikationspensum an sterilen Glukoselösungen bewältigt werden könnte. Dazu kommt, dass die Sterilität der keimfiltrierten Lösungen nicht mit der gleichen Sicherheit garantiert werden kann wie diejenige von autoklavierten Lösungen in hermetisch verschlossenen Flaschen, weil bei der Abfüllung das Risiko der Kontaminierung mit Luftkeimen nie vollständig vermeidbar ist, selbst wenn spezielle Anlagen mit besonderen Schutzeinrichtungen eingesetzt werden.
- Zu β): Als neutralisierendes Reagens scheint das NaHCO_3 am geeignetsten zu sein, weil Bikarbonat-Ionen ohnehin zum physiologischen Blut-Milieu gehören.

Bei der oben beschriebenen Neutralisation von sterilisierten Traubenzuckerlösungen wurde die einigermaßen überraschende Feststellung gemacht, dass die erforderlichen Mengen NaOH und NaHCO_3 relativ wenig vom Glukosegehalt der Lösungen abhängig waren und im Falle der 1%igen Natriumbikarbonatlösung rund 2 ml pro 100 ml, d. h. 20-25 ml pro Liter Glukoselösung betragen. Der Gedanke lag darum nahe, diese Mengen NaHCO_3 – der Einfachheit und der Einheitlichkeit halber wurden sie auf 5 ml einer 5% NaHCO_3 -Lösung pro Liter Traubenzuckerlösung festgesetzt – einer Anzahl

von Glukose-Infusionen verschiedener Konzentration zuzufügen und deren Einfluss auf ihr pH zu untersuchen.

Versuchsbedingungen

Die Untersuchung wurde mit den am häufigsten verordneten 5, 10, 20 und 50 Vol.%igen Lösungen und vergleichsweise auch mit Aqua destillata ausgeführt. Von jeder Konzentration wurden je eine Lösung vor der Sterilisation mit 0,25% NaHCO_3 und je drei – es wurden absichtlich solche mit z. T. abweichendem Ausgangs-pH gewählt – nach der Sterilisation mit 0,25% NaHCO_3 versetzt. Die untersuchten Lösungen stammten aus den normalen Fabrikations-Chargen einer Spitalapotheke. Die Lösungen bis zu 20% Traubenzuckergehalt waren in doppelwandigen Grossautoklaven, die höher konzentrierten Lösungen in einwandigen Kleinautoklaven bei ca. 115-120° während 20 Minuten sterilisiert worden (keine Temperaturmessung mit Thermoelement in den Lösungen).

Ergebnis der Untersuchung

Die Resultate der pH-Messungen mit dem Metrohm-ph-Meter Typ E 196 S sind in Tab. 28 wiedergegeben.

Diskussion der Resultate

Aus den Resultaten geht hervor, dass der Zusatz von 0,25% NaHCO_3 (5 ml einer 5%igen NaHCO_3 -Lösung pro Liter Glukose-Infusion) bei allen untersuchten sterilisierten Glukoselösungen annähernd neutrale pH-Werte ergibt (pH 6,75 - 7,20).

Mit dem gleichen Zusatz von NaHCO_3 vor der Sterilisation erniedrigt sich das pH der Lösungen bei der nachträglichen Autoklavierung (120°/20 Minuten) auf 4,6 - 4,9. Die betreffenden Lösungen erleiden bei der Sterilisation zudem eine stärkere Verfärbung.

Schlussfolgerung

Vorschlag für die Herstellung von Glukoselösungen mit annähernd neutralem pH:

Es wäre sicher übertrieben, in allen Fällen Glukose-Infusionen mit annähernd neutralem pH zu fordern. Manchmal, z. B. bei Patienten, die ohnehin an azidotischen Zuständen leiden oder bei denen die Infusionen während langer Zeit gegeben werden, mag es aber angezeigt erscheinen, neutralisierte Infusionslösungen zu verabreichen. Die Neutralisation derselben erfolgt dann zweckmässigerweise unmittelbar vor der Infundierung, indem der Lösung eine Ampulle zu 5 ml steriler 5%iger Natriumbikarbonatlösung pro Liter zugesetzt wird.

Tab. 28 Einfluss des Zusatzes von 0,25% NaHCO₃ auf das pH von Glukoselösungen verschiedener Konzentration

Versuch No.	Glukoselösungen bzw. Wasser	pH vor der Sterilisation * mit Zusatz von NaHCO ₃	pH nach der Sterilisation * mit Zusatz von NaHCO ₃ sterilisiert	pH nach Zusatz von 0,25% NaHCO ₃ zu den Lösungen bzw. zum Wasser
101	0 % (Wasser)	5,05	n. sterilis.	7,55
102	5 %	5,05	n. sterilis.	7,55
	5 % + 0,25 % NaHCO ₃	7,50*	4,90*	—
	5 %	5,05	3,90	7,15
	5 %	5,30	4,10	7,15
	5 %	5,55	4,10	7,15
103	10 %	5,05	n. sterilis.	7,60
	10 % + 0,25 % NaHCO ₃	7,50*	4,60*	—
	10 %	5,05	3,80	6,95
	10 %	5,05	4,00	7,20
	10 %	5,35	3,70	6,75
104	20 %	5,30	n. sterilis.	7,35
	20 % + 0,25 % NaHCO ₃	7,70*	4,60*	—
	20 %	5,45	3,95	7,10
	20 %	5,30	3,95	6,95
	20 %	5,35	3,90	7,20
105	50 %	5,25	n. sterilis.	7,25
	50 % + 0,25 % NaHCO ₃	7,25*	4,60*	—
	50 %	5,25	3,90	7,00
	50 %	5,75	4,10	7,10
	50 %	5,75	4,05	7,15

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Das Problem der Sterilisation von Glukoselösungen wurde unter den Gesichtspunkten der Wirksamkeit von verschiedenen thermischen Sterilisationsverfahren (Tyndallisation bei 100° und Autoklavierung bei 120°) und der dabei auftretenden Veränderungen des Traubenzuckers untersucht.

Es konnten folgende Feststellungen gemacht werden:

1. Vom bakteriologischen Standpunkt aus hat sich einzig das Sterilisationsverfahren g (120°/20 Minuten) als genügend erwiesen. Zweimaliges Erhitzen auf 100° während 30 Minuten genügt nicht, um Sterilität zu erreichen.

2. Die Konzentration der Lösungen (bis 50% Traubenzuckergehalt) war ohne Einfluss auf die Abtötung von nativen Erdsپoren bei der Sterilisation nach dem Verfahren g.
3. Die thermischen Veränderungen der Glukoselösungen (Verfärbung und pH-Erniedrigung) sind bei der Sterilisation nach g wohl stärker als bei der zweimaligen Sterilisation nach f, doch ist der Unterschied nicht relevant. Die von Hager²⁵ vorgeschlagene Begasung der Glukose-Infusionslösungen bietet keine so entscheidenden Vorteile, dass sie für die allgemeine Praxis der Spitalapotheken vorgeschrieben werden müsste.
4. Ein einfacher und zweckmässiger Weg, um für Spezialfälle Glukoselösungen von annähernd neutralem pH herzustellen, besteht darin, diesen nach der Sterilisation bzw. unmittelbar vor der Infundierung aseptisch 0,25% Natriumbikarbonat (in Form von 5 ml einer 5%igen Lösung pro Liter Infusion) zuzusetzen. Die zur Abpufferung der sauren Abbaustoffe des Traubenzuckers erforderliche Menge NaHCO_3 ist praktisch unabhängig vom Traubenzuckergehalt der Lösung.

IV. Sterilisation von Pulvern im Autoklaven

Pulverförmige thermostabile Substanzen werden praktisch immer im Trockenschrank sterilisiert. Die für die Ph. Helv. VI vorgesehenen Verfahren der antimikrobiellen Behandlung von Pudern lauten: Erhitzen im Trockenschrank oder Heissluftofen während 30 Minuten bei 180°, während 1½ Stunden bei 160° oder während 4 Stunden bei 140°.

Die Sterilisation von Pulvern im Dampf wird heute wohl kaum mehr in Betracht gezogen und ist auch vielfach nicht durchführbar, weil damit Auflösung, Feuchtwerden oder Klumpenbildung des Gutes verbunden sind. In der Fachliteratur finden sich denn auch wenige Angaben über die Entkeimung von Pulvern im Autoklaven. Eine Ausnahme macht die Dampf-Sterilisation von Talk, die von *Mündel und Baumann*³⁴ experimentell untersucht wurde. Die Autoren konnten nachweisen, dass bei Verwendung von geeigneten Behältern (gelochter Doppelboden mit Watte-Einlage) die halbstündige Einwirkung von gespanntem gesättigtem Dampf von 120° genügt, um Talk bis zu einer Schichthöhe von 10 cm einwandfrei zu sterilisieren. Ueber ähnliche Resultate berichtet *Muntsch*³⁵, dem es gelang, die gleiche Menge Talk, für welche die Trockensterilisation bei 180° eine Betriebszeit von 2 Stunden erforderte, in doppelter Mull-Lage verpackt, innert 15 Minuten bei 120° im gespannten Dampf zu entkeimen. Obwohl die Dampfsterilisation von Pulvern heute als obsolet oder gar als ungeeignet gilt, schien es uns doch der Mühe wert, das alte Problem neu aufzugreifen. Die Autoklavierung weist ja in den Fällen, in denen sie zur Anwendung gelangen kann, gegenüber der Heissluftbehandlung bedeutende Vorteile auf, nicht zuletzt den Vorteil, bei relativ niedriger Temperatur und innert kurzer Zeit wirksam zu sein.

