

AUS DER LEHR-UND FORSCHUNGSEINHEIT PHARMAKOLOGIE

PROF. DR. KARL-PETER ITTNER

**DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**MESSUNG DER CHEMISCHEN STABILITÄT VON OPIOIDMISCHUNGEN MIT
ADJUVANTIEN DURCH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE
(HPLC)**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Sabine Kipp**

2021

AUS DER LEHR-UND FORSCHUNGSEINHEIT PHARMAKOLOGIE

PROF. DR. KARL-PETER ITTNER

**DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**MESSUNG DER CHEMISCHEN STABILITÄT VON OPIOIDMISCHUNGEN MIT
ADJUVANTIEN DURCH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE
(HPLC)**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

der

**Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Sabine Kipp

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karl Peter Ittner, DEAA, EDIC

2. Berichterstatter: PD Dr. Michael Pawlik

Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Inkompatibilität und Instabilität	2
1.2	Ursachen für Inkompatibilitäten und Instabilitäten	3
1.3	Grundlagen der Nozizeption	6
1.4	Entwicklung der multimodalen pharmakologischen Schmerztherapie	8
1.5	Rechtliche Grundlagen zur Stabilitätstestung	10
1.6	Opioide und Adjuvantien	11
1.6.1	Morphin	13
1.6.2	Hydromorphon	14
1.6.3	Oxycodon	15
1.6.4	Piritramid	16
1.6.5	Levomethadon	17
1.6.6	Ketamin	18
1.6.7	Midazolam	20
1.7	Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	22
1.8	Fragestellung der Arbeit	24
1.9	Versuchsplanung	25
2	Methoden	27
2.1	Methodenentwicklung	27
2.2	Versuchsdurchführung	29
2.3	Kalibrierung der HPLC- Messungen	30
2.4	Testung der mikrobiologischen Sterilität der Mischungen	30
2.5	BtM Genehmigung	30
2.6	Validierung der Messungen	30
2.7	Statistische Auswertung und Darstellung der Daten	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Chromatogramme.....	32
3.2	Selektivität (Auflösung der Chromatogramme).....	34
3.3	Reproduzierbarkeit (Intra–Day Stabilität).....	35
3.4	Graphische Darstellung der Messungen	36
3.5	Auswertung der Ergebnisse durch lineare Funktion	39
3.6	Relative Standardabweichung der Konzentration der Mischungen	40
3.7	Gepaarte t-Testung	41
3.8	Mikrobiologische Sterilität der Mischungen	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Validierung der Ergebnisse	46
4.2	Konzentrationsabweichungen in den Mischungen	47
4.3	Limitationen	48
5	Zusammenfassung.....	49
5.1	Ausblick.....	49
6	Anhang.....	50
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	50
6.2	Tabellenverzeichnis.....	51
6.3	Quellenverzeichnis	52
7	Danksagung.....	59
8	Lebenslauf	60

1 Einleitung

Schmerzmittel gehören zu den am Häufigsten verordneten Medikamenten in Deutschland. Im Jahr 2018 wurden 47,8 Mio. Verordnungen für Analgetika an Kassenpatienten ausgestellt¹, darunter waren ca. 16,5 Mio. Opioid Verordnungen. 35% der kassenärztlichen Verordnungen entfallen dabei auf Patienten unter Langzeitbehandlung mit Verordnung über drei Quartale.

Auf Intensivstationen und im postoperativen Setting werden dabei meist Mischinfusionen von Schmerzmittel und Sedativa angefertigt und über einen zentralvenösen Zugang verabreicht.²

Daraus resultieren wiederkehrend chemisch oder physikalisch instabile Medikamentenmischungen, welche unter Umständen schwerwiegende Folgen für die betroffenen Patienten haben können.^{3, 4}

Die Raten von Inkompatibilitäten bei Medikamentenmischungen auf Intensivstationen lagen dabei zwischen 7% und 20%.⁴⁻⁶ Damit gehören Inkompatibilitäten zu den häufigsten Fehlern bei der Verabreichung von intravenösen Medikamenten.^{3, 5}

1.1 Inkompatibilität und Instabilität

Inkompatibilitäten von Medikamentenmischungen sind seit den 1930 Jahren bekannt. Die Definitionen von Inkompatibilität und Stabilität wurden 1977 von Bergmann beschrieben.⁷

Inkompatibilität beschreibt Änderungen in der Wirkweise von Medikamentenmischungen (z.B. durch erhöhte Toxizität) oder physikalischen Veränderungen (z.B. Ausfällung oder Änderung der Löslichkeit), welche die Mischung ungeeignet für die Anwendung am Patienten machen.⁷

Als physikalische Inkompatibilität wird die Bildung von sichtbaren Ausfällungen, Trübungen oder Gasbildung bei der Mischung von Medikamenten bezeichnet.^{8, 9}

Chemische Inkompatibilität stellt eine nicht sichtbare chemische Reaktion der gemischten Medikamente dar, welche zu einem Wirkungsverlust oder Änderung der pharmakologischen Eigenschaften führen.⁸

Ein während der Lagerung oder Gabe von Medikamentenmischung auftretender Abfall der Wirkstoffkonzentration der Einzelsubstanzen um mehr als 10% auf Grund von z.B. Lichtempfindlichkeit, Temperaturempfindlichkeit, Zersetzung etc. wird Instabilität genannt.⁷

1.2 Ursachen für Inkompatibilitäten und Instabilitäten

Die Säure-Basen-Reaktion stellte eine wichtige Ursache für Inkompatibilitäten dar. Die Mehrheit aller Medikamente zu Injektionszwecken sind schwache Elektrolyte, die als Salz oder in ihrer ionisierten Form vorliegen. Resultierend daraus sind Säure-Base-Reaktionen der häufigste Grund für Inkompatibilitäten beziehungsweise die Bildung von Präzipitaten.^{9, 10} Der Anteil der ionisierten oder nicht-ionisierten Form eines Medikaments ist abhängig vom pH-Wert der Lösung sowie des pKs-Wert des Medikaments im Sinne der Henderson-Hasselbalch-Gleichung.^{11, 12} Diese Faktoren bilden die Grundlage zur Vorhersage vieler Medikamenten-Inkompatibilitäten.^{9, 10} Präzipitate werden häufig durch Wasserunlöslichkeit von nicht-ionisierten Medikamentenformen ausgelöst. Dies kann aus den folgenden Gründen geschehen:

- Die Kombination von Kationen und Anionen („Bildung eines Salzes“).
- Verdünnung von Lösungen, welche die Salzform eines Medikaments enthalten und der resultierende pH-Wert, mehr nicht-ionisierte Formen enthält als zuvor.
- Mischungen von Medikamenten, welche dieselbe Ladung haben, aber sich mehr als eine Einheit im pKs-Wert und im pH-Wert der Lösung unterscheiden. Hier wirken die Medikamente relativ zueinander als Säuren bzw. Basen.⁹

Ein Beispiel für eine Säure-Basen-Reaktion, welche zur Präzipitatbildung führt, stellt die Mischung aus Furosemid und Midazolam dar. In einer äquivalenten Mischung beider Substanzen zeigt sich augenblicklich die Bildung einer weißlich-milchigen Ausfällung. Furosemid in Kochsalzlösung ist eine basische Lösung (pH 8.77). In Kombination mit einer sauren Lösung, hier Midazolam (pH 3.47), wird der pH-Wert der Gesamtlösung erniedrigt und es zeigen sich Ausfällungen von Furosemid.^{9, 13} Diese wiederum können embolische Komplikationen nach sich ziehen oder die Flussraten von Infusionssystemen wie beispielsweise Perfusoren verringern und somit zu verminderten Wirkstoffspiegeln in Patienten führen.¹³

Eine weitere Ursache für die Inkompatibilität von Medikamentenmischungen stellt die Unlöslichkeit von Medikamenten dar.

Medikamente wie Diazepam und Lorazepam sind schlecht wasserlöslich. Aus diesem Grund werden den Injektionslösungen alkoholische Bestandteile (z.B. Propylenglykol, Ethanol etc.) zugesetzt.^{9, 14} Wenn nun solche Lösungen in wässriger Lösung (z.B. mit 0.9% NaCl-Lösung) verdünnt werden, bilden sich zwischen den Wasser- und

Alkoholemolekülen Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese sind stärker als die Van-der-Waals Kräfte zwischen den Alkoholen und Diazepam. Somit können sich dann Ausfällungen ergeben.⁹

Auch Propofol (2,6-Diisopropylphenol) ist als Einzelsubstanz kaum wasserlöslich.¹⁵ Dementsprechend wird Propofol, im klinischen Gebrauch, in Sojaöl gemischt. Unter Verwendung von Eilecitin als Emulgator, entsteht eine Öl-Wasser (O/W) Emulsion.¹⁶ Dies wiederum hat zur Konsequenz, dass bei Mischungen von Propofol mit anderen Substanzen häufig Inkompatibilitäten auftreten.^{18, 19} Es kann dabei zur Änderung der Partikelgröße in der (O/W) Emulsion kommen oder gar zur völligen Entmischung von Öl und Wasser. Daraus kann für den Patienten die Gefahr von Emboli im Gefäßsystem resultieren.¹⁹

Ein Beispiel für Inkompatibilität durch Salzbildung stellt die Kombination von Ceftriaxon mit Calcium-Ionen dar.²⁰ Es kommt bei Kombination von Ceftriaxon mit anderen Medikamenten, die Calcium-Ionen abgeben können, zur Bildung eines schlecht löslichen Salzes. Die Ausfällungen des Salzes in den Infusionslösungen führten zu mehreren tödlichen Komplikationen bei Neugeborenen.^{9, 21}

Durch den Einfluss von Licht, Temperatur, pH-Wert, Luftfeuchtigkeit sowie chemische Reaktion mit Hilfsstoffen können über die Zeit Abbauprodukte von Arzneimitteln entstehen. Dies wird als Degradation bezeichnet.^{22, 23} Durch Substanzabbau von Arzneimitteln kann sich der therapeutische Effekt verringern. Darüber hinaus können toxische Abbauprodukte auftreten.

Wie in Tabelle 1 gezeigt, kommt es exemplarisch bei Sevofluran während der Überleitung auf trockenem Atemkalk (z.B. NaOH) in Atemgeräten zur basenkatalysierten Abspaltung von Fluorid und zur Bildung von Compound A (Fluormethyl-2,2-difluor-1-(trifluormethyl)-vinylether) sowie Compound B (Fluormethyl-2-methoxy-2,2-difluor-1-(trifluormethyl)-vinylether).²⁴ Diese Verbindungen zeigten in tierexperimentellen Versuchen nephrotoxische Schädigung bei Ratten.²⁵ Im klinischen Setting kam es bei der Degradation von Sevofluran auf trockenem Atemkalk zu Problemen bei der Narkoseeinleitung sowie zu teils schweren Atemwegsreizungen.²⁶

Tabelle 1: Beispiele für die Degradation von Arzneimitteln

Arzneimittel	Degradation	Pharmakologischer Effekt
Tetracycline	Epimerisierung im sauren Milieu	Reversibles Fanconi-Syndrom ²⁷
Meropenem	Substanzabbau im sauren Milieu und bei Hitze	In vitro zytotoxisch ²⁸
Chloramphenicol	Photo-Oxidation	Wirkungsverlust ²⁹
Isoniazid	Hydrolytischer Abbau durch Hitze	Genotoxizität und Kanzerogenität im Tierversuch ³⁰
Ibuprofen	Oxidation und Lichtalterung	Zytotoxizität ³¹
Ascorbinsäure	Dehydratation und Hydrolyse	Hepatotoxizität in Ratten ²²
Pethidin	Hydrolytischer Abbau einer Ester-Gruppe	Schwere irreversible Parkinson-Symptomatik im Tierversuch ³²
Lidocain	Hydrolytischer Abbau	Schädigung der Hämatopoese ³³
Propofol	Phasentrennung	Konzentrationsunterschiede in Spritzen, Auftreten von Emboli ³⁴
Sevofluran	Basen-katalysierte Abspaltung von Fluorid	Nephrotoxizität bei Ratten ²⁶

Diverse physikalische und chemische Prozesse können bei Mischungen von Arzneimitteln auftreten, die möglicherweise die Sicherheit der Patienten gefährden. Aus diesem Grund wurden vom International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Richtlinien vorgegeben. Diese Richtlinien sehen bei der Zulassung von neuen Arzneimitteln und Dosierungsformen, eine Testung auf möglichen Substanzabbau, sowie daraus resultierend chemische und physikalische Stabilität vor.²³ Die Richtlinien wurden auch von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) übernommen.³⁵

1.3 Grundlagen der Nozizeption

Die Fähigkeit zur Schmerzempfindung (Nozizeption) stellt eine lebenswichtige Schutzfunktion des Körpers dar. Durch Stimulation der Schmerzfasern und der resultierenden Schmerzwahrnehmung sollen Gewebeschädigungen minimiert werden.³⁶

Kommt es zur Reizung peripherer Nervenenden, die eine potenzielle Gewebeschädigung anzeigen, erfolgt die Depolarisation des betroffenen Neurons, der Nervenzelle und letztlich zur Entstehung eines Aktionspotentials. Im Hinterhorn des Rückenmarks erfolgt die Verschaltung auf das zweite afferente Neuron. Die Aktivierung der afferenten A δ - sowie C-Fasern führt zur Ausschüttung von Neurotransmittern wie Glutamat und Substanz P in den synaptischen Spalt. Beide Substanzen stimulieren post-synaptische Rezeptoren (u.a. AMPA, NMDA) auf der Membran des zweiten afferenten Neurons.³⁷ Das Signal wird kontralateral über den Tractus spinothalamicus zum Thalamus weitergeleitet und dort weiterverarbeitet.³⁸ Auf der spinalen Ebene treten endogene schmerzregulatorische Einflüsse auf wie die Ausschüttung von Endorphinen, Enkephalinen, Dynorphinen sowie Endomorphinen, welche an verschiedenen Opioidrezeptorsubtypen binden und somit Analgesie vermitteln.³⁹

Schmerzreize können eine verlängerte Steigerung der Erregbarkeit in der zentralen Schmerzverarbeitung verursachen.⁴⁰ Dieses Phänomen wird als zentrale Sensibilisierung des Schmerzreizes bezeichnet. Es zeigt sich eine funktionsabhängige Plastizität in der Schmerzreizverarbeitung.

