

Bestimmung von Extraktiv- und Migrationsstoffen aus pharmazeutischen Kunststoffbehältnissen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Susann Kaiser
aus Leipzig

2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Surmann

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Langner

Disputation am: 07.12.2010

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Abteilung Packaging Development der Bayer Schering Pharma AG angefertigt und vor Ort von Frau Dr. Christine Kempfer betreut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann für die Annahme des Promotionsthemas, die fachliche Betreuung der Arbeit und die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und Ideen.

Herrn Professor Dr. Andreas Langner danke ich für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Großer Dank gilt Frau Dr. Christine Kempfer für die Überlassung dieses spannenden Themas, ihre engagierte Betreuung, sowie stete Diskussions- und Gesprächsbereitschaft. Danke für die mir entgegengebrachte Geduld und die kontinuierlichen Hilfestellungen, die weit über die Belange der Doktorarbeit hinausgingen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Georg Lautner für seine großzügige Unterstützung während der ganzen drei Jahre meiner Arbeit und für die Möglichkeiten an internationalen Seminaren und Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt allen Mitarbeitern und ehemaligen Kollegen der Abteilung Packaging Development, die mich vom ersten Tag an wärmstens aufgenommen haben. Vielen Dank für die anregenden Gespräche und das erfrischende Arbeitsumfeld. Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Labormitarbeitern für die Unterstützung im Labor und die Kreativität und Einsatzbereitschaft bei der Lösung des einen oder anderen Problems. Vielen Dank an Frau Sabrina Avenstrodt für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Extraktions- und Migrationsstudien.

Bei Herrn Martin Schmitz und Frau Marion Schelensky der ehemaligen Abteilung Specialized Analytics möchte ich mich für die Nutzungsmöglichkeit der UPLC-UV-MS und die damit verbundene intensive Unterstützung bedanken.

Ein großer Dank geht an Frau Christine Opp für die Hilfsbereitschaft bei der Entwicklung einer GC-MS Methode und das stete Bemühen neu aufkommende Probleme zu lösen.

Bei Herrn Dr. Mayk Kresse und Frau Dr. Magdalene Krause möchte ich mich für die kritische und gewinnbringende Durchsicht der Arbeit herzlich bedanken.

Frau Dr. Christine Rück gilt mein besonderer Dank für die engagierte Durchsicht der Arbeit und die anregenden Gespräche während der gemeinsamen Doktorandenzeit, die weit über das Thema der Doktorarbeit hinausgingen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Christiane Lowke für das Korrekturlesen meiner Arbeit und vor allem dafür, dass sie es immer wieder geschafft hat, meinen Blick auf das Wesentliche im Leben zu lenken.

Vielen Dank an alle Mitdoktorandinnen der pharmazeutischen und analytischen Entwicklung für die anregenden und ablenkenden Mittagsverabredungen. Danke für die Möglichkeit den Blick zu weiten und die damit verbundene Lösung des einen oder anderen Problems.

Für die Arzneibuchrecherchen zu Beginn der Arbeit möchte ich mich herzlich bei Frau Anke Schramm bedanken.

Mein größter Dank geht an meine liebe Familie, insbesondere an meine Eltern, die nie an mir gezweifelt haben. Danke für das stete Interesse an meiner Arbeit, aber auch das Verständnis für die Tage, an denen ich nicht über die Arbeit sprechen wollte. Vor allem möchte ich mich bei meinem Freund Tilo Weise für sein Durchhaltvermögen und seine stets aufmunternden Worte während der gesamten Zeit herzlich bedanken. Für das entgegengebrachte Vertrauen, den gespendeten Trost, die gemeinsam gefeierten Erfolge und die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen gilt euch mein innigster Dank.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, 2010