EIGENE VERSUCHE

Problemstellung

Bei der Sterilisation von Pulvern im gespannten Dampf geht es vor allem um die Frage, ob und wie rasch der Dampf die Pulvermasse zu durchdringen ver-

³⁴ Mündel O. und Baumann A., *Der Chirurg*, 11, Heft 10, 1939

³⁵ Muntsch, zit. in Konrich F., *Die bakterielle Keimtötung durch Wärme* S. 113, Stuttgart 1938

mag. Es liegt also ein ähnlich geartetes Problem vor wie bei der Autoklavierung von porösem Material oder von leeren Behältern, das an anderer Stelle dieser Arbeit behandelt wurde (siehe S. 17). Wie dort stellt sich auch hier die Frage, ob die mit der Pulvermasse im Sterilisiergefäß eingeschlossene Luft genügend vom Dampf verdrängt wird oder sich wenigstens in ausreichendem Masse mit ihm vermischt. Bei der nachfolgend beschriebenen Untersuchung wurde darum auch analog der Sterilisation von leeren, offenen Hohlgefäßen vorgegangen. Als Untersuchungsmaterial diente Talk. Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die eine mit Messzylindern, die andere mit normalen Puderstredosen als Talkbehälter.

1. Sterilisation von Talk in Messzylindern

Versuchsbedingungen

Es wurden die gleichen Messzylinder zu 250 ml Inhalt, 30 cm Höhe und 3,5 cm Durchmesser verwendet, die schon in der Untersuchung über die Sterilisation von Hohlgefäßen (siehe S. 29) als Versuchsmaterial gedient hatten. Der bei 105° getrocknete Talkpuder wurde in Mengen von ca. 160 - 165 g in zwei Messzylindern eingefüllt, und zwar in einen «Trockenzylinder» und in einen «Nasszylinder». Dieser enthielt im Gegensatz zu jenem auf dem Grunde ein passendes Wägegöläschen mit 3 ml Wasser. Zwischen dem mit perforiertem Pergamentpapier tektierten Gläschen und dem Talk wurde eine dünne Schicht nicht entfetteter Watte gelegt. Die Talkmassen in beiden Zylindern wurden an folgenden Stellen mit je drei Säckchen zu 50 mg Sporenerde kontaminiert:

- 4 cm über dem Boden, d. h. 26 cm tief
- 17 cm über dem Boden, d. h. 13 cm tief
- 28 cm über dem Boden, d. h. 2 cm tief

Die Säckchen wurden an Fäden aufgehängt, die je nach der Lage im Zylinder anders gefärbt waren und deren Enden über den Zylinderrand gelegt wurden. In den «Trockenzylinder» wurde zudem ein Thermoelement eingeführt und dessen Ende am Messpunkt — 4 cm über dem Boden des Zylinders — zentral in einem gelochten, auf den Querschnitt des Zylinders zugeschnittenen Kartonstück fixiert. Die Sterilisation der mit perforiertem Pergamentpapier tektierten Zylinder erfolgte in einem einwandigen Kleinautoklaven (Egro 32 l) bei 120° während 20 Min., und zwar in einem Versuch ohne Vorevakuierung der Dampfkammer, in einem andern, sonst analog ausgeführten, nach Vorevakuierung derselben, wobei ein Vakuum von ca. 85 mm Hg erreicht wurde.

Ergebnis der Untersuchung

a) Temperaturmessung

Ueber den Wärmegang im freien Raum der Sterilisationskammer und in der Talkmasse des Trockenzylinders bei der Sterilisation ohne Vorevakuierung gibt Tabelle 29 Auskunft:

Tab. 29 Temperaturmessung im freien Dampfraum und in einem Glaszylinder mit Talkpuder bei der Autoklavierung ohne Vorevakuierung.

Sterilisationszeit in Minuten	Temperatur im Dampfraum (Thermometer am Auto- klaven-Deckel)	Temperatur im Talk des Trockenzylinders (Thermoelement)
0	20°	22,5°
5	30°	24°
7	92°	42°
9	99°	61°
11	99°	72°
13	99°	80°
15	114°	89°
17 *	119-120°	97°
19		102°
21		108°
23		112°
25		114°
27		115°
29		116°
31		117°
33 **	119-120°	119-120°
35	119-120°	119-120°

* 119-120° im Dampfraum

** 119-120° im Talk

Die Temperaturmessung bei der Sterilisation in der vorevakuieren Dampf-
kammer ergab ganz ähnliche Resultate, mit dem geringfügigen Unterschied, dass
der Temperaturausgleich (120°) zwischen freiem Dampfraum und Messpunkt
im Talk 12 Min. betrug (im nicht evakuierten Autoklaven waren es 16 Min.).

b) Prüfung auf Sterilität

Zur Sterilitätsprüfung wurden die einzelnen Säckchen, vorerst die oberen, sorg-
fältig aus der Talkmasse gezogen, nach raschem Abschütteln des anhaftenden
Talkes aseptisch von den Trägerfäden getrennt und in Röhrchen mit Thiogly-
kolat-Bouillon fallen gelassen. Das Resultat der zehntägigen Bebrütung bei 37°
ist aus Tabelle 30 ersichtlich.

Tab. 30 Sterilisation von kontaminiertem Talkpuder in Glaszylindern bei 120° während 20 Minuten in einem einwandigen Kleinautoklaven, ohne und nach Vorevakuierung des Autoklaven (85 mm Hg)

Versuch No.	Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, — = kein Wachstum) Kontaminierung: je 9 Säckchen mit 50 mg Sporenerde pro Zylinder											
		3 Säckchen unten			3 Säckchen Mitte			3 Säckchen oben					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3			
	Zylinder mit 3 ml Wasser auf dem Grunde												
106	1. Versuch, ohne Vorevakuierung	+	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
107	2. Versuch, mit Vorevakuierung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Zylinder ohne Wasser												
108	1. Versuch, ohne Vorevakuierung	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
109	2. Versuch, mit Vorevakuierung	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—

* Wachstum erst nach 8 Tagen, Beschaffenheit der Kultur anders als üblich, wahrscheinlich Sekundär-Kontaminierung.

Diskussion der Resultate

Aus den Resultaten der Temperaturmessungen im Sterilisationsgut ist ersichtlich, dass die Durchwärmung der Talkmasse im vorevakuerten Autoklaven wohl etwas beschleunigt wurde. Die Resultate der Sterilitätsprüfung zeigen jedoch, dass dies keinen Einfluss auf die Abtötung der Testsporen hatte. Im vorevakuerten Autoklaven sind sie sogar weniger gut ausgefallen als im nicht vorevakuerten (Versuche No. 108 und 109).

Aus dem Vergleich der Resultate der Sterilitätsprüfung geht eindeutig hervor, dass die für die Keimtötung notwendige Durchdämpfung der Pulvermassen nur in den «Nasszylindern» zustande kam. In den «Trockenzylindern» hingegen konnte der Dampf innert der Sterilisationszeit von 20 Min. die Talk-Säule nur

bis etwa zur Mitte in genügender, für die Testsporen tödlicher Konzentration durchdringen.

Zur Prüfung auf die Durchdämpfung des Talkes war dieser im «Trockenzylinder» zudem mit grösseren Blaugel-Kristallen vermischt worden. Nach der Sterilisation erwies es sich, dass diese im oberen Drittel, bis etwa 10-12 cm tief, rötlich verfärbt worden, im unteren Teil aber blau geblieben waren. Die «rote» Zone entsprach also genau derjenigen, in der die Keime abgetötet wurden, die «blaue» derjenigen, in der die Keimtötung nicht erreicht wurde.

2. Sterilisation von Talk in Puderstreudosen

Nach den zwei Modell-Versuchen mit dem Talk in den Messzylindern wurde noch ein praktischer Versuch in üblichen Puder-Streudosen durchgeführt.

Versuchsbedingungen

Als Behälter für den Talk dienten Blech-Streudosen von 10 cm Höhe und 4 cm Durchmesser mit abnehmbaren Deckeln auf beiden Seiten. Der Versuch wurde mit 6, je ca. 60 g getrockneten Talk enthaltenden Streudosen unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

- a) 2 Streudosen unten verschlossen
- b) 2 Streudosen unten offen bzw. nur mit einem Wattebausch in einem Gazepäckchen verschlossen
- c) 2 Streudosen unten mit einem 2 ml Wasser enthaltenden Wägegläschen verschlossen

Alle Streudosen waren oben offen, d. h. lediglich mit perforiertem Pergamentpapier tektiert. In jeder Streudose wurde die Talkmasse mit 6 Säckchen zu 25 mg Sporenerde kontaminiert, und zwar unten, in der Mitte und oben. Bei der Sterilisation in einem einwandigen Kleinautoklaven bei 120° während 20 Min. wurde der Wärmegang im Talk einer unten verschlossenen Streudose thermoelektrisch verfolgt. Es wurde nur eine Sterilisation ohne Vorevakuierung des Dampftopfes vorgenommen.

Ergebnis der Untersuchung

a) Temperaturmessung

Die Ausgleichszeit (120° im freien Dampfraum und im Talk) betrug ca. 5 Min.

b) Sterilitätsprüfung

Die Resultate der Sterilitätsprüfung, die wie oben bei den Zylindern beschrieben ausgeführt wurde, ist aus Tabelle 31 ersichtlich.

Tab. 31 Sterilisation von kontaminiertem Talkpuder in Streudosen (Höhe: 10,0 cm, Φ : 4 cm) bei 120° während 20 Minuten in einem einwandigen Kleinautoklaven

Versuch No.	Untersuchungsmaterial und Versuchsbedingungen	Ergebnis der Sterilitätsprüfung (+ = Wachstum, - = kein Wachstum)					
		Kontaminierung: je 6 Säckchen mit 25 mg Sporenerde pro Streudose					
		2 Säckchen unten		2 Säckchen Mitte		2 Säckchen oben	
		1	2	1	2	1	2
110	2 Streudosen oben offen, unten verschlossen	---	---	---	---	---	---
111	2 Streudosen oben und unten offen, (Watte in Gazesäckchen als Verschluss)	---	---	---	---	---	---
112	2 Streudosen oben offen, unten ein Gläschen mit 2 ml Wasser	-	+!	---	---	---	---

Diskussion der Resultate

Der einzige Fall von Wachstum in einem Bouillonröhrchen ist sehr wahrscheinlich einer Sekundär-Kontamination zuzuschreiben, um so mehr, als das in Frage kommende Säckchen aus einer Streudose mit Wasser auf dem Grunde stammte. Von diesem Versager abgesehen, geht aus dem Ergebnis der Sterilitätsprüfung hervor, dass der Dampf innert der Sterilisationszeit von 20 Min. die Talkmasse unter allen Versuchsbedingungen, also auch in den unten verschlossenen Behältern, bis auf den Grund, also 10 cm tief, in genügender Konzentration zu durchdringen vermochte. Dieses Resultat steht im Einklang mit jenem, das in den trockenen Glaszylindern erzielt wurde, wo die Testkeime ebenfalls bis zu einer Tiefe von etwa 13 cm, wenigstens teilweise, abgetötet werden konnten. Es sei noch nachgetragen, dass der Talk nach der Dampfbehandlung durchaus brauchbar war, sich trocken anfühlte und sich gut streuen liess.