Es kommt zur Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors. Auch erfolgt die Aktivierung von Rezeptoren für Glutamat und Substanz P, welche zu einem intrazellulären Kalziumeinstrom und zur Depolarisation der Zelle führen. Ferner kommt es zur Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und folgend zur Ausschüttung pro-exzitatorischer Zytokine und Kinasen, welche die Erregbarkeit der Zellmembran steigern. Überdies werden inhibitorische γ -Aminobuttersäure (-GABA) – und Glycinrezeptoren deaktiviert.⁴¹⁻⁴³ Durch das komplexe Zusammenspiel der oben genannten Faktoren kommt es zu einer anhaltenden Exzitation der Zelle und somit zu Hyperalgesie und Allodynie.⁴⁴

Hinsichtlich des Phänomens der zentralen Sensibilisierung finden sich pharmakologische Ansatzpunkte. So wirkt Ketamin als NMDA-Rezeptor-Antagonist der zentralen Sensibilisierung entgegen⁴⁵ und bietet daher einen effektiven Ansatzpunkt im Management akuter und chronischer Schmerzzustände.^{44, 46}

1.4 Entwicklung der multimodalen pharmakologischen Schmerztherapie

Schmerztherapie ist seit langer Zeit ein Bestandteil der Menschheitsgeschichte. Erste Zeugnisse der Therapie mit Opium lassen sich bis 6000 v. Chr. zurückdatieren.⁴⁷ Im Jahre 1805 wurde von Friedrich Wilhelm Sertürner die Isolierung des Morphins beschrieben.⁴⁸ 1947 gelang Sir Robert Robinson dann die Entdeckung der chemischen Strukturformel des Morphins.⁴⁷

Die wichtigste Handlungsanleitung für die moderne Schmerzmedizin gab die World Health Organization (WHO) mit der 1986 erschienenen „analgesic ladder“ als Stufenschema zur Behandlung von Tumorschmerzpatienten.⁴⁹ Dabei erfolgt als erste Stufe der Gebrauch von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR). Bei unzureichender Analgesie kann die Ausweitung der Therapie auf schwache Opioide in Stufe zwei oder auf starke Opioide in Stufe drei erfolgen. Zusätzlich kann die Therapie mit einem Adjuvans erfolgen. Sie stellt somit einen ersten multimodalen pharmakologischen Ansatz in der Schmerztherapie dar. Auch heute hat das WHO Stufenschema im klinischen Alltag nicht an Relevanz verloren.⁵⁰

Beim Einsatz von Opioidanalgetika treten häufig Nebenwirkungen und unerwünschte Effekte wie Toleranzentwicklung, Hyperalgesie, Delir sowie Atemdepression auf. Es sollte daher die Einsparung von Opioiden angestrebt werden.^{51, 52} Hierbei kann die Kombination eines Opioids mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin den postoperativen Schmerz mindern und zu einer Verringerung der Opioiddosis führen.^{53,}

54

Eine weitere Strategie zur Reduktion von Opioiden kann durch den alternativen Applikationsweg der patienten-kontrollierten Analgesie (PCA) erreicht werden. Unter PCA versteht man eine durch einen Mikroprozessor gesteuerte Infusionspumpe. Sie gibt eine definierte Schmerzmitteldosis, vom Patienten selbst gesteuert, an diesen ab. Zudem ist es möglich, am PCA-Gerät eine feste Basalrate zu programmieren, welche dem Patienten kontinuierlich eine feste Schmerzmitteldosis verabreicht. Über das PCA-Gerät können sowohl Opioide als auch andere Analgetika wie beispielsweise NSAR verabreicht werden. Die PCA kann nicht nur intravenös angewendet werden, sondern auch subcutan, epidural oder über einen peripheren Nervenkatheter.⁵⁵

Der Vorteil der Administration von Analgetika über PCA ergibt sich dadurch, dass verglichen mit der intermittierenden Bolusgabe von Schmerzmitteln eine bessere Analgesie erreicht wird. Der Patient kann schneller auf ein Absinken der Schmerzmittelkonzentration reagieren und es kommt durch relativ kleine Bolusgaben seltener zu einer Überdosierung der Schmerzmittel.⁵⁵

Die PCA bietet zahlreiche Betriebsarten. Dabei können Initialdosis, Bedarfsdosis, Sperrintervall, Basalrate und Limitation der Dosis an die Patientenbedürfnisse angepasst werden. Die Initialdosis bietet die Möglichkeit zur Titration des Schmerzmittels an die optimale Plasmakonzentration zur Schmerzlinderung. Bei Schmerzspitzen kann eine Bedarfsdosis eingesetzt werden, um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten. Um Überdosierungen zu vermeiden, wird das Sperrintervall eingesetzt, welches über eine definierte Zeitspanne die weitere Gabe von Schmerzmitteln verhindert. Die Basalrate kann als kontinuierliche Hintergrundinfusion dienen und ist unabhängig davon, dass der Patient den Knopf des PCA-Geräts betätigt. Durch eine Limitation der Dosis kann gewährleistet werden, dass der Patient eine vorgegebene Kumulativdosis nicht überschreitet.⁵⁵

Ungeachtet dessen können Opioidnebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Sedierung und Atemdepression auftreten. Diese kann vor allem bei opioid-naiven Patienten auftreten, welche eine kontinuierliche Hintergrundinfusion erhalten. Des Weiteren können auch Programmierungsfehler oder ein fehlendes Verständnis des Patienten für das PCA-Gerät zu einer Überdosierung von Opioiden und somit zur Atemdepression führen.⁵⁵

Um eine Opioidesparung zu erreichen, können Mischungen von Opioiden und Adjuvantien in der PCA eingesetzt werden.⁵⁶ Um die oben genannte Kombination eines Opioids mit einem Adjuvans in einer Infusionslösung herzustellen, müssen gewisse rechtliche Vorgaben gewahrt bleiben.

1.5 Rechtliche Grundlagen zur Stabilitätstestung

In Artikel §22, Absatz 2 des Arzneimittelgesetzes wird die Notwendigkeit einer analytischen Prüfung von neuen Medikamenten festgestellt, welche als obligate Voraussetzung für die Zulassung gilt.⁵⁷

Zur Zulassung neuer Medikamente scheidet nicht nur das Arzneimittelgesetz eine analytische Prüfung vor, sondern auch die Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel.^{57, 58}

Im Jahr 2001 wurden von der Europäischen Agentur für Arzneimittel (EMA) Richtlinien verfasst, die Stabilitätsprüfungen für eröffnete Lösungen reglementiert, welche als Arzneimittel am Menschen eingesetzt werden. Diese Richtlinien beziehen sich auf Arzneimittel, welche in Behältern zur Mehrfachnutzung gelagert werden. Darin ist als Rahmenbedingung festgelegt, dass die Testung unter den im klinischen Alltag vorherrschenden Bedingungen stattfinden muss. Es sollen die gleichen Lösungsmittel und Temperaturen verwendet werden. Außerdem sollte die Entnahme der Proben an multiplen Zeitpunkten stattfinden.

Als Testparameter werden von der EMA Kriterien wie Farbe der Lösung, Klarheit und Sterilität angegeben. Es wird dem Untersucher freigestellt, welche dieser Parameter verwendet werden.

Die Richtlinie legt außerdem fest, dass die verwendeten analytischen Methoden beschrieben und vollständig validiert sein müssen. Zur Darstellung der Ergebnisse sagt die Richtlinie, dass sie in einer Tabelle zusammengefasst und wenn möglich eine Graphik enthalten sollen.³⁵

Mehrere Studien zeigen aber, dass auf vielen Intensivstationen parallel verschiedene Medikamente in den Patienten infundiert werden, ohne chemische oder physikalische Stabilität zuvor zu testen.^{2, 59} Dies kann für die Sicherheit der behandelten Patienten schwerwiegende Folgen haben. Es könnte dabei zur Bildung von Konglomeraten in den Mischungen kommen, welche zu Embolien führen könnten. Auch kann die Konzentration der eingesetzten Substanzen abnehmen, was zu einer verminderten Wirkung der Medikamente führen kann.

1.6 Opioide und Adjuvantien

Folgend wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen eingegangen. Es werden die Wirkweise, Verwendung im klinischen Alltag, Wirkdauer, Metabolismus und unerwünschte Wirkungen beschrieben.

Opioide sind eine heterogene Substanzgruppe, welche agonistisch an den Opioidrezeptoren wirken. Dabei existieren drei Klassen von Rezeptoren: μ , κ , und δ ⁶⁰ Die μ -Rezeptoren finden sich sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) wie auch in der Peripherie. Im ZNS wird über den μ -Rezeptor Analgesie vermittelt. Dabei wird auf spinaler Ebene die Ausschüttung von exzitatorischen Transmittern gehemmt, was wiederum in einer Erregungsminderung von spinothalamischen Projektionsneuronen resultiert.^{61, 62} Neben der Analgesie wird über den μ -Rezeptor auch eine Hemmung von Nervenzellen in der Formatio reticularis vermittelt. Das führt zu Sedierung und, als wichtigste Nebenwirkung der Opioide, zur Atemdepression^{44, 63}. Ebenso kommt es zur zentralen Sympatikolyse, welche zu Bradykardie, Vasodilatation und Miosis führt. Bei einer Überdosierung von Opioiden tritt meist die Trias aus Miosis, Atemdepression und Koma auf.⁴⁴

In der klinischen Schmerztherapie wird bei den Opioidrezeptoragonisten zwischen schwachen und starken Opioiden unterschieden. Bei mittelstarken Schmerzen werden häufig schwache Opioide eingesetzt, welche eine meist kurze Wirkdauer haben und einen „Ceiling-Effekt“ aufweisen.⁶⁴ Das bedeutet, dass selbst bei hohen Dosen dieser Substanzen keine maximale Opioidrezeptoraktivierung erreicht werden kann. Ihr Vorteil besteht darin, dass eine geringere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Nebenwirkungen besteht.⁶⁵ Bei starken Opioiden kommt es hingegen nicht zum „Ceiling-Effekt“, deshalb existiert keine klinisch relevante Maximaldosis.

Opioide besitzen nicht nur eine analgetische Wirkung, sondern können auch pronozizeptive Eigenschaften haben.⁶⁶

Es erfolgt eine Aktivierung des Opioidrezeptors über die Proteinkinase C zur Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors. Infolgedessen werden vermehrt exzitatorische Neurotransmitter freigesetzt. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren stellt das Wichtigste pronozizeptive System bei Erregung von Opioidrezeptoren dar. Aus diesem Grund sind Kombinationen von Opioiden und dem NMDA-Antagonisten Ketamin zur Analgesie sinnvoll. Somit werden die oben genannten, von den Opioiden

induzierten Prozesse bei der Entstehung von Hyperalgesie und Toleranzentwicklung, durch Gabe von Ketamin vermieden.^{44, 52, 67, 68}

1.6.1 Morphin

Morphin ist ein aus dem Schlafmohn isoliertes Phenantren-Alkaloid, welches agonistische Eigenschaften am Opiatrezeptor aufweist (Abbildung 1). Dabei wirkt Morphin hauptsächlich am μ -Rezeptor.⁴⁴

Es vermittelt hierdurch zentrale Wirkungen wie Analgesie, Sedierung, Atemdepression, Miosis, Emesis.

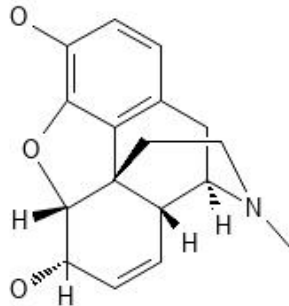


Abbildung 1: Strukturformel Morphin

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Zu den peripheren Wirkungen, welche über den μ -Rezeptor vermittelt werden, gehören Obstipation, Tonuserhöhung von Sphinkteren (Harnblase, Pylorus, Gallenblase) sowie durch Histaminfreisetzung bedingt Hautrötung, Urtikaria und starker Juckreiz.⁶³

Die Wirkdauer von Morphin beträgt bei oraler, intramuskulärer, subkutaner und intravenöser Applikation 4 bis 6 Stunden. Werden allerdings retardierte Morphinpräparate angewendet, kann sich die Wirkdauer deutlich verlängern. Der Eintritt der Morphinwirkung variiert je nach Applikationsweise. So beginnt bei intravenöser Applikation der Wirkeintritt nach etwa 6 Minuten, bei intramuskulärer und subkutaner Applikation nach 15 bis 30 Minuten und bei oraler Einnahme des Morphins erst nach 30 bis 90 Minuten.⁶⁹

Bei oraler Gabe von Morphin zeigt sich eine sehr schlechte Bioverfügbarkeit (20%-40%) diese ist auf einen hochgradigen First-Pass-Effekt im Gastrointestinaltrakt zurückzuführen.⁷⁰

Die Metabolisierung von Morphin findet vor allem durch Glucuronidierung in der Leber statt. Dabei entstehen Metabolite, welche auch noch Wirkung an Opioidrezeptoren besitzen.⁷¹

1.6.2 Hydromorphon

Hydromorphon ist ein natürliches Opium-Alkaloid, das als selektiver μ -Rezeptoragonist wirkt (Abbildung 2). Seine Wirkung ist analog zu Morphin.⁷²

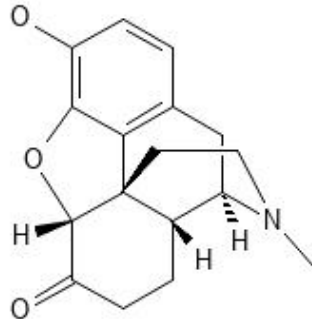


Abbildung 2: Strukturformel Hydromorphon

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Der Wirkeintritt bei Hydromorphon setzt bei intravenöser Gabe nach spätestens 5 Minuten, bei subkutaner Applikation nach 5 bis 10 Minuten ein. Die Wirkdauer ist kürzer als die des Morphins, sie beträgt lediglich 3 bis 4 Stunden. Grund dafür ist das Nichtvorhandensein von aktiven Metaboliten.⁷²

1.6.3 Oxycodon

Oxycodon ist wie Hydromorphon ein natürliches Opioid-Alkaloid, welches allerdings sowohl als reiner Agonist am μ -Rezeptor wie auch am κ - und δ - Rezeptor agiert (siehe Abbildung 3). Oxycodon wirkt dadurch vor allem analgetisch und sedierend.

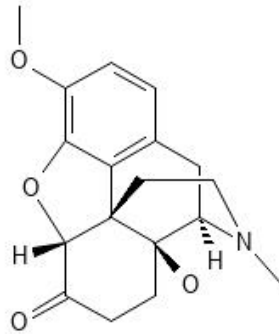


Abbildung 3: Strukturformel Oxycodon

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Die Wirkdauer von Oxycodon beträgt 4 Stunden. Die Elimination von Oxycodon findet in der Leber statt, was dazu führen kann, dass bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen die Wirkung von Oxycodon verstärkt wird.⁷³

1.6.4 Piritramid

Piritramid gehört chemisch gesehen zur Gruppe der Diphenylpropylamin-Derivate (Abbildung 4). Seine Wirkweise beruht auf einem reinen Agonismus am μ -Rezeptor vor allem in Rückenmark, Thalamus und Cortex.

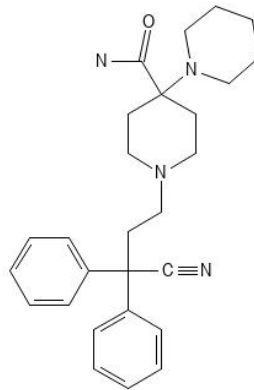


Abbildung 4: Strukturformel Piritramid

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Dabei setzt Piritramid die Schmerzschwelle und Schmerzempfindung herab. Seine Potenz ist geringer als die von Morphin. Die klassischen Opioidnebenwirkungen wie Atemdepression, Obstipation und Emesis sind in therapierelevanten Dosen nur schwach ausgeprägt.

Der Wirkeintritt von Piritramid unterscheidet sich je nach Applikationsform. Intravenös beträgt er 1 bis 2 Minuten, intramuskulär 10 bis 15 Minuten und subkutan bis etwa 30 Minuten. Die Wirkdauer beträgt dann ca. 5 bis 8 Stunden. Piritramid wird in vorwiegend in der Leber metabolisiert.⁷⁴

1.6.5 Levomethadon

Methadon besteht aus einem racematären Gemisch zweier Enantiomere. Das R-(-)-Enantiomer von Methadon wird als Levomethadon bezeichnet (Abbildung 5). Es besitzt eine 50fach höhere analgetische Wirkung als das S-(+)-Enantiomer.