Susann Kaiser

I	Abkürzungsverzeichnis.....	1
1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	5
2	THEORETISCHER TEIL.....	9
2.1	KUNSTSTOFFE.....	9
2.1.1	Allgemeines.....	9
2.1.2	Einteilung der Kunststoffe nach ihrer Herstellung.....	10
2.1.3	Thermische Einteilung von Kunststoffen.....	11
2.1.4	Zusatzstoffe	12
2.1.5	Untersuchte Kunststoffe	16
2.2	EXTRAKTIONS- UND MIGRATIONSSTOFFE	21
2.2.1	Extraktivstoffe	22
2.2.2	Migrationsstoffe	22
2.3	REGULARIEN.....	23
2.3.1	Richtlinien der ICH	24
2.3.2	FDA-Leitlinie für die Industrie: Behältnisse für Arzneimittel und biologische Erzeugnisse zur menschlichen Anwendung	28
2.3.3	EMA- Richtlinie über Primärpackmittel aus Kunststoffen.....	29
2.3.4	EMA- Richtlinie zu Grenzwerten von genotoxischen Verunreinigungen	30
2.3.5	Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG	31
2.3.6	Europäisches Arzneibuch	32
2.3.7	PQRI- Handlungsempfehlung über die Durchführung und Beurteilung von Extraktions- und Migrationsstudien für OINDP's	34
3	METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE BESTIMMUNG POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE	37
3.1	ALLGEMEINES	37

3.2	ENTWICKLUNG GASCHROMATOGRAPHISCHER METHODEN FÜR DIE BESTIMMUNG LEICHT FLÜCHTIGER UND FLÜCHTIGER POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE.....	38
3.2.1	Vorversuche	38
3.2.2	Entwicklung einer HS-GC-FID Methode für die Bestimmung leichtflüchtiger potentieller Extraktivstoffe	40
3.2.3	Entwicklung einer GC-MS Methode zur Bestimmung flüchtiger potentieller Extraktivstoffe	47
3.2.4	Geräte und Chemikalien.....	53
3.3	ENTWICKLUNG FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHER METHODEN FÜR DIE BESTIMMUNG NICHT FLÜCHTIGER POTENTIELLER EXTRAKTIV-STOFFE	56
3.3.1	Allgemeines.....	56
3.3.2	Entwicklung einer HPLC-UV Methode für die Bestimmung nicht flüchtiger potentieller Extraktivstoffe.....	56
3.3.3	Entwicklung einer UPLC-UV-MS Methode für die Bestimmung nicht flüchtiger potentieller Extraktivstoffe.....	62
3.3.4	Geräte und Chemikalien.....	68
3.4	ZUSAMMENFASSUNG.....	72
4	VALIDIERUNG DER ANALYTISCHEN METHODEN ZUR BESTIMMUNG POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE.....	73
4.1	Allgemeines	73
4.1.1	Linearität	74
4.1.2	Präzision	74
4.1.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	75
4.1.4	Richtigkeit	75
4.1.5	Selektivität.....	76
4.1.6	Robustheit.....	76
4.2	VALIDIERUNG DER GASCHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN FÜR DIE BESTIMMUNG FLÜCHTIGER POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE	77
4.2.1	Validierung der HS-GC-FID Methode	77

4.2.2	Validierung der GC-MS Methode	83
4.3	VALIDIERUNG DER FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN	88
4.3.1	Validierung der HPLC-UV Methode für die Bestimmung nicht flüchtiger Extraktivstoffe	88
4.3.2	Validierung der UPLC-UV-MS Methode	93
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	98
5	EXTRAKTIONSSTUDIE	99
5.1	ALLGEMEINES	99
5.2	ENTWICKLUNG DER EXTRAKTIONSMETHODEN	100
5.2.1	Auswahl der Extraktionsmittel	101
5.2.2	Entwicklung der Extraktionsverfahren für organische Extraktionsmittel	102
5.2.3	Bestimmung der Extraktionsdauer für die Extraktion mit organischen Extraktionsmitteln	105
5.2.4	Extraktionsmethode mit Wasser als Extraktionsmedium	107
5.2.5	Geräte, Chemikalien und Materialien	108
5.3	EXTRAKTIONSPROFILE	108
5.3.1	Thermoplaste – Ergebnisse und Diskussion	109
5.3.2	Elastomere – Ergebnisse und Diskussion	118
5.3.3	Geräte und Chemikalien	125
5.4	ZUSAMMENFASSUNG	125
6	MIGRATIONSTUDIE	127
6.1	ALLGEMEINES	127
6.2	BEFÜLLUNG, STERILISATION UND EINLAGERUNG	128
6.3	MIGRATIONSPROFILE	130
6.3.1	Wasser als Füllgut - Ergebnisse	131