Schlussfolgerung

Talk und eventuell andere, nicht wasserlösliche Pulver können in geeigneten Gefäßen im Autoklaven sterilisiert werden. Wichtig ist, dass sie in nicht zu dicker Schicht (weniger als 10 cm) dem Dampf ausgesetzt werden.

Anzuraten sind Behälter mit gelochtem Boden, wie sie von *Mündel und Baumann* beschrieben wurden³⁴.

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Das Problem der Sterilisation von wasserunlöslichen Pulvern im Autoklaven bei 120° während 20 Minuten wurde am Beispiel von Talk untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass das Verfahren anwendbar ist – beigemischte Testsporen wurden abgetötet und der Talk blieb trocken – wenn der Dampf ungehindert in die Pulvermasse eindringen kann und wenn deren Schichtdicke nicht mehr als 10 cm beträgt.

V. Sterilisation mit 61 Gew.-%igem Alkohol

*Bang und Torstensen Dalsgaard*³⁶ haben nachgewiesen, dass mit 61. Gew.-%igem Alkohol bei 100° innerhalb einer Stunde hochresistente Erds sporen abgetötet werden können. Zur Prüfung der Sterilisierfähigkeit von Aethyl-Alkohol erhitzen die Autoren eine Aufschwemmung von 5 g Erde in 15 g Alkohol verschiedener Konzentrationen bei 100° in hermetisch verschlossenen Gefässen (Penicillin-Fläschchen mit Gummiverschluss). Die Resultate ihrer Untersuchungen lauten:

Gew. % Alkohol	Kürzeste Sterilisationsdauer, innert welcher alle Keime abgetötet wurden
0% (Wasser)	30 Stunden
30%	4 Stunden
50%	85 Minuten
61%	60 Minuten
70%	85 Minuten
86%	18 Stunden
93%	nach 24 Stunden noch nicht steril
99,5%	nach 24 Stunden noch nicht steril

Der 61 Gew.-%ige Alkohol erwies sich somit als am stärksten wirksam, indem er in der kürzesten Zeit (60 Minuten) hochresistente Erds sporen abtötete.

Als praktische Anwendungen der Sterilisation mit 61 Gew.-%igem Alkohol geben die Autoren die Entkeimung von Laminarienstiften, Prokainhydrochlorid und Borsäurepulver sowie, in einer späteren Arbeit³⁷, von medizinischer Kohle an. Die Sterilisation der Pulver wurde folgendermassen vorgenommen: die Substanzen wurden in einer Glasschale reichlich mit 61 Gew.-%igem Alkohol bedeckt, die Schale in ein Sterilisierglas gelegt, das selber wieder 61 Gew.-%igen Alkohol enthielt, und das Ganze durch Einstellen in kochendes Wasser erhitzt. Nach der Sterilisation wurden die Pulver in einem Trockenschrank unter aseptischen Kautelen getrocknet.

³⁶ Bang O. und Torstensen Dalsgaard A., *Archiv for Pharmaci og Chemi* 55, 699 (1948), ref. *Schweiz. Apoth. Ztg.* 87, 598 (1949).

³⁷ Torstensen Dalsgaard A. und Bang O., *Svensk farm. Tidskr.* 55, 557 (1951), ref. *Schweiz. Apoth. Ztg.* 90, 807 (1952).

EIGENE VERSUCHE

1. Sterilisation von pulverförmigen Substanzen in 61 Gew.%igem Alkohol bei 100° während 1 Stunde

Versuchsbedingungen

Die Herstellung des 61 Gew.%igen Alkohols erfolgte durch Verdünnen des käuflichen, konzentrierten Alkohols ($d=0,8124$, entsprechend 93,9 Gew.% Alkohol) mit Wasser (verdünnter Alkohol: $d=0,8938$, entsprechend 60,9 Gew.% Alkohol). Von diesem verdünnten Alkohol wurden 1,5 Liter in einen grösseren, elektrisch heizbaren einwandigen Autoklaven eingefüllt.

Der Sterilisationsversuch wurde mit Prokainhydrochlorid, Borsäure- und Kohlepulver in Mengen von je 5 g ausgeführt. Die Substanzen wurden in kleine Porzellanschalen gegeben, je mit einer Messerspitze einer nicht näher untersuchten Erde aus einem Blumentopf* kontaminiert und mit 61 Gew.%igem Alkohol übergossen und vermischt. Die Schälchen mit den kontaminierten Pulvern wurden in eine geräumige Kristallisierschale mit Ueberfalldeckel gelegt, in diese 250 ml 61 Gew.%iger Alkohol eingefüllt und das Ganze in den Autoklaven gestellt. Bei geschlossenem Dampfahh, um Alkoholverluste zu vermeiden, wurde auf 100° aufgeheizt. Bei dieser Temperatur zeigte das Manometer einen Druck von 1,05 atü an, der aber im Laufe des einstündigen Erhitzens auf 0,65 atü sank, weil trotz sorgfältiger Abdichtung des Autoklaven, wie auch bereits schon während des Aufheizens, fortlaufend Verluste an Alkoholdämpfen festzustellen waren. *Bang und Torstensen Dalsgaard* haben bei ihren Versuchen einen maximalen Druck von 1,5 atü gemessen. Nach dem Trocknen der Pulver bei ca. 100° in einem vorher sterilisierten Trockenschrank, laut Angaben der dänischen Autoren, präsentierte sich einzig das Kohlepulver in einem annehmbaren Zustand, während sich das Prokainhydrochlorid und die Borsäure zu einem Klumpen zusammengeballt hatten.

Die Alkoholverluste während der Sterilisation waren sehr gross, blieben doch von den in den Autoklaven eingefüllten 1,5 l nur 400 ml und von den in die Schale eingefüllten 250 ml nur 140 ml übrig. Die Bestimmung des spez. Gewichtes dieser 140 ml Alkohol-Wassermischung ergab den Wert von 0,9128, entsprechend einem Alkoholgehalt von 52 Gew.%.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Die mit reichlichen Proben von jedem «Pulver» vorgenommene Sterilitätsprüfung bei 37° in Pepton-Glukose-Bouillon ergab in allen Fällen Nicht-Wachstum.

* Für diesen Versuch stand die sonst in allen anderen Sterilisationsversuchen verwendete geprüfte Sporenerde noch nicht zur Verfügung.

2. Erhitzen von 61 Gew.%igem Alkohol in einem Einmachglas mit Gummidichtung und Bügelverschluss

Der eben beschriebene Versuch hatte gezeigt, dass ein Autoklav schwerlich so dicht verschlossen werden kann, dass keine Alkoholverluste beim Erhitzen auf 100° eintreten können. In einem Leer-Versuch (ohne Sterilisationsmaterial) wurde daher noch untersucht, ob ein gewöhnliches Einmachglas mit Gummidichtung und Bügelverschluss für die Sterilisation mit 61 Gew.%igem Alkohol geeigneter sei. Ein grünes, 500 ml fassendes Einmach-Weithalsglas wurde mit 300 ml 61 Gew.%igem Alkohol gefüllt und im strömenden Wasserdampf während 45 Minuten erhitzt. Das Glas hielt die Sterilisation aus, und es konnten folgende Feststellungen gemacht werden:

- a) Von den eingefüllten 300 ml Alkohol verblieben nach der Sterilisation 240 ml in der Flasche.
- b) Das spez. Gewicht des Alkohols betrug 0,9004, entsprechend 58,1 Gew. % Alkohol.

3. Sterilisationsversuche mit 61 Gew.%igem Alkohol in Blutplasma-Flaschen mit Spezial-Gummiverschluss

Um die Alkoholverluste während des Erhitzens möglichst auszuschalten und die Frage der Sterilisierfähigkeit des 61 Gew.%igen Alkohols wenigstens theoretisch abzuklären, wurden als Sterilisiergefäße Blutplasma-Flaschen zu 400 ml Inhalt mit Spezial-Gummizapfen (s. Abb. VIII) verwendet. Diese Gummizapfen

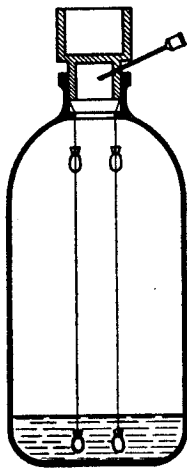


Abb. VIII. Blutplasmaflasche, evakuierbar, mit Testerde in eingehängten Stoffsäcken. Die Nadel zeigt die Einstichstelle für die Evakuierung an der Wasserstrahlpumpe.

ermöglichen die Evakuierung der Flaschen. Zu diesem Zwecke wird der Zapfen nur halb in den Flaschenhals gestopft und eine, durch einen Druckschlauch mit einer Wasserstrahlpumpe verbundene, dicke Injektionsnadel seitlich durch den

Zapfen hindurch gestossen. Nach der Evakuierung wird die Nadel rasch herausgezogen und gleichzeitig der Zapfen ganz in den Flaschenhals gedrückt. Dank diesen Flaschen war es möglich, die Frage der Abtötung von resistenten Erds sporen in 61 Gew.%igem Alkohol und vergleichsweise in anderen Medien auf elegante Art abzuklären.