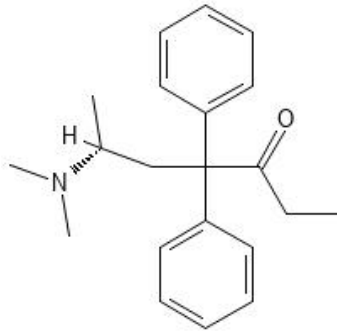


Abbildung 5: Strukturformel für Levomethadon

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Seine analgetische Wirkdauer ist ähnlich dem Morphin bei 4 bis 6 Stunden, wohingegen die atemdepressive Wirkung bis zu 75 Stunden bestehen kann. Dies ist durch die lipophilen Eigenschaften des Levomethadon, durch Anreicherung in der Muskulatur, Haut und im Fettgewebe, begründet. Nach längerer Anwendung von Levomethadon kann es zu einer Abhängigkeit kommen, welche der von Heroin und Morphin ähnlich ist.⁷⁵

1.6.6 Ketamin

Ketamin (Abbildung 6) ist ein, insbesondere in der Notfallmedizin eingesetztes Narkotikum. Seine Hauptwirkung, die Analgesie, wird über die nicht kompetitive Hemmung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und die Aktivierung absteigender, hemmender monoaminerger Schmerzbahnen vermittelt.^{76, 77}

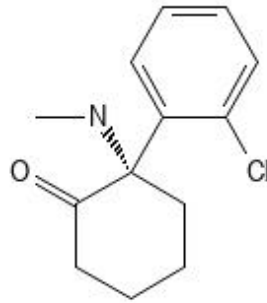


Abbildung 6: Strukturformel Ketamin

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Die Inhibition des NMDA-Rezeptors verhindert den Natrium- und Kaliumstrom in die Zelle^{78, 79}. Diese Wirkung tritt schon bei subanästhetischen Dosen (>20mg/kg KG Ketamin-Racemat) auf.^{77, 78, 80} Deshalb wird Ketamin in subanästhetischen Dosen häufig als adjuvantes Schmerzmittel zur Analgesie mit Opioiden eingesetzt.^{76, 80-82} Es konnte gezeigt werden, dass die adjuvante Anwendung von Ketamin den postoperativen Verbrauch von Morphin und das Auftreten von postoperativem Erbrechen verringert.^{83, 84} Bei höheren Dosen von Ketamin kommt es zur sogenannten dissoziativen Anästhesie. Dabei tritt sowohl eine analgetische wie auch eine hypnotische Wirkung ein, bei welcher aber die Schutzreflexe des Patienten erhalten bleiben.⁵⁶ Bei der dissoziativen Komponente der Ketaminwirkung wird das limbische System erregt und gleichzeitig thalamoneokortikale Bahnen inhibiert.^{78, 79} Dies könnte psychomimetische Nebenwirkungen wie Alpträume während einer Ketaminanästhesie erklären. Deshalb sollte Ketamin bei Analgosedierung stets mit einem Benzodiazepin kombiniert werden.^{56, 85} Ketamin liegt als Racemat vor. Dabei hat das S(+)-Stereoisomer eine zwei bis dreimal höhere analgetische Wirkung als das R(-)-Ketamin.⁸⁶ Ansonsten ist die Wirkung von S(+)-Ketamin und R(-)-Ketamin nahezu identisch.⁸⁷ Ketamin wird in der Leber zu den beiden Metaboliten Norketamin und Hydroxynorketamin verstoffwechselt, welche auch zu einer Hemmung des NMDA-

Rezeptors führen. Dies bedeutet, dass auch nach dem Aufwachen aus der Narkose weiterhin Schmerzfreiheit besteht.⁸⁸ Die terminale Eliminationshalbwertszeit von Ketamin liegt bei 180 Minuten. Ketamin besitzt in höheren Dosierungen (>5mg/kg/h) sympathomimetische Effekte, was den Einsatz von Ketamin bei kardial insuffizienten Patienten limitiert.^{56, 88}

Ketamin als Adjuvans gewählt, kann in Kombination mit Morphin dessen Verbrauch sowie die Nebenwirkungen reduzieren^{82, 89-93} Auch wurde gezeigt, dass eine Kombination von Morphin und Ketamin in einer PCA, einen Opioid-einsparenden Effekt besitzt.^{53, 54, 91}

1.6.7 Midazolam

Midazolam (Abbildung 7) ist ein Imidazobenzodiazepin, welches hypnotisch und sedierend wirkt.

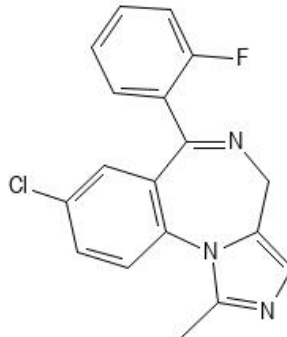


Abbildung 7: Strukturformel für Midazolam

(erstellt mit PubChem Skecher V2.4)

Die Wirkung von Midazolam wird über den Benzodiazepinrezeptor vermittelt, der einen Teil des γ -Aminobuttersäure-Rezeptors darstellt. Die pharmakologischen Wirkungen von Midazolam sind Sedierung, Schlafinduktion, Anxiolyse und anterograde Amnesie.

Darüber hinaus kommt es bei Midazolam zum Ceiling-Effekt so dass, bei weiterer Steigerung der Dosis keine weitere Wirkungsverstärkung mehr auftritt.^{56, 64}

Ein besonderes Merkmal seiner chemischen Struktur stellt der Diazepinring dar, welcher bei saurem pH geöffnet ist. Somit steigt die Wasserlöslichkeit des Midazolams. Bei physiologischen pH-Werten hingegen, schließt sich der Diazepinring und Midazolam wird stark lipophil. Auf Grund dessen besitzt Midazolam einen schnellen Wirkeintritt, welcher innerhalb von einer bis zwei Kreislaufzeiten einsetzt.^{94,}

⁹⁵

Um eine für den klinischen Gebrauch stabile Injektionslösung zu bekommen, wird die basische Substanz Midazolam mit einer Säure versetzt und bildet dadurch ein Salz (Hydrochlorid).⁹⁶

Bei intravenöser Gabe tritt nach ca. 3 Minuten die sedierende Wirkung auf. Die pharmakologische Wirkdauer liegt bei 60 bis 120 Minuten.⁹⁵ Durch die kurze Wirkdauer kann Midazolam gut titriert und somit auch kontinuierlich intravenös appliziert werden.⁵⁶

Midazolam wird in der Leber über das Cytochrom P450-Oxidase System metabolisiert.

Trotz der kurzen Wirkdauer und somit besseren Steuerbarkeit von Midazolam gibt es einige schwerwiegende Nebenwirkungen. So kann es zur Atemdepression, Herz-Kreislaufstillstand bis hin zum Tod kommen, vor allem bei kombinierter Gabe mit Opioiden.

1.7 Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC ist ein gut etabliertes Verfahren zur Auftrennung von Substanzmischungen sowie zur chemischen Stabilitätstestung von Substanzen.⁹⁷ Sie bietet die Möglichkeit, die zu untersuchenden Schmerzmittelmischungen in die Einzelsubstanzen aufzutrennen und die Konzentrationen dieser Einzelsubstanzen über einen Detektor zu bestimmen.

Die zu trennenden Substanzmischungen werden über den Injektor auf eine Trennsäule aufgetragen, welche aus einem mit hydrophoben Alkylketten modifiziertem Kieselgel (reversed-phase = C18 Belegung der Oberfläche) besteht. Dabei ergeben sich Wechselwirkungen der unpolaren Gruppen der Substanzen mit der Trennsäule. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen werden die Substanzen schneller oder langsamer durch das polarere Laufmittel von der Säule eluiert. Dagegen werden die unpolaren Substanzen stärker in der Säule adsorbiert und erst durch Zumischung eines unpolaren Laufmittels, wie beispielsweise Acetonitril, eluiert.

Das Prinzip mittels einer stationären Phase (Trennsäule), aus einer unpolaren Substanz, und einer mobilen Phase (Laufmittel), aus einer polaren Substanz, Analyten zu trennen wird Umkehrphasenchromatographie genannt. Deshalb ist es für die bestmögliche Substanztrennung erforderlich, Kenntnis über die chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Stoffe zu haben. Außerdem muss die optimale Methode zur Mischung der beiden Laufmittel ermittelt werden.

Nachdem die Substanzen mittels der Trennsäule aufgetrennt wurden, bestehen verschiedene Verfahren zu ihrer Detektion. Das in dieser Untersuchung gewählte Verfahren, ist die Detektion über einen UV-Detektor. Bei der UV-Detektion wird die Absorption von UV-Wellen durch die zu untersuchenden Substanzen gemessen. Dazu muss zuvor bestimmt werden, in welchem Wellenlängenbereich die zu messende Stoffe absorbieren. Am effektivsten ist diese Methode der Detektion bei Substanzen, welche in ihrer Struktur Aromaten enthalten.

Die Trennsäule stellt die Grundlage der chromatographischen Trennung dar. Es besteht eine große Auswahl an Säulen, welche je nach zu trennendem Stoffgemisch ausgewählt werden. In dieser Arbeit wurde eine Umkehrphasenchromatographie (polares Laufmittel, unpolare Trennsäule) durchgeführt. Es wurde eine mit langkettigen

Alkylen modifizierte Trennsäule verwendet. Durch die Alkylketten wird die ehemals polare Oberfläche unpolar.

Das Laufmittel kann maßgeblich die Trennschärfe und die Peakform beeinflussen. Deswegen ist es sinnvoll über die Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen wie auch der Laufmittel informiert zu sein, um die ideale Laufmittelmischung zu finden. Es ergeben sich dabei verschiedene Möglichkeiten, die Laufmittel zu vermischen.

Es gibt die Methode, ein isokratisches Mischungsverhältnis zu verwenden. Dies bedeutet, dass die Laufmittel in einem konstanten Verhältnis über die beiden Pumpen gepumpt werden.

Bei einem Laufmittelgradienten verändert sich die Konzentration der Laufmittel über einen Zeitraum. Dieses Prinzip wird verwendet, wenn in einer Mischung gleichzeitig stark polare sowie stark unpolare Substanzen zu trennen sind. Es wird zunächst eine höhere Konzentration des polaren Laufmittels eingesetzt, zur Elution der polaren Substanzen. Danach wird die Konzentration des unpolaren Laufmittels gesteigert, um die unpolaren Substanzen von der Trennsäule auszuwaschen.

1.8 Fragestellung der Arbeit

Um das multimodale Konzept moderner Schmerztherapie zu gewährleisten, ist eine adäquate Pharmakotherapie essenziell. Dabei sollte wie zuvor bereits erwähnt, nach dem Stufenschema der WHO bei der Auswahl der Medikamente vorgegangen werden. Hinsichtlich der Administrationswege der Substanzen hält sich die WHO vage. Bei hospitalisierten Patienten kommen daher am ehesten intravenöse Mischinfusionen von Opioiden mit Adjuvantien in Frage.

Um solche Kombinationen von Analgetika am Patienten jedoch anwenden zu können, sind gesetzlich Prüfungen zur Stabilität von Medikamenten vorgeschrieben.^{57, 58}

Aktuell gibt es nur vereinzelte Studien, in welchen die chemische Stabilität von Medikamentenmischungen in vitro untersucht wurden.^{18, 81} Dabei wurden meist zweifach Mischungen von Medikamenten untersucht. Hinsichtlich der Mischung von Propofol mit Opioiden zeigten sich dabei Instabilitäten.¹⁸ Zu dreifachen Mischungen gibt es bezüglich der Stabilitätstestung, nur vereinzelte Angaben in der Literatur. Über die dreifachen Mischungen zwischen Ketamin, Midazolam und Opioiden liegen aktuell keine Studien vor obwohl diese aktuell im klinischen Setting bei analgosedierten Patienten angewendet werden.⁹⁸

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Stabilität von Mischungen mit dem Fokus auf Opioiden. Entsprechend dem Stufenschema der WHO wurden Opiode mit Adjuvantien kombiniert.⁴⁹ Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde die chemische Stabilität über einen Zeitraum von 72 bzw. 144 Stunden analysiert. Es wurde bestimmt ob die chemische Stabilität bei zwei- und dreifach Mischungen von Opioiden und Ketamin bzw. Midazolam gewährleistet ist.

1.9 Versuchsplanung

Es soll nun darauf eingegangen werden, über welchen Zeitraum die Stabilität der Substanzmischungen untersucht werden sollte. Dabei bezogen wir uns auf den Gebrauch der Einzelsubstanzen und unterteilten die Substanzmischungen in Medikamente für Akutschmerzpatienten und Palliativschmerzpatienten.

In der Akutschmerztherapie werden häufig postoperativ Piritramid, Oxycodon sowie Hydromorphon verwendet.⁹⁹⁻¹⁰¹

In der Palliativmedizin und bei der Behandlung von Tumorschmerz werden hingegen lang wirkende Opioide wie Morphin und Levomethadon verwendet.^{102, 103}

Mischungen mit Adjuvantien wie Midazolam und Ketamin mit Opioiden sind in der Intensivmedizin häufig, da Midazolam zur Analgosedierung eingesetzt wird.^{98, 104}

Die Mischungen für die Akutschmerzpatienten werden über kürzere Zeiträume appliziert. Daher wurde für die Stabilitätstestung ein kürzerer Zeitraum gewählt. Im Gegensatz zu Mischungen für palliative Schmerzpatienten, welche über einen längeren Zeitraum stabil sein sollten. Aus diesem Grund wurden die Schmerzmittelmischungen für Akutschmerzpatienten über einen Zeitraum von 3 Tagen (76 h) und die Mischungen für den palliativen Gebrauch über 6 Tage (144 h) untersucht.

Meist zeigt sich eine Inkompatibilitätsreaktion zu Beginn der Untersuchung als Abfallen der Substanzkonzentration. Aus diesem Grund erfolgten die Probenentnahmen zu Beginn der Untersuchung an Tag 1 alle 30 Minuten, an den folgenden Tagen im 2-stündlichen Rhythmus.

Die untenstehende Tabelle 2: Versuchsanordnung schafft einen Überblick über die verwendeten Kombinationen und die untersuchten Zeiträume.

Tabelle 2: Versuchsanordnung

Substanz 1	Substanz 2	Substanz 3	Dauer in h
Piritramid	Ketamin	-	72
Piritramid	S-Ketamin	-	72
Piritramid	Midazolam	-	72
Piritramid	Ketamin	Midazolam	72
Piritramid	S-Ketamin	Midazolam	72
Oxycodon	Ketamin	-	72
Oxycodon	S-Ketamin	-	72
Oxycodon	Ketamin	Midazolam	72
Oxycodon	S-Ketamin	Midazolam	72
Hydromorphon	Ketamin	-	72
Hydromorphon	S-Ketamin	-	72
Hydromorphon	Ketamin	Midazolam	72
Hydromorphon	S-Ketamin	Midazolam	72
Morphin	Ketamin	-	144
Morphin	S-Ketamin	-	144
Morphin	Midazolam	-	144
Morphin	Ketamin	Midazolam	144
Morphin	S-Ketamin	Midazolam	144
Levomethadon	Ketamin	-	144
Levomethadon	S-Ketamin	-	144
Levomethadon	Midazolam	-	144
Levomethadon	Ketamin	Midazolam	144
Levomethadon	S-Ketamin	Midazolam	144

2 Methoden

2.1 Methodenentwicklung

Bei der Wahl des Laufmittels wurde die Publikation von Schmid *et al* als Vorlage verwendet.⁸¹ Das beschriebene Laufmittel A besteht aus 0,1 M Phosphatpuffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und 1mM SDS. Das Laufmittel A wird unter Titrierung von 85%iger Ortho-Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,1 gebracht. Das Laufmittel B ist Acetonitril (CH_3CN). Die beiden Laufmittel wurden in der oben genannten Publikation isokratisch aus 78% des Laufmittels A und zu 22% aus Laufmittel B gemischt.

Bei Messungen der Stammlösungen von Morphin und Hydromorphon, einem Fluss von 2 mL/min und UV-Detektion bei 215 nm über den Zeitraum von 3 min stellten sich beide Substanzen symmetrisch in den Chromatogrammen dar.

Zur Detektion der Substanzen wurde die Zorbax Eclipse XDB-C18 mit einer Porengröße von 80 Å, einer Partikelgröße von 5 µm, einem Innendurchmesser von 4,6 mm sowie einer Länge von 150 mm verwendet.

Bei der Messung einer Ketaminstammlösung stellten sich unförmige Peaks in den Chromatogrammen dar. Bei einer Laufzeit von 3 min kam es zu keiner Elution des Ketamins. Aus diesem Grund wurde die Messung unter Einbringung eines Laufmittelgradienten wiederholt. Trotzdem zeigte sich kein adäquates Chromatogramm.

Aus diesem Grund wurde ein neues Laufmittel mit geringerem Anteil an SDS (1mM) hergestellt. Dennoch blieb die asymmetrische Form der Peaks unverändert. Das führte zur Überlegung, eine andere Trennsäule für die Messungen zu verwenden. Auf Grund der hohen Polarität der zu untersuchenden Substanzen und der bisher schlechten Darstellung von Midazolam in den Chromatogrammen wurde eine neue Trennsäule gewählt. Als neue Trennsäule YMC-Triart Diol-HILIC mit einer mit einer Porengröße von 120 Å, einer Partikelgröße von 5 µm, einem Innendurchmesser von 0,5 mm sowie einer Länge von 150 mm eingesetzt.