Versuchsbedingungen

Die Blutplasma-Flaschen wurden teils mit je 50 ml der in Tab. 32 angegebenen Spiritus/Wasser-Mischungen bzw. mit je 50 ml Wasser versetzt, teils leer gelassen.

Die trockene, fein pulverisierte geprüfte Testerde wurde in Mengen von 50 mg in Stoffsäckchen verpackt und diese mit starken Fäden am unteren Teil des Gummizapfens befestigt. Die Länge der Fäden wurde so bemessen, dass die Säckchen in einigen Flaschen im Luftraum, in den anderen dagegen in der Flüssigkeit hingen (s. Abb. VIII).

Ein Teil der Flaschen wurde, wie oben beschrieben und aus der Abb. VIII ersichtlich, an einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, wobei ein Vakuum von ca. 40 mm Hg erreicht wurde (der 30 Gew.%ige Alkohol beginnt bei diesem Unterdruck zu sieden). Die über den Flaschenhals gestülpten Gummizapfen wurden mit einem Stück Draht fixiert. Die Sterilisation der Versuchsflaschen wurde in einem einwandigen Kleinautoklaven bei offenem Dampfahn vorgenommen, wobei die Temperatur in einer 50 ml Wasser enthaltenden Flasche mit einem Thermoelement gemessen wurde.

Die Sterilisationstemperatur von ca. 98° wurde während genau 60 Minuten eingehalten. Weder in den evakuierten noch in den nicht evakuierten Flaschen konnten Alkohol-Verluste festgestellt werden.

Sterilitätsprüfung und deren Ergebnis

Zur Prüfung auf Sterilität wurden die Fäden mit den Säckchen vom Gummizapfen abgetrennt und die einzelnen Säckchen, durch Versengen des Trägerfadens in einer Gasflamme, in Röhrchen mit Thioglykolat-Bouillon fallen gelassen. Die beimpften Bouillon-Röhrchen wurden während 10 Tagen bei 37° bebrütet. Das Resultat der Sterilitätsprüfung ist aus Tab. 32 ersichtlich.

Diskussion der Resultate

Von den Resultaten ist zunächst zu sagen, dass sie die Befunde von *Bang und Torstensen Dalsgaard* bestätigen, wonach resistente Erds sporen in 61 Gew.%igem Alkohol bei annähernd 100° innert 1 Stunde abgetötet werden. Es konnte zudem der Beweis erbracht werden, dass die Abtötung der Sporen nicht nur im 61 Gew.%igen Alkohol selbst, sondern auch in dessen Dämpfen zustande kommt.

Die Evakuierung der Flaschen vor der Sterilisation erwies sich als nutzlos; die

Tab. 32 Sterilisation von resistenten Erdsproren bei 98° während einer Stunde in einem hermetisch geschlossenen, evakuierbaren Gefäß (Blutplasma-Flasche zu 400 ml): ohne Inhalt, mit 50 ml Wasser, mit je 50 ml Alkohol verschiedener Konzentration

Vers. No.	Flascheninhalt	Vorevakuierung (ca. 40 mm Hg)	Kontaminierung: Säckchen mit 50 mg Sporenerde (S.)	Ergebnis der Sterilitätsprüfung + = Wachstum - = kein Wachstum
113	Luft	nein	2 S. im Luftraum hängend	++
114	Luft	ja	2 S. im Luftraum hängend	++
115	destilliertes Wasser	nein	2 S. im Luft- bzw. Dampfraum hängend 2 S. im Wasser	++ ++
116	destilliertes Wasser	ja	4 S. im Luft- bzw. Dampfraum hängend 4 S. im Wasser	++++ ++++
117	Spiritus 94 Gew.%	nein	2 S. im Luft- bzw. Alkoholdampfraum hängend 4 S. im Alkohol	++ ++++
118	Spiritus 94 Gew.%	ja	4 S. im Luft- bzw. Alkoholdampfraum hängend 2 S. im Alkohol	++++ ++
119	Spiritus 61 Gew.%	nein	6 S. im Luft- bzw. Alkoholdampfraum hängend 4 S. im Alkohol	----- -----
120	Spiritus 61 Gew.%	ja	6 S. im Luft- bzw. Alkoholdampfraum hängend 6 S. im Alkohol	----- -----
121	Spiritus 30 Gew.%	nein	2 S. im Luft- bzw. Alkoholdampfraum hängend 2 S. im Alkohol	+ - ++
122	Spiritus 30 Gew.%	ja	2 S. im Luft- bzw. Alkoholdampfraum hängend 2 S. im Alkohol	+ ++ ++

Luftbeimischung zu den Dämpfen des 61 Gew.%igen Alkohols ist ohne Einfluss auf deren bakterizide Wirkung.

Schlussfolgerung

Sowohl der 61 Gew.%ige Alkohol als auch dessen Dämpfe vermögen resistente Sporen bei ca. 100⁰ innert 1 Stunde abzutöten. Dieses Sterilisationsverfahren eignet sich allerdings nicht gut für alkohollösliche Pulver, weil diese dabei zerfließen oder sich zusammenballen. Es kann aber in Spezialfällen, bei denen Temperaturen über 100⁰ nicht in Frage kommen, gute Dienste leisten.

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Die Sterilisierfähigkeit des 61 Gew.%igen Alkohols bei 100⁰ wurde an resistenten Erdsporen erprobt und konnte bestätigt werden.

VI. Prüfung einiger Filtermaterialien aus Metall- und Plastikwerkstoffen auf Keimdichtigkeit und Fremdstoffabgabe an das Filtrat

Keimfilter und Keimfiltration

Die Anfänge der Keimfiltration gehen auf das Jahr 1871 zurück, als *Klebs* und *Tiegel* ihre Filtrationsversuche mit «Toncylindern» ausführten. *Pasteur* benutzte in der Folge Gips als Filtermaterial und sein Schüler *Chamberland* eine Porzellanmasse (Chamberland-Kerze), *Nordmeyer* verwendete Filter aus gebrannter Infusorienerde, die später als *Berkefeld*-Filter bekannt wurden. 1915 wurde die fabrikmässige Herstellung von Asbest-Filtern (*Seitz*) aufgenommen. Es folgten die Filtermembranen aus Zellulosederivaten nach *Zsigmondy*. Die *Jenaer*-Glaswerke, die seit 1923 Glasfilter herstellen, brachten 1935 das erste brauchbare bakteriendichte Glasfilter auf den Markt³⁸. 1938 wurden erstmals von *Schlecht* und *Tragesser* gesinterte Metallfilter hergestellt, wobei Nickelcarbonylpulver als Ausgangsstoff diente³⁹. Es war zu erwarten, dass die Plastik-Industrie, die auf so vielen Anwendungsgebieten in erfolgreiche Konkurrenz zur Industrie der herkömmlichen Werkstoffe getreten ist, auch auf dem Gebiet der Filtrationstechnik nicht zurückbleiben würde. Für gewöhnliche Filtrationszwecke (nicht Keimfiltration) finden Filter aus verschiedenen Kunststoffen (Polyamid, Polyvinylchlorid, Polyvinylidenchlorid, Polyacrylnitril, Polyester, Polyäthylen, Polyvinylalkohol, Polytetrafluoraethylen) ausgedehnte Verwendung. Vorläufig scheint es allerdings, dass die industrielle Herstellung von eigentlichen Keimfiltern aus Plastikwerkstoffen noch im Entwicklungsstadium steckt.

Von den oben aufgezählten Filtermaterialien kommen heute für die Keimfiltration von Arzneilösungen, soweit dies wenigstens die Apotheken und speziell die Spitalapotheken betrifft, fast ausschliesslich Membran-, Asbest- und Glasfilter zur Anwendung. Ein jedes dieser Filtermaterialien hat seine Vorzüge und Nachteile. Es mag darum angezeigt sein, vergleichsweise kurz darauf einzugehen, bevor zum eigentlichen Thema dieses Kapitels, der experimentellen Abklärung der

³⁸ Knöll H., Ueber Bakterienfiltration (Sonderabdruck aus: Ergebnisse der Hyg. Bakt. Immunitätsforschung u. experim. Therapie 24. Band, Springer, Berlin 1941.

³⁹ Agte C. und Ocetek K., Metallfilter, ihre Herstellung, ihre Eigenschaften u. ihre Anwendung, Berlin 1957.

Brauchbarkeit von Filtern aus Metall- und Plastikwerkstoffen im Apothekenbetrieb, übergegangen wird.

*Membranfilter**

Die Membranfilter – es ist hier von den Membranfiltern der *Membranfiltergesellschaft Göttingen* die Rede – stellen Xerokolloide dar, deren Gerüstsubstanz aus Cellulose-Estern (Cellulose-Nitrat und Acetat) bzw. Cellulose besteht. Die Filtration beruht vorwiegend auf einer Siebwirkung.

Es sind verschiedene Membranfilter-Sorten auf dem Markt, die, nach ihrer Durchlässigkeit eingestuft, die Bezeichnungen «grob», «mittel», «fein» und «feinst» tragen. Die Filter der Stufe «mittel» mit einem Porendurchmesser von Maximalwerten zwischen 300–450 μ (Mittelwerte 200–275 μ) dienen zur Entkeimung von Lösungen (bakterien- jedoch nicht virusdicht).

Die Membranfilter eignen sich für die Filtration von wässrigen Lösungen, die Cellafilter nach *Zsigmondy - Kratz* hingegen auch für die Filtration gewisser organischer Lösungen.

Die Membranfilterschichten sind mechanisch schwach, was besondere Sorgfalt bei der Aufbewahrung, beim Einspannen in das Filtrationsgerät und bei der Sterilisation erheischt. Die Membranfilterschichten «Schleicher und Schüll», die auf Karton aufgezogen sind, erweisen sich in dieser Hinsicht als weniger gefährdet.

Was die Sterilisation dieser Filtermaterialien anbelangt, muss unterschieden werden zwischen eigentlichen Membranfiltern (Trockenfiltern) und Cella-, Ultracella- und Ultrafeinfiltern (Feuchtfiltern).

Für die Membran-Trockenfilter kommen nach Angaben der Herstellerfirma folgende Sterilisations- bzw. Aufbewahrungsverfahren in Betracht:

1. Die im Filtrierapparat eingespannten Filter können im Autoklaven 30 Minuten lang bei 110–120° sterilisiert werden. Die Hitzebehandlung verändert allerdings leicht die Porosität, indem das Filtermaterial etwas durchlässiger wird. Beim Anfeuchten nehmen die Filter jedoch ihren ursprünglichen Quellungszustand und ihre ursprüngliche Porosität wieder ein. Es ist aber anzuraten, die Filter etwa eine Viertelstunde lang mit destilliertem, keimfreiem Wasser bedeckt, ohne Anwendung eines Vakuums oder Druckes, stehen zu lassen, bevor man mit der Filtration beginnt.
2. Das Filtriergerät und das Membranfilter werden separat sterilisiert, das erstere im Trockenschrank bei 160° während 2 Stunden oder im Autoklaven bei 120° während 30 Minuten, das letztere durch zweimaliges Kochen in destilliertem Wasser während 20 Minuten.

* Die Angaben sind grösstenteils Prospekten der Membranfilter-Gesellschaft, Sartorius-Werke AG, Göttingen, entnommen.

3. Das Filtriergerät und das Filter werden in 1%iger wässriger Nipagin-Lösung aufbewahrt.
4. Das gesamte Keimfiltergerät wird in einer dicht abgeschlossenen Kammer mit Aethylenoxyd oder SO₂ behandelt.

Die Feuchtfiler dagegen müssen sofort nach Erhalt aus der Verpackung genommen und in einem Desinfektionsmittel (2%ige Formalinlösung oder 1%ige Nipaginlösung) aufbewahrt werden. Sie werden vor Gebrauch ins Gerät eingespannt und im Autoklaven bei 110° sterilisiert. Vor der Filtration muss der Apparat mit destilliertem Wasser gut vorgespült werden.

Zu den erwähnten Sterilisationsmethoden ist zu sagen, dass die Autoklavierung als sicherstes Verfahren den Vorzug verdient.

*Asbest-Keimfilter**

Die Asbest-Keimfilter (*Filtrox*-Sterilfilter, *Seitz-EK*-Schichten = Entkeimungsschichten) bestehen aus Asbest- und Cellulosefasern, die zu Platten zusammengepresst wurden.

Der Filtrationsvorgang beruht nicht so sehr auf einer Sieb- als vielmehr auf einer Adsorptionswirkung. Es werden nicht nur Mikroorganismen und andere Schwebeteilchen von einer bestimmten Grössenordnung an aus der Lösung abgetrennt, sondern auch kleinste Partikelchen adsorbiert. Aus diesem Grunde können bis zur Absättigung der Adsorptionsoberfläche auch Wirkstoffe zurückgehalten, bzw. der Lösung entzogen werden, was bei sehr verdünnten Lösungen, z. B. alkaloidhaltigen, anteilmässig erhebliche Verluste an Wirkstoffen bewirken kann. Dank der nämlichen Eigenschaft ist es möglich, durch EK-Filter nicht nur keimfrei, sondern auch pyrogenfrei zu filtrieren⁴⁰.

Die Firma *Seitz* stellt vier Sorten von Entkeimungsschichten mit verschiedenen Durchlässigkeiten her:

EK-Schicht	: 0,7 – 0,9 μ	grösster fiktiver Porendurchmesser
EKS-Schicht	: 0,6 – 0,7 μ	grösster fiktiver Porendurchmesser
EKS-Schicht	: 0,5 – 0,6 μ	grösster fiktiver Porendurchmesser
EKS-II-Schicht	: 0,4 – 0,5 μ	grösster fiktiver Porendurchmesser

Man kann bei den Asbestfiltern nicht von Poren im eigentlichen Sinne sprechen. Es handelt sich vielmehr um ein Gewirr von gewundenen und verästelten Kanälen, deren Querschnitt oft wechselt. Um sichere Resultate geben zu können, müssen die Asbestfilter nicht nur eine bestimmte Dichte des Fasermaterials, sondern auch eine bestimmte Dicke der Filterschicht aufweisen. Bei der Verwendung von Asbest-EK-Filtern muss auf folgende Punkte geachtet werden:

* Die Angaben stammen grösstenteils aus Prospekten der Seitz-Werke, Kreuznach (RHLD)
⁴⁰ Wilke H. u. Voss H. E., *Arzeim. Forsch.* 4, 8-14 (1954).

1. Abgabe von Fasern: Um schwebestoff-freie Filtrate zu erhalten, muss dem eigentlichen Keimfilter ein gehärtetes Papierfilter unterlegt oder ein Glassinterfilter nachgeschaltet werden.
2. Abgabe von Alkali und verschiedenen Ionen (Ca, Mg, Fe): Die Asbestkeimfilter müssen wegen des Kationengehaltes unmittelbar vor der Keimfiltration ionenfrei gewaschen werden. Für manche Lösung, wie z. B. für PAS-Infusionen, genügt spülen mit destilliertem Wasser; für empfindlichere Lösungen, z. B. für Alkaloidsalz-Lösungen, muss das Filter, um die Ausfällung der Basen zu verhindern, mit verdünnter Salzsäure vorbehandelt werden. Die erforderliche Menge Salzsäure wird von *Wilke*⁴¹ wie folgt bemessen:

Filterdurchmesser	0,01 n HCl	H ₂ O
3 cm	0,1 ccm	2 ccm
6 cm	0,5 ccm	5 ccm
9 cm	1,0 ccm	10 ccm
12 cm	2,5 ccm	25 ccm

Die Salzsäure-Wassermischungen werden in das Filter eingesogen und während 10 Minuten darin belassen, worauf sie bis zur Chloridfreiheit des Filtrates mit destilliertem Wasser aus dem Filter verdrängt werden.

Für die Sterilisation von Asbestfiltern kommen folgende Verfahren in Betracht:

1. Autoklavierung bei 120° während 30 – 45 Minuten des zusammengesetzten Keimfilterapparates oder, bei entsprechender Konstruktion desselben, wenigstens des Filterteiles. Es wird angeraten, vor der Sterilisation die Luft aus dem Autoklaven zu evakuieren.
2. Trockensterilisation bei 160° während 2 Stunden. Dabei tritt aber bereits eine leichte bräunliche Verfärbung des Filtermaterials (Cellulose!) ein. Eine Erhitzung während 3 Stunden bei 140° hat den Vorteil, dass keine nennenswerte Veränderung der Filter eintritt. Bei Vorhandensein von resistenteren Sporen ist dieses Verfahren aber nicht sicher ausreichend.

*Glassinterfilter*³⁸

Im Gegensatz zu den Membran- und Asbestkeimfiltern, die nur zum einmaligen Gebrauch dienen, haben die Glassinterfilter den Vorteil, bei sachgemässer Behandlung fast eine unbeschränkte Zeit verwendbar zu sein. Zur Herstellung der Glassinterfilter wird Glas bis zur geeigneten Korngrösse vermahlen und dann durch Sintern derart verschmolzen, dass zwischen den angeschmolzenen Partikeln noch feinste, durchgehende Kanälchen verbleiben.

Die *Jenaer*-Ganzglasfilter bestehen aus *Jenaer* Geräteglas 20 (Bezeichnung G), das eine grosse chemische und thermische Widerstandsfähigkeit aufweist. Diese

⁴¹ Wilke H., Dtsch. Apoth. Ztg. 93, 214 (1953)

Keimfilter werden mit der Kennzahl 5 bezeichnet. Die früher hergestellten Filterplatten, bestehend aus zwei Schichten, einer grobporigen Trägerschicht G3 und der feinporigen, keimdichten Schicht G5, sind jetzt durch einschichtige G5-Platten ersetzt worden.

Der Filtrationsvorgang bei den Ganzglas-Bakterienfiltern beruht nicht ausschliesslich, aber zum grössten Teil, auf einer Siebwirkung. Die Bakterienfilter besitzen einen fiktiven mittleren Poren-Durchmesser von etwa 0,7-1,5 μ . Jedes Filter wird von der Firma mit einem Prüfschein geliefert, mit Angabe des fiktiven maximalen Porendurchmessers, der Filtriergeschwindigkeit und des nach dem Blasendruckverfahren ermittelten Standardwertes. Im Gegensatz zu den Membran- und Asbestfilterschichten stellt also jedes einzelne Glassinterfilter eine genau normierte Einheit mit ganz besonderen einmaligen Eigenschaften dar.

Gebrauchte Glasfilter müssen sofort nach Gebrauch, vor dem Eintrocknen der Filtrationsflüssigkeit in den Poren, gereinigt werden. Als Reinigungsmittel eignet sich heisse konz. Schwefelsäure (80°), der etwas Kalisalpeter oder eine Mischung von HNO_3 und NaClO_4 zugesetzt wird. Man giesst davon eine etwa 1 cm hohe Schicht auf das Filter, saugt an, bis die ersten Tropfen erscheinen und lässt über Nacht stehen. Nach dem Absaugen der Säure wird so lange mit destilliertem Wasser durchgespült, bis alle Säurereste entfernt sind.

Die Sterilisation der zweckmässig zusammengestellten und keimdicht, aber dampfdurchlässig verpackten Keimfilterapparaturen kann sowohl im Trockenschrank bei 160° während 2 Stunden als auch im gesättigten, gespannten Dampf (120°/20 Minuten) erfolgen. Die trockenen oder feuchten, kalten Filter sollen stets in den kalten Sterilisator eingebracht und langsam auf die gewünschte Temperatur erhitzt werden. Es wird auch davor gewarnt, bei Autoklaven mit Vakuum-Anschluss Vakuum zur raschen Entfernung des Dampfes zu benützen. Die Filter sollen nicht direkt auf die metallenen Teile des Trockenschrankes aufgelegt werden, sondern auf ein flaches Uhrglas oder auf den Deckel einer Petrischale als Unterlage.