Die HILIC Trennsäule bedingte den Einsatz von neuen Laufmitteln, die in Anlehnung an die Publikation von Kim *et al* hergestellt wurden.¹⁰⁵ Das Laufmittel A bestand aus 0,02%iger Essigsäure in Wasser, das Laufmittel B aus Methanol. Nachdem sowohl

isokratische Methoden mit 50% Laufmittel B und mit 10% Laufmittel B, als auch eine Methode mit einem Gradienten von 1 bis zu 10% Laufmittel B im Zeitraum von 24 min angewendet wurden, ergaben sich dennoch Chromatogramme in denen die Substanzen unzureichend getrennt waren.

Nach Evaluation der bisher entwickelten Methoden, wurde eine neue Methode mit der zuvor verwendeten Zorbax Eclipse XDB-C18 Trennsäule und einem Laufmittelgradienten entwickelt.

Folgende Methode wurde zur Bestimmung, der Konzentrationen in den Schmerzmittelmischungen, entwickelt und angewendet:

Laufmittel: (A) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1M + SDS 1mM mit pH 2,1

(B) Acetonitril

Gradient:	Zeit	%LM (B)	Fluss
	3 min	30	2 mL/min
	6 min	60	2 mL/min
	7 min	30	2 mL/min
	9 min	30	2 mL/min

Trennsäule: Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 4x50 mm
1,8-Micron, 600 bar

Temperatur: 22°C (Raumtemperatur)

2.2 Versuchsdurchführung

Es wurden Perfusor segura FT Perfusoren von B. Braun verwendet. Von diesen ausgehend wurden über ein steriles Schlauchsystem (BD Perfusionsbesteck) die Schmerzmittelmischungen über eine Nadel in ein HPLC Vial geleitet. Nach Abnahme der Probe wurde das Vial unverzüglich in den bei 4°C gekühlten Sampler der HPLC gebracht. Dort erfolgte die Vermessung, mit der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Methode.

Zur Herstellung des Laufmittels A wurden 0,1M (entspricht 13,8g/L) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) und 1mM (entsprechen 0,29g/L) Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Germany) verwendet. Danach wurde unter Kontrolle eines pH-Meters der pH-Wert des Laufmittels mit Ortho-Phosphorsäure 85% (Fluka Chemie AG, CH-9740 Buchs, Schweiz) auf 2,1 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit destilliertem H_2O auf das Volumen von 1L aufgefüllt und anschließend filtriert. Die Filtration des Laufmittels war auf Grund von großen ungelösten Partikeln nötig, um einen Schaden an der HPLC-Säule zu verhindern.

Die verwendeten Substanzen wurden dabei unter sterilen Bedingungen geöffnet und mittels kliniküblicher Kanülen und Spritzen (BD Discardit II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) in einer Perfusorspritze (BD Perfusion, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) in Konzentrationen von 1mg/mL bzw. 2mg/mL gemischt und durch isotone NaCl-Lösung auf 50mL aufgefüllt. Danach wurden die Mischungen in die Perfusorspritzenpumpen (Perfusa segura FT, B. Braun, 05661 Melsungen, Germany) eingebracht.

Tabelle 3: Verwendete Fertigarzneimittel

Wirkstoff	Handelsname	Zubereitung	ATC-Code
Morphin	Morphin-hameln 10mg/mL	Injektionslösung	N02AA01
Oxycodon	Oxygesic injekt 10mg/mL	Injektionslösung	N02AA05
Hydromorphon	Palladon inject 10mg	Injektionslösung	N02AA03
Piritramid	Piritramid hameln 7,5mg/mL	Injektionslösung	N02AC03
Levomethadon	L-Polamidon® 5mg/2mL	Injektionslösung	N02AC06
Ketamin	Ketamin inresa 50mg/mL	Injektionslösung	N01AX03
S-Ketamin	Ketanest S® 5mg/mL	Injektionslösung	N01AX14
Midazolam	Midazolam ratiopharm® 100mg/50mL	Injektionslösung	N05CD08

2.3 Kalibrierung der HPLC- Messungen

Um die Richtigkeit der Injektion der Proben in die Messinstrumente zu gewährleisten, wurden eine fünfmalige Injektion einer definierten Stammlösung mit der Konzentration von 1mg/mL durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Retentionszeiten wie auch die Fläche unter der Kurve protokolliert. Es wurde daraus die Standardabweichung berechnet.

2.4 Testung der mikrobiologischen Sterilität der Mischungen

Es wurden nach den Versuchsreihen die Mischungen in Stichproben auf ihre Sterilität nach Ende des Versuchs getestet. Dabei wurden je drei Tropfen jeder Mischung mit Minimal Essential Serum (incl. 10% Pferdeserum) versetzt und eine Mediumkontrolle angelegt. Die Kulturmedien wurden zwei Tage lang bei 37°C bebrütet und danach im Durchlichtmikroskop beurteilt.

2.5 BtM Genehmigung

Einige in unserer Untersuchung verwendeten Stoffe fallen unter das Betäubungsmittelgesetz (BtMG).¹⁰⁶ Dazu zählen Morphin, Hydromorphon, Oxycodon, Piritramid, Levomethadon und in größeren Mengen auch Midazolam.

Es wurde eine Erlaubnis für den Umgang mit Betäubungsmitteln, wie vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) laut BtMG §3 gefordert, von der Bundesopiumstelle erteilt. Des Weiteren wurde wie im BtMG §17 gefordert, eine Aufzeichnung über die genauen Mengen der Substanzen, deren Verwendung und geführt und verwahrt. Es wurde ebenso ein Vernichtungsprotokoll der Substanzen angelegt und verwahrt wie in §16 gefordert.

2.6 Validierung der Messungen

Zu Beginn jeder Messreihe wurde eine Standardlösung jeder Substanz von 1mg/mL hergestellt und einzeln chromatographiert. Dieser externe Standard wurde zur Aufstellung einer Kalibrierfunktion verwendet, um damit den Analytgehalt der Proben zu bestimmen.

Zur Validierung der Genauigkeit der Messungen wurde die Standardabweichung und die relative Standardabweichung verwendet.

2.7 Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

Aus den erhobenen Daten wurde eine lineare Funktion abgeleitet und die Steigung der Geraden berechnet, anschließend wurde daraus die relative Standardabweichung berechnet.

Zusätzlich wurde, um eine mögliche signifikante Änderung der Konzentrationen zu stützen oder zu verwerfen, eine gepaarte t-Testung aller eingesetzten Substanzen durchgeführt. Hierbei wurden die Konzentrationen der Substanzen zu Beginn der Messungen (Zeitpunkt Null Stunden) sowie zum Ende der Messungen (Zeitpunkt 72 Stunden bzw. 144 Stunden) in Beziehung zu einander gesetzt. Es erfolgte mittels des gepaarten T-Test eine Berechnung der Signifikanz (p-Wert).

Es wurden für die statistischen Berechnungen SPSS Statistics (IBM Company, Version 20) sowie Excel (Microsoft Corporation, Version 2019) verwendet.

Um eine adäquate Darstellung der erhobenen Daten zu gewährleisten wurden Tabellen sowie X-Y-Diagramme mittels Excel (Microsoft Corporation, Version 2019) erstellt.

Auch wurden die durch die HPLC erzeugten Chromatogramme mittels Adobe Photoshop Elements (Adobe Inc, Version 2019) bearbeitet.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Messreihen werden im folgenden Kapitel wie von der EMA Richtlinie gefordert tabellarisch zusammengefasst und zum Teil in Grafiken dargestellt.

107

3.1 Chromatogramme

Unter der in Kapitel 2.1 beschriebenen Methode ergaben sich folgende exemplarisch ausgewählten Chromatogramme:

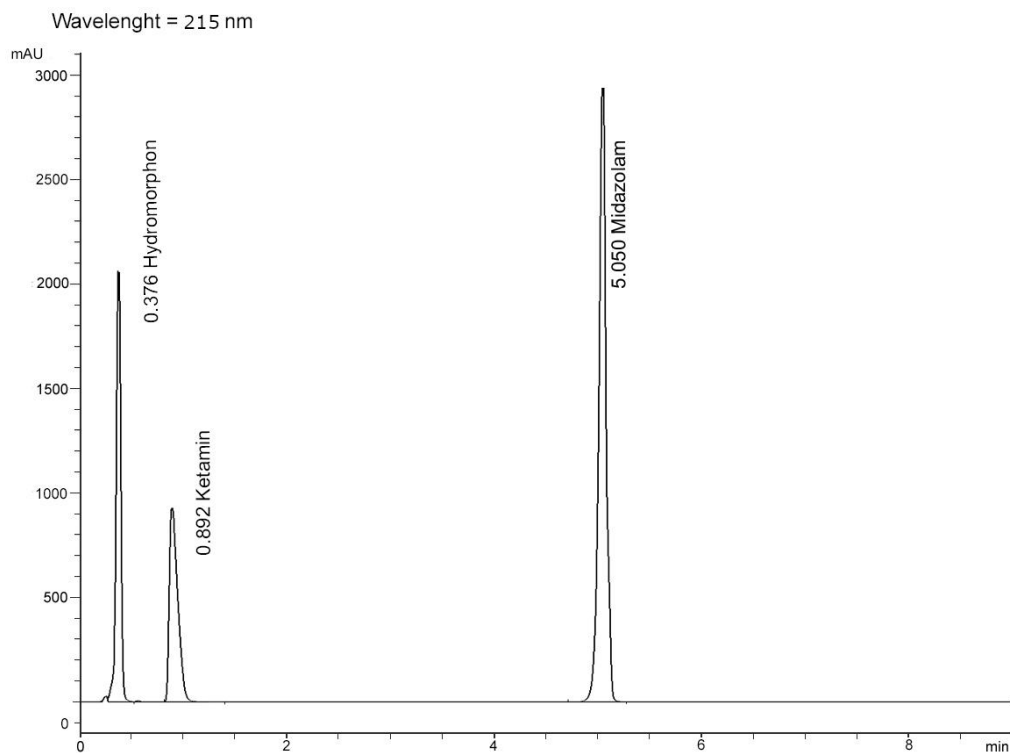


Abbildung 8: Chromatogramm der Mischung von Hydromorphon, Ketamin und Midazolam

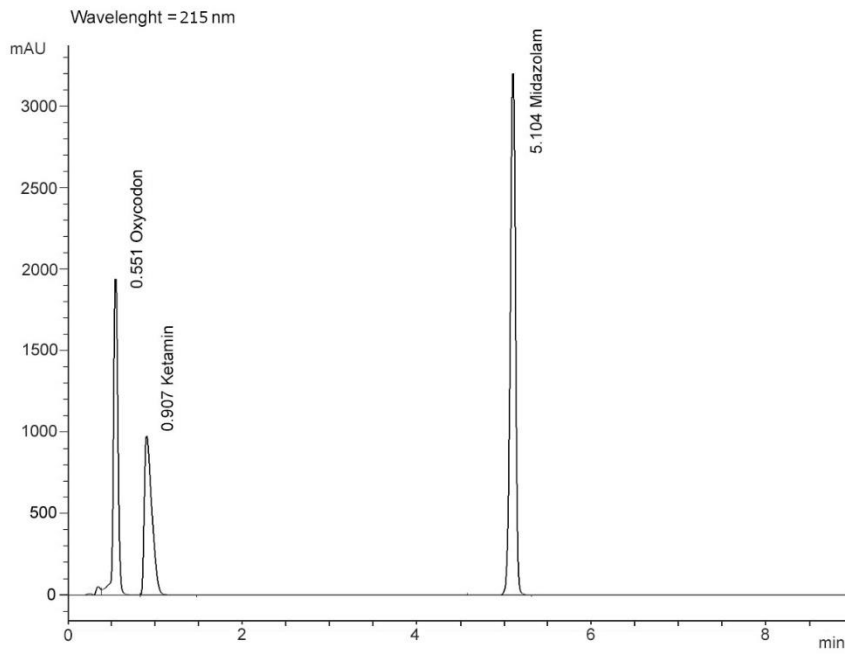


Abbildung 9: Chromatogramm der Mischung von Oxycodon, Ketamin und Midazolam

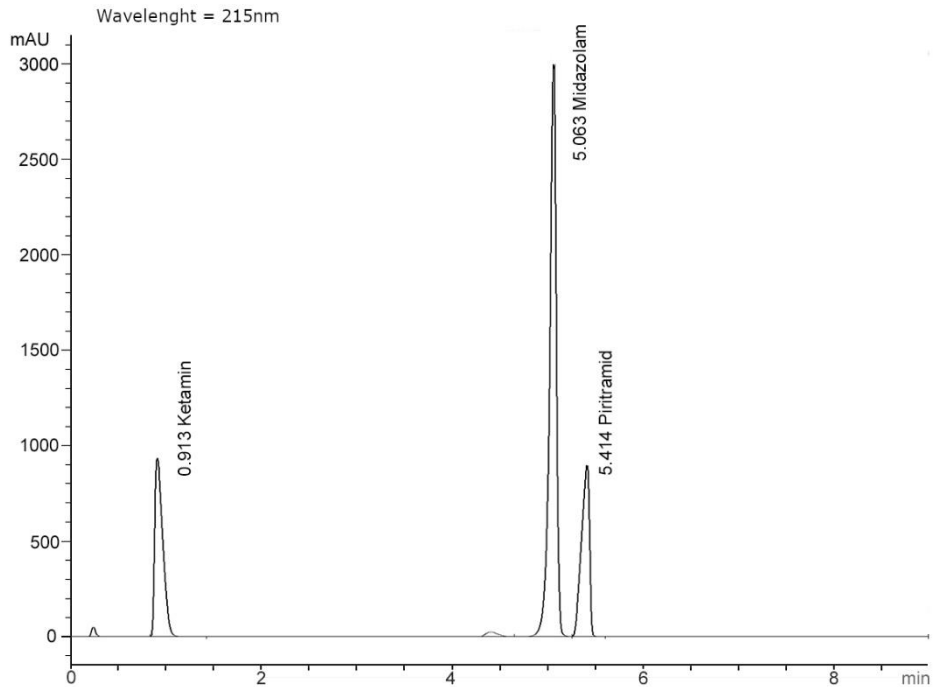


Abbildung 10: Chromatogramm der Mischung von Piritramid, Ketamin und Midazolam

Die nachfolgende Tabelle 4: Retentionszeiten der Substanzen zeigt die jeweilige Substanz und ihre jeweilige Retentionszeit. Dabei zeigt sich, dass nahezu alle in den Mischungen eingesetzten Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten besitzen. Eine Ausnahme bildet das Enantiomer von Ketamin (S-Ketamin), welches aber nie gleichzeitig mit dem Racemat in den Mischungen vorlag.

Tabelle 4: Retentionszeiten der Substanzen

Substanz	Retentionszeit
Morphin	0.34 min
Ketamin	0.91 min
S-Ketamin	0.91 min
Hydromorphon	0.39 min
Oxycodon	0.57 min
Piritramid	5.39 min
Levomethadon	5.67 min
Midazolam	5.06 min

3.2 Selektivität (Auflösung der Chromatogramme)

Die Auflösung von Chromatogrammen dient zur Bestimmung der Trennleistung einer Methode. Mit ihr lässt sich errechnen in welchem Maße zwei verschiedene Substanzen getrennt werden können. In Tabelle 5: Auflösung der Substanzpaare wurde die Auflösung zwischen zwei in unserer Untersuchung verwendeten Substanzen berechnet. Es wurden sämtliche in unserem Versuch vorkommenden Kombinationen bedacht.

Tabelle 5: Auflösung der Substanzpaare

Substanzpaar	Auflösung
Morphin Ketamin	70.68
Hydromorphon Ketamin	33.34
Oxycodon Ketamin	7.95
Ketamin Piritramid	174.87
Ketamin Polamidon	138.97
Ketamin Midazolam	73.91
Morphin Midazolam	551.54
Hydromorphon Midazolam	273.24
Oxycodon Midazolam	262.25
Midazolam Piritramid	21.34
Midazolam Levomethadon	148.41

3.3 Reproduzierbarkeit (Intra-Day Stabilität)

Um die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse zu belegen, wurden von verschiedenen Standardlösungen an unterschiedlichen Tagen Mehrfachinjektionen durchgeführt (n = 5). Es wurden in Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten sowohl die Retentionszeiten der Substanzen als auch die Flächen unter der Kurve jeder Substanz ermittelt. Zur nachfolgenden Bestimmung der Genauigkeit und somit Reproduzierbarkeit wurde die Standardabweichung und relative Standardabweichung verwendet.

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten

Messung	Morphin	Morphin	Ketamin	Midazolam
1	0.335 min	0.320 min	0.907 min	5.071 min
2	0.332 min	0.322 min	0.917 min	5.025 min
3	0.328 min	0.319 min	0.907 min	5.080 min
4	0.329 min	0.322 min	0.913 min	5.079 min
5	0.330 min	0.319 min	0.921 min	5.079 min
Mittelwert	0.331 min	0.320 min	0.913 min	5.067 min
SD	0.003	0.002	0.006	0.024
RSD [%]	0.839	0.473	0.758	0.467

Tabelle 7: Reproduzierbarkeit Fläche unter der Kurve

Messung	Morphin	Morphin	Ketamin	Midazolam
1	8830	9238	5727	12695
2	8902	9298	5735	12602
3	8862	9279	5720	12489
4	8921	9225	5710	12497
5	8824	9258	5723	12522
Mittelwert	8868	9260	5723	12561
SD	42.956	29.653	9.192	87.232
RSD [%]	0.484	0.320	0.161	0.694

3.4 Graphische Darstellung der Messungen

Zur Veranschaulichung der Versuchsreihen wurde einem X-Y-Diagramm die Konzentration der Substanzen auf der Y-Achse gegen Zeitverlauf auf der X-Achse dargestellt. Die Probenentnahmen waren zu Beginn des Versuches alle 10 min, später alle 30 min. An den darauffolgenden Tagen wurde eine Probenentnahme alle 2 h durchgeführt. Die ausgewählten zweifachen und dreifachen Mischungen und die daraus resultierenden Diagramme sollen nun die Versuche veranschaulichen. Es wurden außerdem Diagramme erstellt, welche die Abweichung vom Mittelwert der Konzentrationen der einzelnen Substanzen zeigen. Dabei wurde der Mittelwert der Konzentration einer Substanz als 100% festgelegt. Die X-Achse der Diagramme stellt die Zeit in Stunden dar. Die Y-Achse stellt die Konzentration der Proben in mg/mL bzw. die Abweichung in %, von dem auf 100% normierten Mittelwert einer Substanz, gemessenen Konzentration dar.

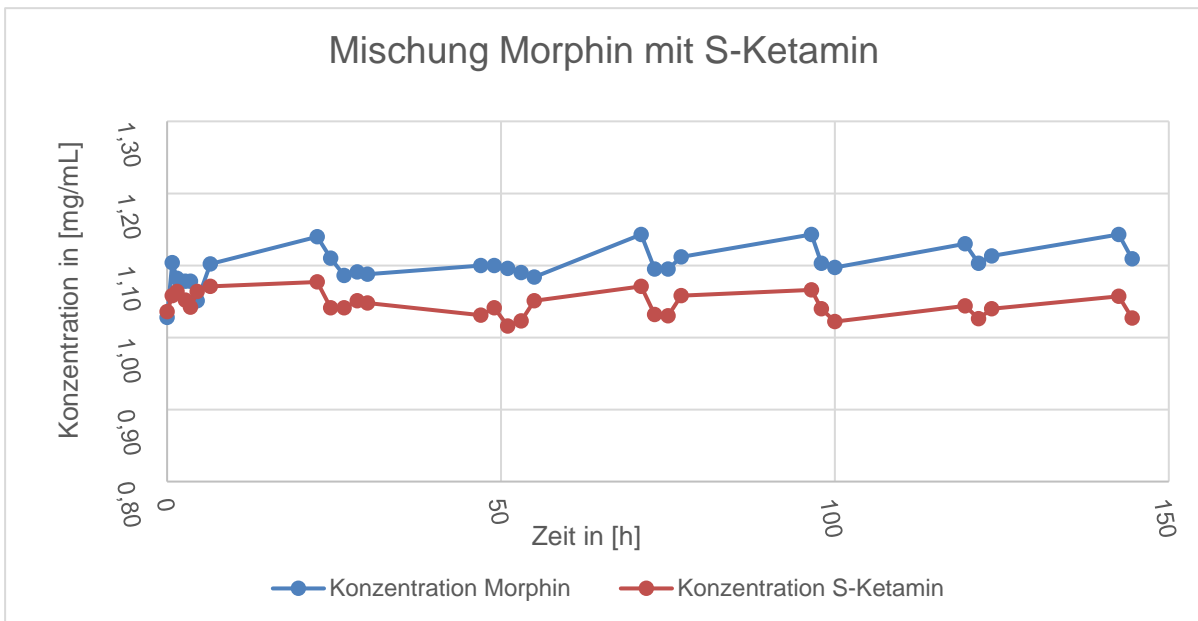


Abbildung 11: X-Y-Diagramm der Konzentration von Morphin sowie S-Ketamin in Abhängigkeit der Zeit

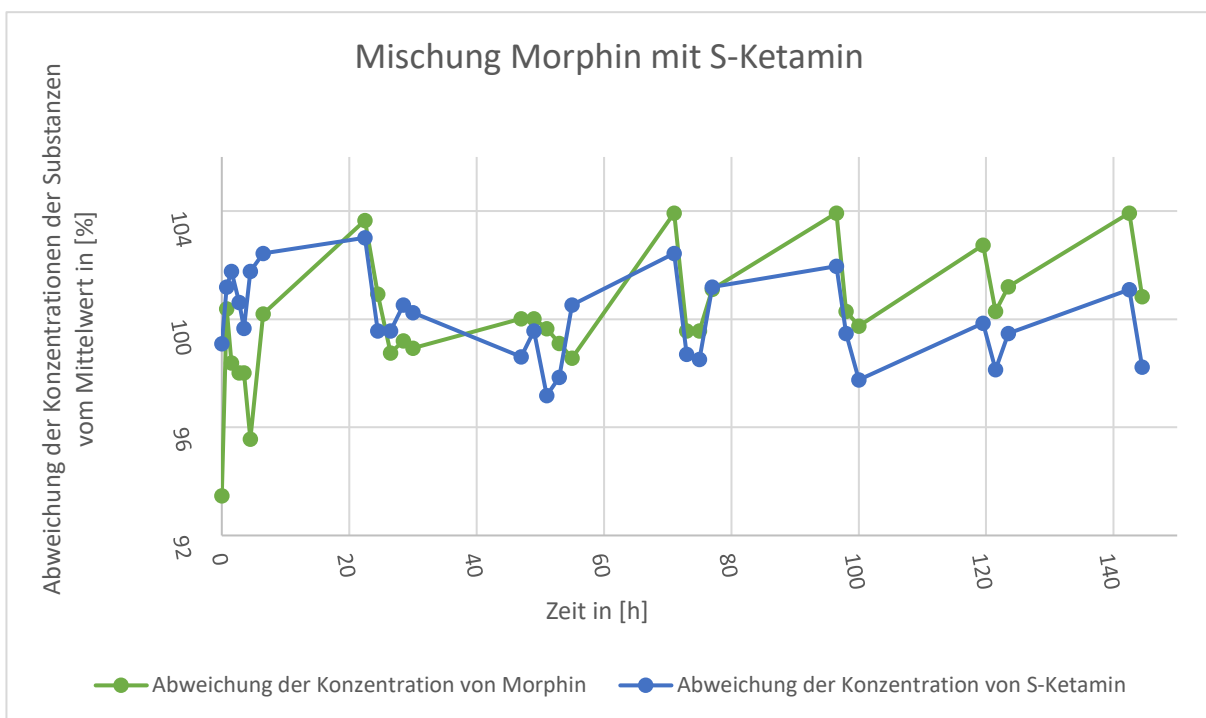


Abbildung 12: X-Y-Diagramm der Abweichung der Konzentration in % von Morphin sowie S-Ketamin in Abhängigkeit der Zeit

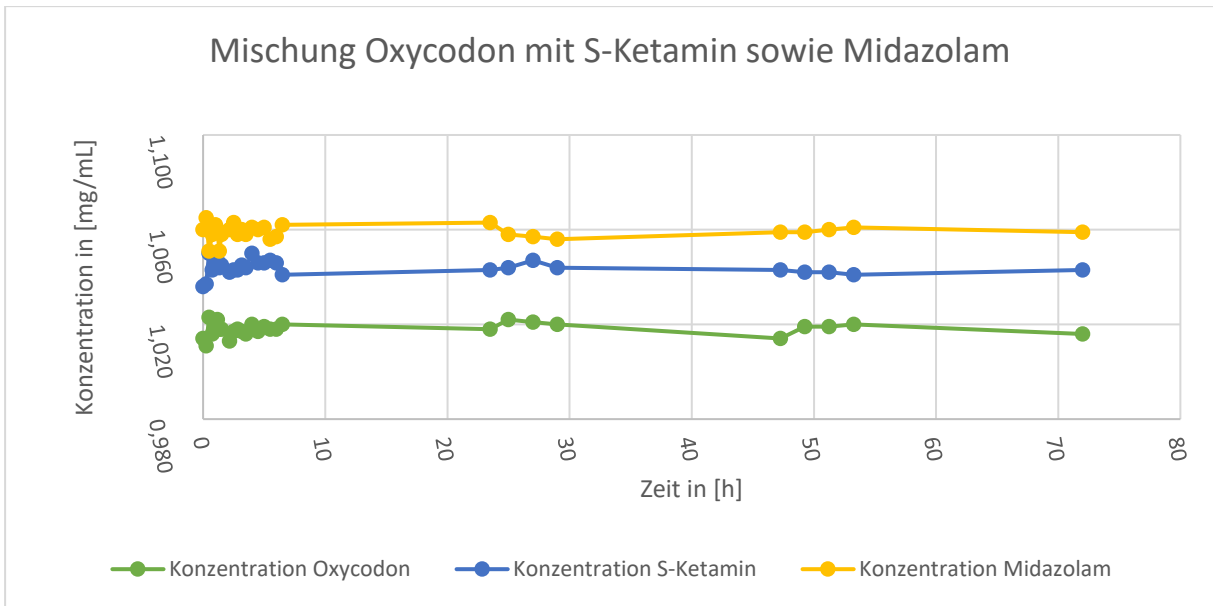


Abbildung 13: X-Y-Diagramm der Konzentration von Oxycodon, S-Ketamin sowie Midazolam in Abhängigkeit der Zeit

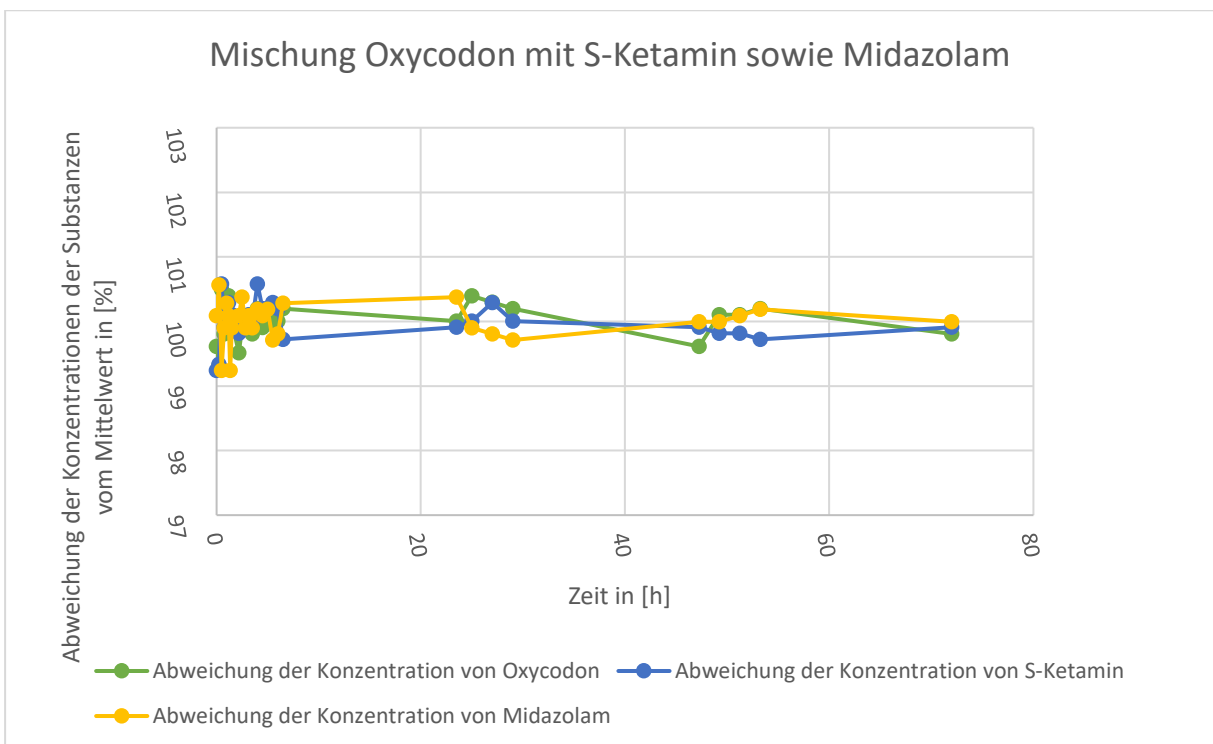


Abbildung 14: X-Y-Diagramm der Abweichung der Konzentration in % von Oxycodon, S-Ketamin sowie Midazolam in Abhängigkeit der Zeit

3.5 Auswertung der Ergebnisse durch lineare Funktion

Um mögliche Konzentrationsveränderungen der vermessenen Mischungen zu zeigen, wurden die gemessenen Konzentrationen in Abhängigkeit der Zeit betrachtet. Dabei ergab sich eine lineare Funktion. Es wurden die Steigungen der Geraden berechnet. Zur besseren Lesbarkeit und Vergleichbarkeit der Steigungen wurden in der Tabelle 8: Steigungen der Substanzen in $10^6 \text{ kg}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$ die Ergebnisse mit 10^6 multipliziert.

Tabelle 8: Steigungen der Substanzen in $10^6 \text{ kg}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$

Serie	Substanz 1	Steigung 1 in $10^6\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$	Substanz 2	Steigung 2 in $10^6\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$	Substanz 3	Steigung3 in $10^6\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{h})$
1	Ketamin	515.7	Piritramid	310.0	X	X
2	Ketamin	127.0	Oxycodon	-45.2	X	X
3	Hydromorphon	116.1	Ketamin	425.8	X	X
4	Piritramid	-193.1	S-Ketamin	-144.7	X	X
5	Oxycodon	139.3	S-Ketamin	150.4	X	X
6	Hydromorphon	380.4	S-Ketamin	484.7	X	X
7	Midazolam	-37.7	Piritramid	-206.7	X	X
8	Ketamin	-88.9	Morphin	394.8	X	X
9	Morphin	318.6	S-Ketamin	-115.9	X	X
10	Midazolam	-13.4	Morphin	292.2	X	X
11	Ketamin	72.3	Levomethadon	28.9	X	X
12	Levomethadon	-120.8	S-Ketamin	-24.8	X	X
13	Levomethadon	-338.6	Midazolam	115.2	X	X
14	Ketamin	144.3	Levomethadon	49.0	Midazolam	195.8
15	Levomethadon	77.2	Midazolam	101.5	S-Ketamin	35.5
16	Ketamin	144.0	Midazolam	128.4	Morphin	278.8
17	Midazolam	17.5	Morphin	17.6	S-Ketamin	8.6
18	Ketamin	-120.5	Midazolam	292.2	Piritramid	-33.3
19	Midazolam	140.9	Piritramid	-20.1	S-Ketamin	-66.5
20	Ketamin	13.1	Midazolam	65.7	Oxycodon	-25.2
21	Midazolam	30.9	Oxycodon	31.5	S-Ketamin	-22.5
22	Hydromorphon	2.6	Ketamin	-0.8	Midazolam	-24.6
23	Hydromorphon	-3.6	Midazolam	-2.8	S-Ketamin	-11.1
24	Midazolam	7.0	Oxycodon	11.2	S-Ketamin	-29.0

3.6 Relative Standardabweichung der Konzentration der Mischungen

In jeder von uns durchgeführten Messreihe wurde von uns die relative Standardabweichung der Massenkonzentrationen der Analyten berechnet, um zu erfassen, in welchem Umfang sich die Messwerte vom Mittelwert unterscheiden. Die Ergebnisse dieser statischen Berechnung sind aus der Tabelle 9: Relative Standardabweichungen der Substanzen in den Versuchen zu entnehmen.