Filter aus porösen Sintermetall-Werkstoffen³⁹

Man ist heute in der Lage, aus fast jedem Metall oder jeder Metall-Legierung Sinterkörper von verschiedener Porosität herzustellen. Die Metallfilter, die ursprünglich für die Reinigung von konzentrierten alkalischen Lösungen bestimmt waren, wurden später für mannigfache andere Zwecke herangezogen, so z. B. für die Filtration von Schmierölen und anderen technischen Flüssigkeiten, für die Entstaubung von Klimaanlageanlagen, als Gas- und Luftverteiler usw. Neuerdings werden sie auch für die Herstellung von sterilen Lösungen empfohlen. Die zur Sinterung bestimmten Metallpulver werden auf verschiedene Arten gewonnen:

1. Aus der Gasphase, z. B. Eisen, Nickel, Kobalt, wobei von den entsprechenden Carbonylverbindungen ausgegangen wird oder die Metaldämpfe kondensiert werden.
2. Durch Granulation.
3. Durch Abschmelzen von Drähten unter Wasser.
4. Durch Zerkleinerung von Spänen.

Je nach Ausgangsmaterial (Sinterpulver) entstehen Filter mit kugelig oder spratziger Kornform.

Bei der Metallsinterung werden, ähnlich wie bei der Herstellung von Glassinterfiltern, feine Metallpulver zuerst gepresst und dann erhitzt, ohne dass es dabei zu einem regelrechten Schmelzen kommt, sondern nur so weit, dass die benachbarten Kornteilchen zu einem festen Skelett verkitten. Um ein zu weit gehendes Zusammensintern der einzelnen Körner und damit eine Verschliessung der Poren zu verhindern, werden dem Grundstoff Füllstoffe zugesetzt. Bei den Füllstoffen handelt es sich meist um solche oxydischer Art, aber auch um Karbonate, Oxalate und dgl., die sich mit dem Grundstoff nicht inniger verbinden und die nach der Sinterung wieder entfernt werden können, sei es durch Herauslösen mit chemischen Mitteln, sei es durch Erhitzen, wobei sie zersetzt werden oder verdampfen.

Die Metallsinterfilter zeichnen sich vor allem durch ihre grosse mechanische Festigkeit aus. Unter normalen Bedingungen sind sie sowohl durch Zug, Druck, Scherung und Biegung, als auch durch thermische Einwirkung praktisch unverwundlich. Die mechanische Widerstandsfähigkeit lässt die Anwendung hoher Filtrationsdrucke zu und damit die Erhöhung der Filterleistung. Die vorzügliche Temperaturwechsel-Beständigkeit erlaubt es, die Metallfilter durch blosses Abflammen bzw. Ausglühen, also sehr rasch und einfach, zu sterilisieren. Diesen hervorragenden physikalischen Eigenschaften der Metallfilter stehen aber grosse Nachteile in chemischer Hinsicht gegenüber. Es ist anzunehmen, dass sich der ausgedehnte Kontakt mit Metall (grosse Oberfläche infolge Schwammstruktur der Filterplatten) nachteilig auf empfindliche Arzneistofflösungen auswirken kann. Dabei ist nicht nur an eine Verunreinigung des Filtrates mit Metallspuren zu denken, sondern auch evtl. an die Auslösung von katalytisch beschleunigten Zersetzungsprozessen. Kupferhaltige Filter (Bronze) eignen sich z. B. sicher nicht für die Keimfiltration von Adrenalin- oder Askorbinsäurelösungen. Auch die Reinigung der gebrauchten Metallfilter ist mit Schwierigkeiten verbunden, da sie nicht wie die Glasfilter unbedenklich mit starken Säuren und Oxydationsmitteln behandelt werden können. Für die Regenerierung der Metallfilter kommt darum hauptsächlich die Rückspülung, die Behandlung mit Pressluft oder hochgespanntem Dampf, das Herausbrennen der organischen Fremdstoffe und in beschränktem Mass die Benutzung von Lösungsmitteln in Frage.

EIGENE VERSUCHE

1. Prüfung von Filtermaterialien aus Metall- und Plastikwerkstoffen auf Keimdichtigkeit

Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung standen 6 Metall-Filterscheiben, wovon je zwei gleichartig waren, und zwei Filterscheiben aus Gaflon zur Verfügung. Vergleichsweise wurden auch Asbest- und Membranfilter in die Versuche einbezogen. Nähere Einzelheiten über die Filtermaterialien sind aus der Tab. 33 ersichtlich.

Versuchsordnung

Filtrierapparat: Es wurde ein «Filtrox»-Einschichtenfilter, Modell 50, mit Schraubdeckel benützt. Dieser Apparat besteht aus einem konischen Unterteil mit Ablaufstutzen, einem Filterteller, der oben am Konus des Unterteils eingelegt wird, sowie einem Filteroberteil, der zur Aufnahme der unfiltrierten Flüssigkeit dient. Die Filterteile werden durch eine Ueberwurfmutter zusammengepresst. Am Schraubdeckel ist ein Ventil angebracht, an das eine Velopumpe angeschlossen werden kann.

Die Filterplatten wurden in diese «Filtrox»-Keimfilterapparat eingespannt und oben und unten mit je einem gut passenden Gummiring abgedichtet. Vor der Sterilisation wurde etwas destilliertes Wasser filtriert und die noch nasse Apparatur in zwei Lagen Tücher eingepackt. Sterilisiert wurde bei 120° während 20 Minuten in einem einwandigen Kleinautoklaven.

Als Prüfkeim für die Dichtigkeitskontrolle wurde das Chromobacterium prodigiosum gewählt, das sich vorzüglich für die Kontrolle auf Keimdichtigkeit von Filtern eignet: es ist sehr klein (0,5 - 1 μ), nicht pathogen, wächst rasch und üppig schon bei Zimmertemperatur und bildet einen roten Farbstoff, der seine Identifizierung in der bewachsenen Nährbouillon von blossen Auge ermöglicht.

Zur eigentlichen Prüfung auf Keimdichtigkeit der Filter wurde wie folgt vorgegangen: 50 ml sterile Thioglykolat-Bouillon (*Disco*) wurde mit 0,5 ml einer 24stündigen Kultur von Bact. prodig., ebenfalls in Thioglykolat-Bouillon, versetzt und das Gemisch durch den sterilisierten Filtrierapparat mit Ueberdruck in eine sterile Erlenmeyerflasche filtriert. Nach der Entfernung des Filtrierapparates wurde die Erlenmeyerflasche mit der filtrierten Bouillon aseptisch mit einer sterilen Kappe aus Wattebausch und Pergamentpapier verschlossen und bei 32° bebrütet. Pro Filtersorte (Nickel-, Bronze-, Chromnickelstahl-, Gaflon-, Asbest- und Membranfilter) wurden je drei Keimfiltrationen mit Ueberdruck ausgeführt. Es wurde dazu eine Velopumpe benützt. Bei den Metall- und Plastikfiltern wurde die Pumpe möglichst leicht, bei den Vergleichsfiltern (Asbest- und Membran-

Tab. 33 Uebersicht über die untersuchten Filter

Werkstoff	Bezeichnung	Hersteller	Porenweite (Angabe des Herstellers)	Beschreibung der Filterscheiben (Durchmesser je 50 mm)
Nickel	Siperm Ni	Deutsche Edelstahlwerke AG (DEW), Stuttgart	unter 1 μ	silbergraue Platten mit glatter Oberfläche, Filterstärke 2,3 mm, Gewicht ca. 17,5 g
Bronze (91% Cu, 9% Sn)	Siperm B	"	unter 1 μ	rotbraune Platten mit etwas rauher Oberfläche, Filterstärke 3 mm, Gewicht ca. 32,7 g
Chromnickelstahl (18% Cr, 10% Ni, 2% Mo, Rest Fe)	Siperm R	"	unter 1 μ	silbergraue Platten mit etwas rauher Oberfläche, Filterstärke 3 mm, Gewicht ca. 24,5 g
Polytetrafluoraethylen	Gaflon «Porotef»	Gachot, Enghien, Frankreich	nicht normiert	reinweisse Platten, wachsartig, biegsam, Filterstärke 5 mm, Gewicht ca. 10 g
Asbest und Zellstoff	Filtrox «steril-S»	Filtrox-Werke AG, St. Gallen	0,6 - 0,7 μ	grau-weisse, filzige Platten, Filterstärke 5 mm, Gewicht ca. 2,7 g
Nitro-Cellulose auf Filterkarton montiert	CM 1121	Schleicher und Schuell AG, Feldmeilen	maximal 0,75 μ	Membranseite: reinweiss, glatt, glänzend; Kartonseite: grauweiss. Filterstärke 0,6 mm, (Membranschicht allein 50-100 μ) Gewicht 0,7 g

filtrern) hingegen absichtlich bedeutend kräftiger betätigt. Trotzdem war die Durchlaufgeschwindigkeit des Filtrates bei den Metall- und Plastikfiltern viel grösser als bei den Vergleichssorten. Während die Filtration der 50 ml Bouillon durch die Metall- und Plastikfilter in weniger als 1 Minute durchgeführt werden konnte, erforderte die Filtration der gleichen Menge Bouillon durch die Asbest- und Membranfilter 10-15 Minuten.

Ergebnis der Filtrationsversuche

Die Resultate der Untersuchung sind in Tab. 34 wiedergegeben.

Tab. 34 Prüfung von verschiedenen Filtermaterialien auf Keimdichtigkeit (Chromobacterium prodigiosum)

Versuch No.	Filtermaterialien	Ergebnis der Sterilitätsprüfung im Gesamfiltrat (+= Wachstum, --= kein Wachstum) jedes Zeichen entspricht einer Keimfiltration von 50 ml Bouillon-Kultur. Mit jedem Filtermaterial wurden drei Filtrationen ausgeführt.		
		1	2	3
123	Membran-Filter	—	—	—
124	Asbest-Filter	—	—	—
125	Porotef-Filter	+	+	+
126	Nickel-Filter	+	+	+
127	Chrom-Nickelstahl-Filter	+	+	+
128	Bronze-Filter	+	+	+

Diskussion der Resultate

In allen Filtraten der Metall- und Plastikfilter war schon nach 24-stündiger Bebrütung starkes Wachstum festzustellen, und in der Folge trat zunehmend die für das Bact. prodig. typische Rot-Färbung der Bouillon auf.