Tabelle 9: Relative Standardabweichungen der Substanzen in den Versuchen

Substanz 1	RSD [%] Substanz 1	Substanz 2	RSD [%] Substanz 2	Substanz 3	RSD [%] Substanz 3
Ketamin	1.232	Piritramid	1.453	X	X
Ketamin	0.900	Oxycodon	1.183	X	X
Hydromorphon	0.914	Ketamin	1.093	X	X
Piritramid	2.971	S-Ketamin	1.680	X	X
Oxycodon	1.414	S-Ketamin	1.969	X	X
Hydromorphon	1.116	S-Ketamin	1.574	X	X
Midazolam	1.854	Piritramid	1.402	X	X
Ketamin	1.419	Morphin	2.688	X	X
Morphin	2.325	S-Ketamin	1.561	X	X
Midazolam	1.539	Morphin	2.110	X	X
Ketamin	0.831	Levomethadon	1.906	X	X
Levomethadon	1.324	S-Ketamin	1.269	X	X
Levomethadon	2.057	Midazolam	1.395	X	X
Ketamin	1.046	Levomethadon	1.457	Midazolam	1.282
Levomethadon	1.174	Midazolam	1.172	S-Ketamin	0.857
Ketamin	1.048	Midazolam	1.034	Morphin	2.083
Midazolam	0.519	Morphin	0.253	S-Ketamin	0.441
Ketamin	0.559	Midazolam	1.117	Piritramid	0.582
Midazolam	0.625	Piritramid	0.598	S-Ketamin	0.667
Ketamin	0.168	Midazolam	0.411	Oxycodon	0.216
Midazolam	0.651	Oxycodon	0.338	S-Ketamin	0.391
Hydromorphon	0.220	Ketamin	0.204	Midazolam	0.210
Hydromorphon	0.214	Midazolam	0.282	S-Ketamin	0.214
Midazolam	0.295	Oxycodon	0.272	S-Ketamin	0.301

3.7 Gepaarte t-Testung

Als weiterer statistischer Test wurde eine gepaarte t-Testung durchgeführt. Dazu wurden die Proben aus den Messungen 2 bis 6 verwendet. Die erste Probe wurde dabei nicht mit einbezogen, da zu Beginn der Versuche die Substanzen noch nicht komplett vermischt waren. Diese zu Beginn entnommenen Proben bilden die Kategorie „Anfang“. Die andere Kategorie bestand aus Messwerten der letzten fünf Proben. Proben, welche die Ersten eines neuen Tages waren, wurden nicht miteinbezogen. Denn diese Proben wiesen durch Verdunstung des Wassers in der Probe über Nacht, zu hohe Messwerte auf. Die fünf Werte aus den Kategorien „Anfang“ und „Ende“ wurden nun mit Hilfe einer gepaarten t-Testung miteinander verglichen. Dabei wurde nach Substanz und Serie unterteilt. Dies veranschaulicht Tabelle 10: gepaarte t-Testung unterteilt nach Substanz und Serie.

Tabelle 10: gepaarte t-Testung unterteilt nach Substanz und Serie

Serie	Substanz	Mittelwert Anfang [mg/mL]	Mittelwert Ende [mg/mL]	SD Anfang	SD Ende	p
1	Ketamin	2.1162	2.1264	0.0143	0.0172	0.285
1	Piritramid	1.0144	1.0250	0.0047	0.0110	0.091
2	Ketamin	1.9540	1.9516	0.0127	0.0264	0.755
2	Oxycodon	1.0622	1.0544	0.0045	0.0145	0.304
3	Hydromorphon	1.0346	1.0360	0.0072	0.0064	0.648
3	Ketamin	2.0196	2.0426	0.0214	0.0061	0.040
4	Piritramid	1.0140	0.9974	0.0211	0.0044	0.101
4	S-Ketamin	1.0324	1.0112	0.0233	0.0033	0.079
5	Oxycodon	0.9758	1.0018	0.0066	0.0145	0.026
5	S-Ketamin	0.9930	0.9996	0.0075	0.0035	0.158
6	Hydromorphon	1.0104	1.0202	0.0147	0.0043	0.263
6	S-Ketamin	0.9970	1.0030	0.0143	0.0048	0.445
7	Midazolam	0.9548	0.9418	0.0136	0.0162	0.252
7	Piritramid	1.0722	1.0526	0.0120	0.0106	0.018
8	Ketamin	1.9384	1.9128	0.0158	0.0083	0.032
8	Morphin	1.0954	1.1314	0.0164	0.0100	0.030
9	Morphin	1.0786	1.1050	0.0188	0.0062	0.056
9	S-Ketamin	1.0560	1.0310	0.0093	0.0084	0.025
10	Midazolam	1.0228	1.0204	0.0059	0.0110	0.727
10	Morphin	1.0868	1.1144	0.0077	0.0113	0.002
11	Ketamin	1.8118	1.8130	0.0083	0.0102	0.831
11	Levomethadon	1.0534	1.0430	0.0158	0.0117	0.235
12	Levomethadon	1.0696	1.0396	0.0081	0.0081	0.003
12	S-Ketamin	0.9548	0.9444	0.0088	0.0070	0.074
13	Midazolam	0.9094	0.9198	0.0147	0.0103	0.207

13	Levomethadon	1.2810	1.2268	0.0127	0.0069	0.002
14	Ketamin	1.0676	1.0740	0.0049	0.0082	0.156
14	Midazolam	0.9336	0.9432	0.0069	0.0097	0.201
14	Levomethadon	1.0572	1.0636	0.0161	0.0194	0.541
15	Midazolam	0.8476	0.8562	0.0122	0.0030	0.203
15	Levomethadon	1.0146	1.0236	0.0122	0.0080	0.174
15	S-Ketamin	0.8894	0.8888	0.0040	0.0101	0.881
16	Ketamin	1.0690	1.0804	0.0052	0.0092	0.107
16	Midazolam	1.0084	1.0194	0.0063	0.0100	0.032
16	Morphin	1.1666	1.1682	0.0167	0.0180	0.918
17	Midazolam	1.0356	1.0398	0.0061	0.0043	0.235
17	Morphin	1.0096	1.0134	0.0021	0.0024	0.027
17	S-Ketamin	1.0382	1.0428	0.0028	0.0022	0.071
18	Ketamin	0.9894	0.9820	0.0040	0.0019	0.033
18	Midazolam	1.0640	1.0808	0.0121	0.0028	0.053
18	Piritramid	1.0216	1.0180	0.0021	0.0029	0.053
19	Midazolam	1.0772	1.0862	0.0036	0.0026	0.012
19	Piritramid	1.0264	1.0270	0.0047	0.0016	0.741
19	S-Ketamin	1.0804	1.0764	0.0053	0.0027	0.275
20	Ketamin	1.0672	1.0684	0.0023	0.0017	0.426
20	Midazolam	1.0094	1.0112	0.0047	0.0013	0.446
20	Oxycodon	1.0112	1.0114	0.0026	0.0015	0.914
21	Midazolam	0.9326	0.9376	0.0042	0.0013	0.078
21	Oxycodon	0.9472	0.9532	0.0033	0.0016	0.022
21	S-Ketamin	0.8850	0.8868	0.0012	0.0026	0.305
22	Hydromorphon	0.9404	0.9424	0.0015	0.0019	0.142
22	Ketamin	0.9364	0.9360	0.0013	0.0010	0.717
22	Midazolam	1.0492	1.0478	0.0036	0.0008	0.431
23	Hydromorphon	0.9734	0.9738	0.0027	0.0015	0.838
23	Midazolam	1.0476	1.0486	0.0027	0.0021	0.537
23	S-Ketamin	1.0416	1.0422	0.0024	0.0018	0.722
24	Midazolam	1.0592	1.0584	0.0053	0.0019	0.735
24	Oxycodon	1.0182	1.0188	0.0049	0.0028	0.815
24	S-Ketamin	1.0446	1.0434	0.0049	0.0023	0.710

Oben aufgeführt befindet sich die Tabelle über die errechneten Mittelwerte der Konzentrationen zu Beginn und am Ende der Messungen. Auch zeigt sie die Standardabweichungen zu Beginn und am Ende der Messungen. Die letzte Zeile stellt den p-Wert dar.

In der nachfolgend aufgeführten Tabelle 11: t-Testung nach Normalisierung [%] unterteilt nach Substanzen wurden die zu Beginn gemessenen Werte zu einem Mittelwert zusammengefasst, welcher 100% darstellt. Im Bezug zu diesem Wert steht, dann der Mittelwert in % am Ende der Messungen. Es wurde dabei nach den von uns

eingesetzten Substanzen unterschieden. Außerdem sind die Standardabweichungen zu Beginn und zum Ende der Messungen aufgeführt. Die letzte Zeile zeigt den p-Wert eines gepaarten t-Test der Kategorien Mittelwert Anfang [%] und Mittelwert Ende [%].

Tabelle 11: t-Testung nach Normalisierung [%] unterteilt nach Substanzen

Substanz	Mittelwert Anfang [%]	Mittelwert Ende [%]	SD Anfang	SD Ende	p
Ketamin	100.00	100.12	0.54	0.95	0.389
S-Ketamin	100.00	99.63	0.87	1.11	0.052
Piritramid	100.00	99.46	1.00	1.27	0.074
Oxycodon	100.00	100.53	0.42	1.44	0.095
Hydromorphon	100.00	100.34	0.76	0.53	0.118
Morphin	100.00	101.76	1.15	1.56	0.000
Levomethadon	100.00	98.70	1.12	2.25	0.013
Midazolam	100.00	100.44	0.78	1.00	0.005

Die folgende Abbildung 15: t-Testung der Substanzen in Bezug auf 100 % der Substanz, zu Beginn (0 h) sowie zum Ende (72 bzw. 144 h) der Messung stellt den Zusammenhang der Tabelle 11: t-Testung nach Normalisierung [%] unterteilt nach Substanzen noch einmal graphisch dar.

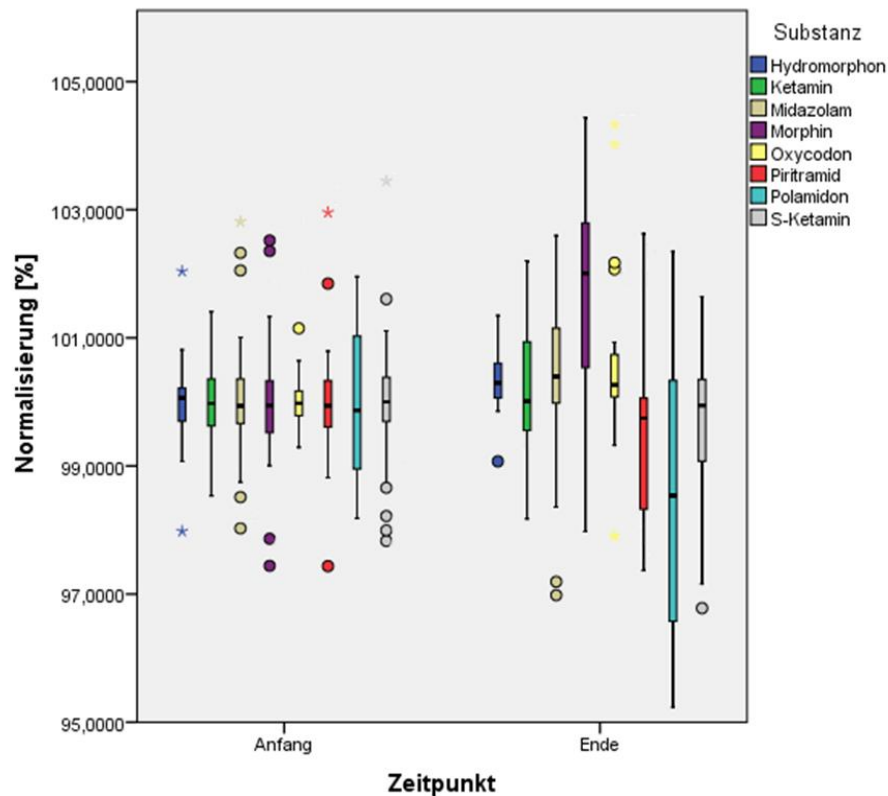


Abbildung 15: t-Testung der Substanzen in Bezug auf 100 % der Substanz, zu Beginn (0 h) sowie zum Ende (72 bzw. 144 h) der Messung

3.8 Mikrobiologische Sterilität der Mischungen

In der Untersuchung zeigte sich, dass bei den verwendeten Mischungen der Schmerzmittel, über einen Zeitraum von 76 sowie 144 Stunden kein Wachstum von Bakterien oder Pilzen nachweisbar war. Die Testung der mikrobiologischen Sterilität der Mischungen wurde beschrieben nach laborüblichen Standards durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die in dieser Arbeit verwendeten Mischungen, keine Gefährdung des Patienten durch Keimwachstum in den Perfusorspritzen besteht, solange diese unter sterilen Bedingungen hergestellt werden.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die chemische Stabilität von Opioiden mit Adjuvantien zu untersuchen. Das nun folgende Kapitel setzt sich mit der Interpretation der gewonnenen Daten unserer Untersuchungen auseinander.

Es sollte die Stabilität der ausgewählten Schmerzmittelmischungen untersucht werden. Um dies nach wissenschaftlichen Kriterien durchzuführen, wurde die Konzentrationen der Substanzen in Abhängigkeit der Versuchszeit mittels HPLC nachgewiesen.

In Kapitel 3.5 wurden mit den gemessenen Konzentrationen, in Abhängigkeit der Messzeiten, die Steigungen der sich ergebenden Kurven berechnet. Dabei wurde ersichtlich, dass sich die Steigungen aller gemessenen Substanzen im Bereich 10^{-3} befinden. Es ergibt sich somit nur eine minimale Steigung. Diese zeigte sich bei einigen Substanzen sogar positiv, was auf etwaige Verdunstungseffekte zurückzuführen ist. Wir können daher davon ausgehen, dass die von uns getesteten Substanzen über die gemessene Dauer von 72 bzw. 144 Stunden chemisch stabil waren.

Dieser Aspekt wird noch gestützt durch die Berechnung der relativen Standardabweichung der Einzelsubstanzen jeder Messung, welche eine Aussage darüber trifft, in welchem Verhältnis zur Standardabweichung die gemessenen Werte schwanken. Dabei ergaben sich in unserer Untersuchung Werte von unter 3 % wie in der Tabelle 9 ersichtlich. Dies bedeutet, dass die Konzentrationen nur in sehr geringem Maße vom gebildeten Mittelwert abweichen. Die Arbeit von Schmid *et al* führt auch die relative Standardabweichung zur Evaluation der Messergebnisse an und begründet mit Hilfe dieser die Stabilität der untersuchten Mischung aus Ketamin und Morphin.⁸¹

Diese Arbeit, zur Stabilität von Schmerzmittelmischungen, basiert auf einer von der Europäischen Agentur für Arzneimittel verfassten Richtlinie zur Stabilitätstestung. Die Agentur gibt ferner auch eine Richtlinie zur Evaluation einer solchen Studie an.²³ Sie stammt vom International Council of Harmonization (ICH) und wurde auch von der FDA als Richtlinie für die Evaluation von Stabilitätstestungen übernommen. Sie gibt als oberes und unteres Akzeptanzkriterium 95 bzw. 105 % der eingesetzten Konzentration einer Substanz vor. Die in Kapitel 3.7 erstellte Tabelle 11: t-Testung nach Normalisierung [%] unterteilt nach Substanzen zeigt, alle Serien aufgetrennt nach

Substanzen und in welchem Maße diese vom gebildeten Mittelwert normiert auf 100% abweichen. Somit sind in dieser Tabelle alle Messpunkte als Abweichung vom Mittelwert, welcher 100 % der eingesetzten Substanz darstellt, vorzufinden. In dieser Tabelle wird gezeigt, dass kein in den Untersuchungen gemessener Wert kleiner oder größer als 95 bzw. 105 % der in den Mischungen eingesetzten Konzentrationen, war. Dies wäre, laut der Richtlinie des ICH bzw. EMA sowie FDA hinreichend beweisend für die Stabilität der von uns untersuchten Mischungen.²³

Als weitere Möglichkeit, die Stabilität unserer Mischungen zu belegen, wurde eine gepaarte t-Testung unserer Ergebnisse durchgeführt. Es wurden die fünf ersten mit den fünf letzten Messwerten verglichen und nach signifikanten Unterschieden gesucht. Ein nicht signifikanter Unterschied der Werte wäre demnach als Zeichen für Stabilität der Mischungen zu deuten gewesen.

Allerdings stellte sich bei der Auswertung der Ergebnisse des gepaarten t-Test heraus, dass bei einigen Serien sich ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte in der t-Testung ergab. Dieser war allerdings am Ehesten der geringen Standardabweichung der Messwerte zuzuschreiben, die somit die Ergebnisse der t-Testung verzerrten. Dadurch ergeben sich die in Tabelle 10 sowie Tabelle 11 einzusehenden p-Werte von weniger als 0.05 bzw. 0.01 für einige Messserien.

4.1 Validierung der Ergebnisse

Als Maß für die Selektivität von Chromatogrammen gilt die Auflösung der Chromatogramme. Sie wurde auch in unserer Untersuchung herangezogen, um die Selektivität zu belegen.

Es wird in Tabelle 5 ersichtlich, dass für keines unserer Substanzpaare eine Auflösung unter $R=1.25$ vorliegt. Eine Auflösung unter diesem Wert würde für eine nicht ausreichende Trennleistung sprechen. Den von uns berechneten geringsten Wert besitzt das Substanzpaar aus Oxycodon und Ketamin. Er liegt bei $R=7.95$ und ist ausreichend für eine Trennung der Substanzen.

Somit kann von einer genügenden Selektivität unserer Methode ausgegangen werden. Dies zudem durch die Chromatogramme belegt, in welchen eine klare Trennung der Peaks zu erkennen ist.

Die Präzision der Messungen wurde über stichprobenartig durchgeführte konsekutive Mehrfachinjektionen einer Standardlösung ermittelt. Dabei wurden, wie in Kapitel Reproduzierbarkeit (Intra–Day Stabilität) zu sehen, die Retentionszeiten und die Fläche unter der Kurve bestimmt.

Es wurde dann die Standardabweichung und die relative Standardabweichung berechnet. Dabei ist in den Tabellen ersichtlich, dass die relativen Standardabweichungen sowohl der Retentionszeiten als auch der Flächen unter der Kurve unter 1% betragen. Dies lässt folglich die Aussage zu, dass die chromatographischen Eigenschaften der Trennsäule konstant sind. Somit werden die Stoffe immer im gleichen zeitlichen Abstand zur Injektion detektiert. Somit konnte die Reproduzierbarkeit unserer Messungen bestätigt werden.

Die Richtigkeit der Messungen wurde durch eine vermessene Standardlösung gewährt. Dabei wurde eine Lösung jeder getesteten Substanz mit der Konzentration von 1mg/mL hergestellt. Die Lösung wurde dabei wie im klinischen Gebrauch üblich mit NaCl verdünnt.

Dieser Standard diente zur Integration der während der Untersuchung erhaltenen Chromatogramme und zur Berechnung der Konzentration der Lösungen.

4.2 Konzentrationsabweichungen in den Mischungen

In den im vorhergehenden Kapitel dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass die gemessenen Konzentrationen deutlich von den von uns erwarteten Konzentrationen von 1 bzw. 2mg/mL abweichen.

Dies lässt sich auf die Verwendung der kliniküblichen Injektionsnadeln zurückführen, welche in ihrer Präzision abweichen. Mit ihnen wurden die Mischungen hergestellt, was so auch im klinischen Alltag gebräuchlich ist. Dabei könnte es durch den Fehler, welchen die handelsüblichen Spritzen besitzen, zu deutlichen Abweichungen der eigentlich gewünschten Mengen der Substanzen gekommen sein. Daraus resultiert eine Abweichung der Konzentration in den Messungen. Bei den 50mL Spritzen von B.Braun ergab sich ein Fehler von 1%. Dies wird in Tabelle 12: Abweichungen der Konzentrationen in den Spritzen dargestellt.

Tabelle 12: Abweichungen der Konzentrationen in den Spritzen

Messung	Abweichung
1	-0.674%
2	0.984%
3	0.074%
4	1.264%
5	1.324%
6	1.728%
7	1.062%

Auch können Konzentrationsabweichungen durch das Restvolumen im Infusionssystem entstehen. In dieser Arbeit wurde an der Perfusorpumpe ein Infusionssystem angeschlossen, wie es der Anwendung im klinischen Alltag entspricht. In diesem System bleibt immer ein Restvolumen, durch dieses könnten sich Konzentrationsänderungen der Substanzen in den Mischungen ergeben haben

4.3 Limitationen

Die Arbeit beschränkte sich auf die Stabilität von Schmerzmittelmischungen mit zwei bzw. drei Substanzen über 72 bzw 144 Stunden.

Aussagen zur chemischen Stabilität über längere Zeiträume oder mehr als dreifache Mischungen können daher nicht getroffen werden. Des Weiteren wurden feste Mischungsverhältnisse untersucht. Über andere Mischungsgrade müssten weitere Untersuchungen erfolgen. Auch könnten noch weitere Komponenten zur Stabilität miteinbezogen werden, wie beispielsweise Messungen des pH-Wert oder Turbidimetrie zur Bestimmung von nicht sichtbaren Ausfällungen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die chemische Stabilität von Opioid Mischungen mit Ketamin und/oder Midazolam, wie in unserer Versuchsanordnung dargestellt, als zweifach oder dreifach Mischung über 3 beziehungsweise 6 Tage bestanden hat. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zeigte sich dabei als zuverlässige und effektive Methode zur Stabilitätstestung.

5.1 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Untersuchung decken sich mit der Erfahrung im klinischen Alltag zur Verwendung von Mischungen von Opioiden und Adjuvantien. Dennoch sollte bedacht werden, dass die Überprüfung der chemischen Stabilität von Arzneimittelmischungen einer jeden klinischen Anwendung vorausgehen sollte. Da Inkompatibilitätsreaktionen im klinischen Alltag auftreten können und eine potenzielle Gefährdung für die Patienten darstellen. Weitere Untersuchungen dieser Art, mit anderen Substanzklassen und häufig verwendeten Adjuvantien wären wünschenswert. Dies wird auch im Rahmen des Arzneimittelgesetzes sowie der europäischen Richtlinie zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel gefordert.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Morphin	13
Abbildung 2: Strukturformel Hydromorphon.....	14
Abbildung 3: Strukturformel Oxycodon	15
Abbildung 4: Strukturformel Piritramid	16
Abbildung 5: Strukturformel für Levomethadon	17
Abbildung 6: Strukturformel Ketamin	18
Abbildung 7: Strukturformel für Midazolam.....	20
Abbildung 8: Chromatogramm der Mischung von Hydromorphon, Ketamin und Midazolam	32
Abbildung 9: Chromatogramm der Mischung von Oxycodon, Ketamin und Midazolam	33
Abbildung 10: Chromatogramm der Mischung von Piritramid, Ketamin und Midazolam	33
Abbildung 11: X-Y-Diagramm der Konzentration von Morphin sowie S-Ketamin in Abhängigkeit der Zeit.....	37
Abbildung 12: X-Y-Diagramm der Abweichung der Konzentration in % von Morphin sowie S-Ketamin in Abhängigkeit der Zeit	37
Abbildung 13: X-Y-Diagramm der Konzentration von Oxycodon, S-Ketamin sowie Midazolam in Abhängigkeit der Zeit.....	38
Abbildung 14: X-Y-Diagramm der Abweichung der Konzentration in % von Oxycodon, S-Ketamin sowie Midazolam in Abhängigkeit der Zeit.....	38
Abbildung 15: t-Testung der Substanzen in Bezug auf 100 % der Substanz, zu Beginn (0 h) sowie zum Ende (72 bzw. 144 h) der Messung.....	44

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für die Degradation von Arzneimitteln.....	5
Tabelle 2: Versuchsanordnung.....	26
Tabelle 3: Verwendete Fertigarzneimittel	29
Tabelle 4: Retentionszeiten der Substanzen	34
Tabelle 5: Auflösung der Substanzpaare.....	34
Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten.....	35
Tabelle 7: Reproduzierbarkeit Fläche unter der Kurve	35
Tabelle 8: Steigungen der Substanzen in $10^6 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	39
Tabelle 9: Relative Standardabweichungen der Substanzen in den Versuchen.....	40
Tabelle 10: gepaarte t-Testung unterteilt nach Substanz und Serie.....	41
Tabelle 11: t-Testung nach Normalisierung [%] unterteilt nach Substanzen	43
Tabelle 12: Abweichungen der Konzentrationen in den Spritzen	48

6.3 Quellenverzeichnis

1. Bundesvereinigung K. Die 30 verordnungs - und umsatzstärksten Arzneimittelgruppen. <https://gesundheitsdaten.kbv.de/cms/html/17053.php>
2. Kanji S, Lam J, Johanson C, et al. Systematic review of physical and chemical compatibility of commonly used medications administered by continuous infusion in intensive care units. *Crit Care Med*. Sep 2010;38(9):1890-8.
3. Hedlund N, Beer I, Hoppe-Tichy T, Trbovich P. Systematic evidence review of rates and burden of harm of intravenous admixture drug preparation errors in healthcare settings. *BMJ Open*. 12 2017;7(12):e015912. doi:10.1136/bmjopen-2017-015912
4. Bertsche T, Mayer Y, Stahl R, Hoppe-Tichy T, Encke J, Haefeli WE. Prevention of intravenous drug incompatibilities in an intensive care unit. *Am J Health Syst Pharm*. Oct 2008;65(19):1834-40. doi:10.2146/ajhp070633
5. Maison O, Tardy C, Cabelguenne D, et al. Drug incompatibilities in intravenous therapy: evaluation and proposition of preventive tools in intensive care and hematology units. *Eur J Clin Pharmacol*. Feb 2019;75(2):179-187. doi:10.1007/s00228-018-2602-6
6. Marsilio NR, Silva D, Bueno D. Drug incompatibilities in the adult intensive care unit of a university hospital. *Rev Bras Ter Intensiva*. Jun 2016;28(2):147-53. doi:10.5935/0103-507X.20160029
7. Bergman HD. Incompatibilities in large volume parenterals. *Drug Intell Clin Pharm*. Jun 1977;11(6):345-60. doi:10.1177/106002807701100603
8. Myhr K. Addition of drugs to infusion fluids: pharmaceutical considerations on preparation and use. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1985;82:71-5. doi:10.1111/j.1399-6576.1985.tb02347.x
9. Newton DW. Drug incompatibility chemistry. *Am J Health Syst Pharm*. Feb 2009;66(4):348-57. doi:10.2146/ajhp080059
10. Roche VF. Improving pharmacy students' understanding and long-term retention of acid-base chemistry. *Am J Pharm Educ*. Dec 2007;71(6):122. doi:10.5688/aj7106122
11. Hasselbalch K. Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure desselben und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl. *Biochem Z* 1916. p. 112–144.
12. Henderson LJ, Cohn EJ. The Equilibrium Between Acids and Bases in Sea Water. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 1916;2(11):618-22. doi:10.1073/pnas.2.11.618
13. Foinard A, Décaudin B, Barthélémy C, Debaene B, Odou P. Impact of physical incompatibility on drug mass flow rates: example of furosemide-midazolam incompatibility. *Ann Intensive Care*. Jul 2012;2(1):28. doi:10.1186/2110-5820-2-28
14. Yalkowsky S, Valvani S. Precipitation of solubilized drugs due to injection or dilution. *Drug Intell Clin Pharm* 1977. p. 417-9.
15. Tan CH, Onsieng MK. Pain on injection of propofol. *Anaesthesia*. May 1998;53(5):468-76. doi:10.1046/j.1365-2044.1998.00405.x
16. Masaki Y, Tanaka M, Nishikawa T. Physicochemical compatibility of propofol-lidocaine mixture. *Anesth Analg*. Dec 2003;97(6):1646-51. doi:10.1213/01.ane.0000087802.50796.fb
17. Trapani G, Altomare C, Liso G, Sanna E, Biggio G. Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Curr Med Chem*. Feb 2000;7(2):249-71. doi:10.2174/0929867003375335

18. Gersonde F, Eisend S, Haake N, Kunze T. Physicochemical compatibility and emulsion stability of propofol with commonly used analgesics and sedatives in an intensive care unit. *Eur J Hosp Pharm.* Sep 2017;24(5):293-303. doi:10.1136/ejhpharm-2016-001038
19. Michaels MR, Stauffer GL, Haas DP. Propofol compatibility with other intravenous drug products: two new methods of evaluating IV emulsion compatibility. *Ann Pharmacother.* Mar 1996;30(3):228-32. doi:10.1177/106002809603000303
20. Gin A, Walker S. Notice to Hospitals Regarding Ceftriaxone-Calcium Incompatibility: What's a Clinician to Do? *Can J Hosp Pharm.* Mar 2009;62(2):157-8. doi:10.4212/cjhp.v62i2.447
21. Nakai Y, Tokuyama E, Yoshida M, Uchida T. Prediction of incompatibility of ceftriaxone sodium with calcium ions using the ionic product. *Yakugaku Zasshi.* Jan 2010;130(1):95-102. doi:10.1248/yakushi.130.95
22. Melo SR, Homem-de-Mello M, Silveira D, Simeoni LA. Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2014 5/6 2014;68(3):221-238. doi:10.5731/pdajpst.2014.00974
23. (ICH) ICoH. Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in New Drug Products Q3B (R2) (Revised Guideline). 2006.
24. Hanaki C, Fujii K, Morio M, Tashima T. Decomposition of sevoflurane by sodalime. *Hiroshima J Med Sci.* Mar 1987;36(1):61-7.
25. Sheffels P, Schroeder JL, Altuntas TG, Liggitt HD, Kharasch ED. Role of cytochrome P4503A in cysteine S-conjugates sulfoxidation and the nephrotoxicity of the sevoflurane degradation product fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether (compound A) in rats. *Chem Res Toxicol.* Sep 2004;17(9):1177-89. doi:10.1021/tx049899e
26. Funk W, Gruber M, Wild K, Hobbhahn J. Dry soda lime markedly degrades sevoflurane during simulated inhalation induction. *Br J Anaesth.* Feb 1999;82(2):193-8. doi:10.1093/bja/82.2.193
27. Frimpter GW, Timpanelli AE, Eisenmenger, J. W, Stein HS, Ehrlich LI. Reversible "Fanconi syndrome" caused by degraded tetracycline. *JAMA*1963. p. 111–113.
28. Mendez A, Chagastelles P, Palma E, Nardi N, Schapoval E. Thermal and alkaline stability of meropenem: degradation products and cytotoxicity. *Int J Pharm.* Feb 2008;350(1-2):95-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.023
29. Chatzitakis A, Berberidou C, Paspaltsis I, Kyriakou G, Sklaviadis T, Poullos I. Photocatalytic degradation and drug activity reduction of Chloramphenicol. *Water Research*2008. p. 386 –394.
30. Karimi MA, Mazloum-Ardakani M, Mashhadizadeh MH, Banifateme F. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of hydrazine and isoniazid using H-point standard addition method and partial least squares regression in micellar media. *Croat. Chem. Acta*2009. p. 729 –728.
31. Caviglioli G, Valeria P, Brunella P, Sergio C, Attilia A, Gaetano B. Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. *J Pharm Biomed Anal.* Oct 2002;30(3):499-509. doi:10.1016/s0731-7085(02)00400-4
32. Quaglia MG, Farina A, Donati E, Cotechini V, Bossù E. Determination of MPTP, a toxic impurity of pethidine. *J Pharm Biomed Anal.* Sep 2003;33(1):1-6. doi:10.1016/s0731-7085(03)00256-5
33. Powell MF. Stability of lidocaine in aqueous solution: effect of temperature, pH, buffer, and metal ions on amide hydrolysis. *Pharm Res.* Feb 1987;4(1):42-5. doi:10.1023/a:1016477810629