Die grosse Durchlaufgeschwindigkeit des Filtrates bei niedrigem Ueberdruck und das üppige Wachstum innert kurzer Zeit lassen auf eine grosse Keimdurchlässigkeit der untersuchten Metall- und Plastikfilter schliessen. Bei den durchscheinenden Gaflonfiltern wurde nach der Filtration zudem beobachtet, dass das gesamte Filtermaterial von Keimen durchsetzt war, was deren Durchlässigkeit für den benutzten Prüfkeim ad oculos demonstrierte.

Die Filtrate der Membran- und Asbestfilter wiesen auch nach 10 Tagen keine Anzeichen von Wachstum auf.

Schlussfolgerung

Die untersuchten Metall- und Plastikfilter eignen sich nicht für die Keimfiltration.

2. Prüfung der Abgabe von Metall-Ionen an das Filtrat durch Filter aus Metall- und Plastikwerkstoffen und vergleichsweise durch Asbest- und Membranfilter

Auch wenn die untersuchten Metall- und Plastikfilter sich als nicht keimdicht erwiesen und darum von vornherein für die Keimfiltration ausser Betracht fallen, kann doch sehr wohl ihre Verwendung für gewöhnliche Filtrationszwecke ins Auge gefasst werden. Zudem ist anzunehmen, dass wirklich keimdichte Filter aus den betreffenden Werkstoffen im Handel bereits angeboten werden oder dass dies doch einmal der Fall sein wird. Man kann sich darum schon jetzt die Frage stellen, ob solche Filter die zweckmässigen physikalischen und chemischen Eigenschaften besitzen (Indifferenz des Materials gegenüber den zu filtrierenden Flüssigkeiten), die für die pharmazeutische Praxis gefordert werden müssen. Die auf Keimdichtigkeit untersuchten Filter wurden darum auch noch in bezug auf die Abgabe von Metall-Ionen an das Filtrat geprüft.

Versuchsbedingungen und Untersuchungsmethode

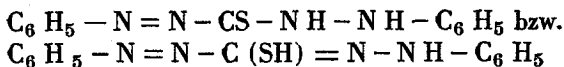
In der Apotheke kommen praktisch nur neutrale, schwach saure und schwach alkalische Lösungen für die Filtration in Frage. Als Filtrierflüssigkeiten für die Prüfung der verschiedenen Filtermaterialien auf Abgabe von Fremdstoffen an das Filtrat wurden darum gewählt:

destilliertes Wasser	pH	ca. 5,5
Salzsäure 1/25 n	pH	ca. 1,5
Sodalösung 2 %	pH	ca. 11,0

Die Untersuchung wurde auf den Nachweis von Metall-Ionen im neutralen bzw. neutralisierten Filtrat beschränkt.

Der Nachweis der Metall-Ionen wurde colorimetrisch mittels der Dithizonreaktion vorgenommen⁴².

Das Dithizon (Diphenylthiocarbazon) von der Formel:



ist eine sehr schwache Säure, die mit vielen Metallen (ausschliesslich solchen, deren Ionen in wässriger Lösung schwerlösliche Sulfide bilden) in jeweils definierten pH-Bereichen wasserunlösliche innere Komplexsalze bildet, die sich in Tetrachlorkohlenstoff mit charakteristischen Farben lösen. Die Färbung der Metall-Dithizonate ist meistens rosa, braun oder violett (Chrom, Nickel, Kupfer, Zinn), aber auch stahlblau (Eisen). Sie variiert bei einigen Metallen mit dem pH.

⁴² Iwantschew G., Das Dithizon u. seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse, Weinheim 1958.

Weil die Dithizon-Reaktion überaus empfindlich ist (Nachweis von Metallen schon in Mengen von wenigen γ !), wurde auf peinliche Sauberkeit der bei der Untersuchung verwendeten Behälter und Utensilien und auf eine möglichst grosse Reinheit der benutzten Chemikalien geachtet. Das zur Filtration bestimmte Wasser wurde stets frisch aus einer Glasapparatur destilliert. Das Filtrat wurde auf folgende Art gewonnen:

Die zu untersuchende Filterscheibe wurde in eine Porzellannutsche gelegt, wobei ein Gummiring zwischen der Filterscheibe und der Siebplatte der Nutsche als Dichtung diente. Es wurden je 100 ml destilliertes Wasser bzw. Salzsäure 1/25 n und Sodalösung 2% in eine Saugflasche filtriert. Der mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugte Unterdruck wurde derart reguliert, dass die Durchlaufgeschwindigkeit der Testlösungen und damit deren Kontakt mit den verschiedenen Filtermaterialien möglichst einheitlich ca. 5 Minuten betrug. Das saure Filtrat wurde mit Natronlauge, das alkalische mit Salzsäure neutralisiert.

Zur Gehaltsbestimmung der Metalle in den Filtraten wurde nach einer vereinfachten Methode der «extraktiven Titration» mit Dithizonreagens vorgegangen⁴²: In eine Reihe von Reagensröhrchen wird je 1 ml des zu untersuchenden Filtrates gegeben. Zu dieser abgeteilten Prüflösung werden aus einer Mikrobürette mit enger Auslaufkapillare abgestufte Mengen (0,05, 0,10, 0,15, . . . , 0,50, . . . , 1,00, . . . , 3,00, . . . ml) einer frisch hergestellten Lösung von 5 mg reinstem Dithizon in 100 ml CCl_4 zugefügt. Um die Metall-Spuren durch das Dithizon aus der wässerigen in die organische Phase zu extrahieren, wird die Mischung der wässerigen und organischen Flüssigkeitsschichten in den verschiedenen Röhrchen während ca. 1 Minute kräftig durchgeschüttelt. Wenn die Metall-Ionen im Ueberschuss sind, wird alles Dithizonreagens verbraucht. Die Lösung der Metall-Dithizonate in der CCl_4 -Schicht weist dann die rein rosa bis violette Färbung auf. Sind aber nicht genügend Metall-Ionen vorhanden, um das gesamte Dithizon in Metallkomplexe überzuführen, treten die grüne Farbe der ursprünglichen Dithizonlösung oder evtl. grau-grüne Mischfarben auf. Der Reagensverbrauch bis zum Auftreten eines deutlichen «Grautons» wird als Mass für den Metallgehalt der Prüflösung gewertet.

Diese Methode der visuellen Colorimetrie der Mischfarbe erlaubt, Schätzungen über sehr niedrige Metall-Ionen-Konzentrationen anzustellen. Sie war in unserer Untersuchung, wo z. T. unbekannte Metall-Ionen (Asbest-, Membran- und Plastikfilter), z. T. Gemische von verschiedenen Metall-Ionen (Bronze- und Chromnickelfilter) vorlagen, die einzig mögliche, da das heterogene Material das genauere Arbeiten mit Eichreihen verunmöglichte. Einzig für die Filtersorte aus reinem Nickel war eine genauere Vergleichsmöglichkeit gegeben, die auch zu einer Vergleichstitration mit 3 abgestuften Nickelsulfatlösungen ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ausgenützt wurde.

Ergebnis der Untersuchung

Die Resultate der Metallbestimmung in den Filtraten ist in Tab. 35 wiedergegeben.

Tab. 35 Ermittlung der Abgabe von Metall-Ionen aus verschiedenen Filtermaterialien an das Filtrat durch visuelle Colorimetrie der Dithizon-Reaktion

Vers. No.	Filtrate, bzw. Vergleichslösungen	Verbrauch an Dithizon-Reagens (5mg/100 ml Tetrachlorkohlenstoff) in ml pro 1 ml Prüflüssigkeit bis zum Erreichen der Mischfarbe (Grauton)		
		Prüflüssigkeit		
		1/25 n Salzsäure, neutralisiert mit Natronlauge	Destilliertes Wasser	2prozentige Sodalösung, neutralisiert mit Salzsäure
129	nicht filtrierte Test-Flüssigkeiten (Blindwerte)	0,20	0,10	0,25
130	Filtrat v. Membranfilter	0,30	0,20	0,30
131	Filtrat v. Porotefilter	0,40	0,15	0,30
132	Filtrat v. Asbestfilter	1,30	0,20	0,25
133	Filtrat v. Nickelfilter	1,10	0,30	0,70!
134	Filtrat v. CrNi-Stahlfilter	1,00	0,30	0,45
135	Filtrat v. Bronzefilter	ca. 10,00	0,80	ca. 2,00
	Vergleichslösungen: NiSO ₄ · 7H ₂ O			
136	5 γ/ml = ca. 1 γ Ni ⁺⁺ /ml		0,30	
137	25 γ/ml = ca. 5 γ Ni ⁺⁺ /ml		0,85	
138	125 γ/ml = ca. 25 γ Ni ⁺⁺ /ml		3,50	

Diskussion der Resultate

Es muss vorausgeschickt werden, dass die gefundenen Dithizonzahlen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden dürfen, weil sie mit verschiedenen Metallen erhalten wurden, die ungleich empfindlich mit Dithizon reagieren. Auch wurde in neutralem pH-Milieu gearbeitet, das für einige Metall-Ionen (z. B. Kupfer) in Bezug auf die Empfindlichkeit der Reaktion ungünstig ist. Es mag auffallen, dass in keinem Fall, auch nicht beim unfiltrierten destillierten Wasser, die Dithizon-Reaktion ganz negativ ausfiel. Diese Tatsache erklärt sich aber

mit der überaus grossen Empfindlichkeit der Reaktion. Die mit den nicht filtrierten Testlösungen ermittelten Werte (Blindwerte) sind auf die den benutzten Behältern anhaftenden bzw. auf die in den verwendeten Chemikalien vorhandenen Metall-Spuren zurückzuführen. Die in den Filtraten der Membran- und Plastikfilter nachgewiesenen Metall-Spuren sind wahrscheinlich zu einem guten Teil der Gummidichtung in der Porzellannutsche zuzuschreiben. Sie sind minim, erfordert doch die 5 gamma pro ml enthaltende Nickelsulfat-Vergleichslösung (entsprechend ca. 1 gamma Ni^{++}) etwa dreimal mehr Reagenslösung als das reine Wasser. Werte bis zu 0,3 ml Dithizonlösung pro ml Prüflösung dürfen deshalb als unbedenklich angesehen werden. Als Limite dürfte 0,5 ml Dithizonlösung pro ml Prüflösung gelten. Der Vergleich der für die verschiedenen Filtermaterialien gefundenen Dithizonwerte führt zu folgenden Feststellungen:

- a) Mit reinem Wasser als Filtrierflüssigkeit ist nur bei den Bronzefiltern eine erhöhte Abgabe von Metall-Ionen an das Filtrat festzustellen.
- b) Mit der sauren Filtrierflüssigkeit ist die Dithizon-Reaktion bei den Membran- und Plastikfiltern schwach, ausgeprägter bei den Nickel-, Chromnickelstahl- und Asbest-Filtern und sehr stark bei den Bronze-Filtern.
- c) Mit der alkalischen Filtrierflüssigkeit sind einzig bei den Nickel- und besonders wieder bei den Bronze-Filtern erhöhte Dithizonwerte festzustellen.