34. Baker MT, Naguib M. Propofol: the challenges of formulation. *Anesthesiology*. Oct 2005;103(4):860-76. doi:10.1097/00000542-200510000-00026
35. Agency EM. Quality: Stability Guidelines. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/quality/quality-stability>
36. Woller SA, Eddinger KA, Corr M, Yaksh TL. An overview of pathways encoding nociception. *Clin Exp Rheumatol*. 2018 Jan-Feb 2018;36(1):172.
37. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. Oct 2009;139(2):267-84. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
38. Yekkirala AS, Roberson DP, Bean BP, Woolf CJ. Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nat Rev Drug Discov*. Nov 2017;16(11):810. doi:10.1038/nrd.2017.202
39. Lesniak A, Lipkowski AW. Opioid peptides in peripheral pain control. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):129-38.
40. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. Mar 2011;152(3 Suppl):S2-15. doi:10.1016/j.pain.2010.09.030
41. Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. Mar 1991;44(3):293-9.
42. Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, et al. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci*. Sep 2004;24(38):8310-21. doi:10.1523/JNEUROSCI.2396-04.2004
43. Chen Z, Muscoli C, Doyle T, et al. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. *Pain*. Apr 2010;149(1):100-6. doi:10.1016/j.pain.2010.01.015
44. Martyn JAJ, Mao J, Bittner EA. Opioid Tolerance in Critical Illness. *N Engl J Med*. 01 2019;380(4):365-378. doi:10.1056/NEJMra1800222
45. Arendt-Nielsen L, Petersen-Felix S, Fischer M, Bak P, Bjerring P, Zbinden AM. The effect of N-methyl-D-aspartate antagonist (ketamine) on single and repeated nociceptive stimuli: a placebo-controlled experimental human study. *Anesth Analg*. Jul 1995;81(1):63-8.
46. Koppert W, Dern SK, Sittl R, Albrecht S, Schüttler J, Schmelz M. A new model of electrically evoked pain and hyperalgesia in human skin: the effects of intravenous alfentanil, S(+)-ketamine, and lidocaine. *Anesthesiology*. Aug 2001;95(2):395-402.
47. Brook K, Bennett J, Desai SP. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist*. Apr 2017;3(2):50-55. doi:10.1016/j.janh.2017.02.001
48. Jurna I. [Sertürner and morphine--a historical vignette]. *Schmerz*. Aug 2003;17(4):280-3. doi:10.1007/s00482-003-0220-3
49. Ventafridda V, Saita L, Ripamonti C, De Conno F. WHO guidelines for the use of analgesics in cancer pain. *Int J Tissue React*. 1985;7(1):93-6.
50. Engeser P, Kuate Fokan E, Laux G, Szecsenyi J, Krug K, Leutgeb R. [Care of patients with cancer pain in general practices in Germany]. *Schmerz*. Jun 2016;30(3):266-72. doi:10.1007/s00482-016-0110-0
51. Oderda GM, Evans RS, Lloyd J, et al. Cost of opioid-related adverse drug events in surgical patients. *J Pain Symptom Manage*. Mar 2003;25(3):276-83. doi:10.1016/s0885-3924(02)00691-7

52. Koppert W, Schmelz M. The impact of opioid-induced hyperalgesia for postoperative pain. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* Mar 2007;21(1):65-83. doi:10.1016/j.bpa.2006.12.004
53. Bhatia A. Ketamine as an adjunct to patient-controlled analgesia: why, for whom, and how much? *Can J Anaesth.* Mar 2016;63(3):262-4. doi:10.1007/s12630-015-0552-3
54. Wang L, Johnston B, Kaushal A, Cheng D, Zhu F, Martin J. Ketamine added to morphine or hydromorphone patient-controlled analgesia for acute postoperative pain in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Can J Anaesth.* Mar 2016;63(3):311-25. doi:10.1007/s12630-015-0551-4
55. Grass JA. Patient-controlled analgesia. *Anesth Analg.* Nov 2005;101(5 Suppl):S44-61.
56. Fachgesellschaften AdWM, Intensivmedizin DGfAu, Notfallmedizin DIVfl-u. S3-Leitlinie - Analgesie, Sedierung und Delirmanagement in der Intensivmedizin (DAS-Leitlinie 2015). 08/2015. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/001-012l_S3_Analgesie_Sedierung_Delirmanagement_Intensivmedizin_2015-08_01.pdf
57. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln, Bundesministeriums der Justiz (1976). http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/amg_1976/gesamt.pdf
58. Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel, Europäisches Parlament (2001 zuletzt überarbeitet am 26.07.2019). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX%3A32001L0083>
59. Häni C, Vonbach P, Fonzo-Christe C, Russmann S, Cannizzaro V, Niedrig DF. Evaluation of Incompatible Coadministration of Continuous Intravenous Infusions in a Pediatric/Neonatal Intensive Care Unit. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2019 Nov-Dec 2019;24(6):479-488. doi:10.5863/1551-6776-24.6.479
60. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature.* Oct 1996;383(6603):819-23. doi:10.1038/383819a0
61. Heinke B, Gingl E, Sandkühler J. Multiple targets of μ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent A δ - and C-fibers. *J Neurosci.* Jan 2011;31(4):1313-22. doi:10.1523/JNEUROSCI.4060-10.2011
62. Lee MC, Wanigasekera V, Tracey I. Imaging opioid analgesia in the human brain and its potential relevance for understanding opioid use in chronic pain. *Neuropharmacology.* Sep 2014;84:123-30. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.06.035
63. Imam MZ, Kuo A, Ghassabian S, Smith MT. Progress in understanding mechanisms of opioid-induced gastrointestinal adverse effects and respiratory depression. *Neuropharmacology.* 03 2018;131:238-255. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.12.032
64. Kay B. Narcotic analgesia--ceiling effect. *Anesthesiology.* Mar 1985;62(3):371-2. doi:10.1097/00000542-198503000-00035
65. Fachgesellschaften AdWM. Langzeitanwendung von Opioiden bei nicht tumorbedingten Schmerzen (LONTS). https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/145-003l_S3_LONTS-abgelaufen_2015-01.pdf
66. Doherty M, White JM, Somogyi AA, Bochner F, Ali R, Ling W. Hyperalgesic responses in methadone maintenance patients. *Pain.* Feb 2001;90(1-2):91-6.

67. Koppert W. [Opioid-induced analgesia and hyperalgesia]. *Schmerz*. Oct 2005;19(5):386-90, 392-4. Opioidvermittelte Analgesie und Hyperalgesie. Dr. Jekyll und Mr. Hyde der Schmerztherapie.
68. Ruscheweyh R, Sandkuhler J. Opioids and central sensitisation: II. Induction and reversal of hyperalgesia. *Eur J Pain*. Apr 2005;9(2):149-52.
69. MacKenzie M, Zed PJ, Ensom MH. Opioid Pharmacokinetics-Pharmacodynamics: Clinical Implications in Acute Pain Management in Trauma. *Ann Pharmacother*. Mar 2016;50(3):209-18. doi:10.1177/1060028015625659
70. Pond SM, Tozer TN. First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. *Clin Pharmacokinet*. 1984 Jan-Feb 1984;9(1):1-25. doi:10.2165/00003088-198409010-00001
71. DEUTSCHLAND F. Fachinformation Morphin-hameln 10/20/100/200 mg Injektionslösung. Rote Liste® Service GmbH; Mainzer Landstraße 55; 60329 Frankfurt/Main. <http://www.fachinfo.de>
72. DEUTSCHLAND F. Fachinformation Palladon® injekt 2 mg/10 mg/100 mg. Rote Liste® Service GmbH; Mainzer Landstraße 55; 60329 Frankfurt/Main. <http://www.fachinfo.de>
73. DEUTSCHLAND F. Fachinformation Oxygesic® injekt 10mg/1ml, 20 mg/2 ml. Rote Liste® Service GmbH, Mainzer Landstraße 55, 60329 Frankfurt/Main. <http://www.fachinfo.de>
74. DEUTSCHLAND F. Fachinformation Dipidolor®. Rote Liste® Service GmbH; Mainzer Landstraße 55; 60329 Frankfurt/Main. <http://www.fachinfo.de>
75. DEUTSCHLAND F. Fachinformation L-Polamidon®. Rote Liste® Service GmbH; Mainzer Landstraße 55; 60329 Frankfurt/Main. <http://www.fachinfo.de>
76. Hirota K, Lambert DG. Ketamine: new uses for an old drug? *Br J Anaesth*. Aug 2012;107(2):123-6.
77. Chizh BA. Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol*. May 2007;21(3):259-71. doi:10.1177/0269881105062484
78. Aktories F, Hofmann,Starke. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. vol 10. Urban & Fischer; 2009.
79. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. Oct 2003;97(4):1108-16. doi:10.1213/01.ane.0000081061.12235.55
80. Schmid RL, Sandler AN, Katz J. Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes. *Pain*. Aug 1999;82(2):111-25. doi:10.1016/s0304-3959(99)00044-5
81. Schmid R, Koren G, Klein J, Katz J. The stability of a ketamine-morphine solution. *Anesth Analg*. Apr 2002;94(4):898-900, table of contents.
82. Neshar N, Serovian I, Marouani N, Chazan S, Weinbroum AA. Ketamine spares morphine consumption after transthoracic lung and heart surgery without adverse hemodynamic effects. *Pharmacol Res*. Jul 2008;58(1):38-44.
83. Bell RF, Dahl JB, Moore RA, Kalso E. Perioperative ketamine for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(1):CD004603.
84. Niesters M, Martini C, Dahan A. Ketamine for chronic pain: risks and benefits. *Br J Clin Pharmacol*. Feb 2014;77(2):357-67. doi:10.1111/bcp.12094
85. Elia N, Tramer MR. Ketamine and postoperative pain--a quantitative systematic review of randomised trials. *Pain*. Jan 2005;113(1-2):61-70.
86. Hirota K, Lambert DG. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br J Anaesth*. Oct 1996;77(4):441-4.

87. Adams HA, Werner C. [From the racemate to the eutomer: (S)-ketamine. Renaissance of a substance?]. *Anaesthetist*. Dec 1997;46(12):1026-42. Vom Razemat zum Eutomer: (S)-Ketamin. Renaissance einer Substanz?
88. Weinbroum AA. Non-opioid IV adjuvants in the perioperative period: pharmacological and clinical aspects of ketamine and gabapentinoids. *Pharmacol Res*. Apr 2012;65(4):411-29.
89. Javery KB, Ussery TW, Steger HG, Colclough GW. Comparison of morphine and morphine with ketamine for postoperative analgesia. *Can J Anaesth*. Mar 1996;43(3):212-5.
90. Kollender Y, Bickels J, Stocki D, et al. Subanaesthetic ketamine spares postoperative morphine and controls pain better than standard morphine does alone in orthopaedic-oncological patients. *Eur J Cancer*. May 2008;44(7):954-62.
91. Michelet P, Guervilly C, Helaine A, et al. Adding ketamine to morphine for patient-controlled analgesia after thoracic surgery: influence on morphine consumption, respiratory function, and nocturnal desaturation. *Br J Anaesth*. Sep 2007;99(3):396-403.
92. Neshar N, Ekstein MP, Paz Y, Marouani N, Chazan S, Weinbroum AA. Morphine with adjuvant ketamine vs higher dose of morphine alone for immediate postthoracotomy analgesia. *Chest*. Jul 2009;136(1):245-52.
93. Ricciardelli RM, Walters NM, Pomerantz M, et al. The efficacy of ketamine for postoperative pain control in adolescent patients undergoing spinal fusion surgery for idiopathic scoliosis. *Spine Deform*. Feb 2020;doi:10.1007/s43390-020-00073-w
94. Young CC, Prielipp RC. Benzodiazepines in the intensive care unit. *Crit Care Clin*. Oct 2001;17(4):843-62.
95. Nordt SP, Clark RF. Midazolam: a review of therapeutic uses and toxicity. *J Emerg Med*. May-Jun 1997;15(3):357-65.
96. DEUTSCHLAND F. Fachinformation Midazolam-ratiopharm® 100 mg/50 ml, 50 mg/50 ml Injektionslösung. Rote Liste® Service GmbH; Mainzer Landstraße 55; 60329 Frankfurt/Main. <http://www.fachinfo.de>
97. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods--critical review. *J Pharm Biomed Anal*. Jun 2002;28(6):1011-40. doi:10.1016/s0731-7085(02)00047-x
98. Sener S, Eken C, Schultz CH, Serinken M, Ozsarac M. Ketamine with and without midazolam for emergency department sedation in adults: a randomized controlled trial. *Ann Emerg Med*. Feb 2011;57(2):109-114.e2. doi:10.1016/j.annemergmed.2010.09.010
99. Quinlan J, Lobo DN, Levy N. Postoperative pain management: time to get back on track. *Anaesthesia*. 01 2020;75 Suppl 1:e10-e13. doi:10.1111/anae.14886
100. Richebé P, Brulotte V, Raft J. Pharmacological strategies in multimodal analgesia for adults scheduled for ambulatory surgery. *Curr Opin Anaesthesiol*. Dec 2019;32(6):720-726. doi:10.1097/ACO.0000000000000796
101. Muraskaite I, Koscielny S, Komann M, Weinmann C, Meißner W. [Oxycodone, piritramide and tramadol for the management of postoperative pain : A registry study on use and effectiveness in clinical routine]. *Schmerz*. 12 2018;32(6):427-433. doi:10.1007/s00482-018-0322-6
102. Dowell D, Haegerich TM, Chou R. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain--United States, 2016. *JAMA*. Apr 2016;315(15):1624-45. doi:10.1001/jama.2016.1464
103. Heung Y, Reddy A. How to Use Methadone in an Era of an Opioid Epidemic. *Curr Treat Options Oncol*. Mar 2020;21(4):30. doi:10.1007/s11864-020-0724-4

104. Masman AD, van Dijk M, Tibboel D, Baar FP, Mathôt RA. Medication use during end-of-life care in a palliative care centre. *Int J Clin Pharm*. Oct 2015;37(5):767-75. doi:10.1007/s11096-015-0094-3
105. Kim T, London A, Kharasch ED. Simultaneous determination of alfentanil and midazolam in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. Jun 1 2011;55(3):487-93.
106. Betäubungsmittelgesetz (BtMG), Bundesministerium der Justiz (1981). http://www.gesetze-im-internet.de/btmg_1981/index.html
107. Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products. In: EMEA, editor. London2001.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, die mit Ihrer Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht und zu einem guten Ende gebracht haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Dr. Karl Peter Ittner für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit sowie zur Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Michael Gruber und dem gesamten Team von Anästhesielabor H4. Ohne euch, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, wäre diese Arbeit nie möglich gewesen. Vielen, vielen Dank dafür!

Auch danke ich meiner besten Freundin Dr. rer. nat. Verena Dederer für das Lesen meiner Arbeit sowie für ihre Motivation und Hilfe, die mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Dissertation begleitet hat.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie und meinem Partner Angelo danken, für all ihre Unterstützung und emotionalen Beistand.