Zu den einzelnen Resultaten ist zu bemerken:

Asbest-Filter: Sie enthalten stets kleine Mengen Fremd-Ionen und müssen daher, laut Angaben der Hersteller (s. Seite 108) vor der eigentlichen Keimfiltration mit einer leicht sauren Spülflüssigkeit vorgewaschen werden.

Nickel-Filter: Etwas überraschend scheint der mit der alkalischen Lösung gefundene Dithizonwert, werden doch Nickelfilter in der Industrie vielfach für die Filtration von konzentrierten Laugen verwendet.

Bronze-Filter: Dieses Filtermaterial ergab durchwegs schlechte Resultate, schon mit dem reinen Wasser und erst recht mit der alkalischen und ganz besonders mit der sauren Filtrierflüssigkeit. Bei der Sterilisation der Bronzescheiben im Keimfilterapparat war schon vor der Prüfung auf Keimdichtigkeit aufgefallen, wie sich das Material an den Kontaktstellen mit der Gummidichtung schwarz verfärbte (Sulfid-Bildung), was ebenfalls auf die grosse Reaktionsfähigkeit dieses Werkstoffes hindeutet.

Die Porotef-Filter sind chemisch so günstig wie Membranfilter.

Schlussfolgerung

Von den untersuchten Filtermaterialien ist hinsichtlich der chemischen Eigenschaften (Indifferenz) Bronze in jedem Fall von der Verwendung für pharmazeutische Zwecke auszuschliessen.

Nickelfilter eignen sich für neutrale wässrige, Chromnickelstahlfilter für neu-

trale und leicht alkalische wässrige Lösungen. Bei allen Metallfiltern ist aber stets an mögliche chemische Reaktionen mit gelösten Arzneistoffen zu denken, so dass von Fall zu Fall entschieden werden muss, ob deren Verwendung verantwortet werden kann. Mehr Zukunft als die Metallfilter scheinen die Filter aus Polytetrafluoraethylen zu haben, die sich nicht nur durch hervorragende physikalische Eigenschaften (Festigkeit, Wärmebeständigkeit), sondern auch durch ihre chemische Indifferenz auszeichnen. Es ist nur zu hoffen, dass dieses Filtermaterial auch in Bezug auf die Porosität so weit verbessert wird, dass der pharmazeutischen Praxis absolut keimdichte Filter mit guter Filterleistung zur Verfügung gestellt werden können.

Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Die Untersuchung einiger Metallsinter-Filter (Nickel, Chromnickelstahl, Bronze) und eines Plastikfilters (Polytetrafluoraethylen) auf ihre Brauchbarkeit für die pharmazeutische Praxis führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Alle untersuchten Metall- und Plastikfilter erwiesen sich als nicht bakterien-dicht (*Chromobacterium prodigiosum*), im Gegensatz zu den vergleichsweise in die Untersuchung einbezogenen Membran- und Asbest-Filtern, die den Prüfkeim zurückhielten.
2. Bei der Prüfung der gleichen Filtermaterialien auf Abgabe von Fremdstoffen an neutrale, schwach saure und schwach alkalische wässrige Filtrierflüssigkeiten (Nachweis von Metall-Ionen im Filtrat mit der Dithizonreaktion) wurde festgestellt, dass besonders die sauren (HCl 1/25 n) und in geringerem Ausmass die alkalischen (Na_2CO_3 2%) Filtrate der Metallfilter, aber aber auch das saure Filtrat des Asbestfilters mit Metallspuren verunreinigt waren.

Hervorstechend sind die hohen Dithizonwerte der Bronze-Filter, welche die Eignung dieses Werkstoffes für pharmazeutische Zwecke als sehr fraglich erscheinen lassen. Die übrigen untersuchten Metallfiltermaterialien (Nickel, Chromnickelstahl) dürfen, wenigsten gegenüber neutralen Filtrierflüssigkeiten, als ausreichend indifferent angesehen werden, abgesehen von allfälligen Inkompatibilitäten mit den gelösten Substanzen.

Die in den Filtraten der Membran- und Polytetrafluoraethylenfilter nachgewiesenen Metallspuren sind minim und mehr zufälligen Ursachen zuzuschreiben.

Leer - Vide - Empty

Inhaltsübersicht

<i>Vorwort</i>	5
<i>Einleitung</i> Untersuchungsmethoden, technische Hilfsmittel und bakteriologisches Testmaterial	7
<i>I. Sterilisation verschiedener pharmazeutischer und ärztlicher Utensilien im Autoklaven</i>	14
Allgemeines über die Sterilisation im Autoklaven	14
Eigene Versuche	20
1. Autoklavierung von Erdsporten in verschlossenen, trockenen Gefässen und in trockenen Apparaten mit abgeschlossenen Hohlräumen bei 120° während 20 Minuten	20
2. Autoklavierung von Erdsporten in hermetisch verschlossenen, wenig Wasser enthaltenden Gefässen	21
3. Autoklavierung von leeren, trockenen, nicht hermetisch verschlossenen, aufrechtstehenden Erlenmeyerflaschen und Reagenströhrchen	23
4. Autoklavierung von aufrechtstehenden Erlenmeyerflaschen unter verschiedenen Versuchsbedingungen	25
5. Autoklavierung von leeren Messzylindern unter variierenden Versuchsbedingungen	29
6. Autoklavierung von Augentropfen-Fläschchen	33
7. Autoklavierung von Pipetten	37
8. Autoklavierung einer Injektionsspritze	39
9. Autoklavierung von Keimfilterapparaturen	41
10. Autoklavierung von Infusionsbestecken	47
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	50
<i>II. Sterilisation verschiedener pharmazeutischer Grundstoffe</i>	52
1. Sterilisation von Glycerin	52
2. Sterilisation von Propylenglykol	57
3. Sterilisation von Polyäthylenglykol 400 und von Polyäthylenglykol 4000	60
4. Sterilisation von Isopropylmyristinat, Isopropylpalmitat, Olivenöl und Paraffinöl	68
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	71

<i>III. Sterilisation von Glukoselösungen</i>	72
Allgemeines über die thermischen Veränderungen von Glukoselösungen	73
Eigene Versuche	77
1. Untersuchung über einen möglichen Einfluss der Konzentration von Traubenzuckerlösungen auf die Abtötung von nativen Erdsproren bei der Sterilisation nach g (120 ⁰ / 20 Minuten)	77
2. Vergleichende bakteriologische Ueberprüfung der Sterilisationsverfahren der Ph. Helv. V für Traubenzuckerlösungen	78
3. Vergleichende Untersuchung über die thermischen Veränderungen von Glukoselösungen verschiedener Konzentration bei der einmaligen und zweimaligen Sterilisation im freiströmenden Wasserdampf während 30 Minuten und bei der Autoklavierung bei 120 ⁰ während 20 Minuten	81
4. Vermeidung der Verfärbung und Korrektur des pH von sterilisierten Glukoselösungen	85
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	90
<i>IV. Sterilisation von Pulvern im Autoklaven</i>	92
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	98
<i>V. Sterilisation mit 6l Gew.-%-igem Alkohol</i>	99
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	104
<i>VI. Prüfung einiger Filtermaterialien aus Metall- und Plastikwerkstoffen auf Keimdichtigkeit und Fremdstoffabgabe an das Filtrat</i>	105
Keimfilter und Keimfiltration	105
Eigene Versuche	111
Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	118

Curriculum vitae

Ich wurde am 11. Januar 1923 als Sohn des Johann und der Margreth Flury-Caluori in Chur geboren. In Domat/Ems, wo meine Eltern später Wohnsitz nahmen, besuchte ich die Primarschule. Die Gymnasialstudien im Collège in Trois-Epis (Elsass) und Collège St. Michel in Fribourg schloss ich im Jahre 1945 mit der Maturität ab. An der Universität Fribourg belegte ich die naturwissenschaftlichen Fächer des Pharmazie-Studiums. Das vorgeschriebene Praktikum absolvierte ich bei Herrn Apotheker P. Jörger in Chur und bei Herrn Kantonsapotheker Dr. J. Kessler in St. Gallen. Nach dem Assistentenjahr bei Herrn Apotheker U. Sutter in Thusis immatrikulierte ich mich an der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich, wo ich 1953 das Staatsexamen bestand und das Diplom als Apotheker erwarb. Seither bin ich in der Kantonsapothek St. Gallen tätig.

Die vorliegende Promotionsarbeit begann ich neben der praktischen Berufsarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Münzel von der galenischen Abteilung des Pharmazeutischen Instituts der ETH. Nach einem längeren Unterbruch beendigte ich sie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Steiger im Jahre 1961.