6.3.2	Kontrastmittel als Füllgut - Ergebnisse	143
6.3.3	Diskussion und Zusammenfassung	154
6.3.4	Material, Geräte und Chemikalien	159
7	KORRELATION ZWISCHEN EXTRAKTIONS- UND MIGRATIONSPROFILIEN	160
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	163
9	SUMMARY AND OUTLOOK	166
10	ANHANG	168
11	VERÖFFENTLICHUNGEN	179
12	LITERATURVERZEICHNIS	180

I Abkürzungsverzeichnis

2-E-1-H	2-Ethyl-1-hexanol
AET	Analytical Evaluation Threshold
AO	Antioxidantien
APcI	Atomic Pressure chemical Ionization
AS	Arzneistoff
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ASTM	American Society for Testing and Materials
B-BHA	2,6-Di-tert-butyl-4-methoxyphenol
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
BPA	Bisphenol A
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human use
CMR	Cancerogen Mutagen Reproduktionstoxisch
COC	Cycloolefincopolymer
COP	Cycloolefinpolymer
CVMP	Comittee for Medicinal Products for Veterinary use
DAD	Diodenarray Detektor
DBATD	2-Dibutylamin-4-6-dithiol-s-triazin
DBP	Dibutylphthalat
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)phthalat
DHBP	2,4-Dihydroxybenzophenon
DHDMBP	2,2`Dihydroxy 4,4` dimethoxybenzophenon
DHMBP	2,2`-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon
DMCPS	Decamethylcyclopentasiloxane
DMF	Drug Master File
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP	Diphenylphosphat
dt	deutsch

DTBHB	3,5-Ditertbutyl-4-hydroxybenzoesäure
DTBHP	3,5-Ditertbutyl-4-hydroxyphenylpropionsäure
DTBP	2,4-Di-tert-butylphenol
EM	Extraktionsmittel
EMEA	European Medicines Evaluation Agency (seit Dezember 2009) EMA = European Medicines Agency)
EI-QMS	Electron-Impact-Quadrupol-Massenspektrometer
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph(ie)
HALS	Hindered Amine Light Stabilizers
HDPE	High Density Polyethylene (Polyethylen hoher Dichte)
HD-UHMW-PE	Polyethylen hoher Dichte und ultrahoher Molekularmasse
HD-HMW-PE	Polyethylen hoher Dichte und hoher Molekularmasse
HMCTS	Hexamethylcyclotrisiloxane
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Headspace
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICH	International Conference on Harmonisation
IT	Identification Threshold
LC	Liquid Chromatography
LDPE	Low Density Polyethylene (Polyethylen niederer Dichte)
LLDPE	Linear low density polyethylene (lineares Polyethylen niederer Dichte)
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MS	Massenspektrometer
MTBC	2,2`Methylenebis(6-t-butyl-4-methylphenol)
ODPA	Octyliertes Diphenylamin
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OINDP	Orally Inhaled and Nasal Drug Products
OMCTS	Octamethylcyclotetrasiloxane
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons

PDA	Photodioden Array
PDE	Permitted Daily Exposure
PE	Polyethylen
PP	Polypropylen
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PQRI	Product Quality Research Institute
PRCA	Pure Red Cell Aplasia
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
QT	Qualification Threshold
RP	Reverse Phase
RT	Reporting Threshold
SCT	Safety Concern Threshold
SIM	Selected-Ion-Monitoring
tAP	tertiär Amylphenol
TD	Tägliche Dosis
TDI	Total Daily Intake
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of Flight
tOP	tertiär Octylphenol
TPP	Triphenylphosphat
TPTP	Tri-p-tolyl phosphate
TTC	Threshold of Toxicological Concern
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient
VU	Verunreinigung
Wdf	Wiederfindung

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Verwendung von Kunststoffen in den verschiedenen industriellen Bereichen gewann in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung [1]. Seit 1950 wächst die jährliche Produktion um 9 % auf ein Hoch von 245 Mio. Tonnen im Jahr 2008 [2].

Mit der Begründung der Polymerchemie durch STAUDINGER in den 1920ern begann die rasante Entwicklung im Bereich der Kunststoffe [3]. Seither halten Kunststoffe Einzug in nahezu alle Bereiche der industriellen Produktion. Nach den aktuellen Zahlen der Plastic Europe Deutschland von 2008 entfallen 38 % der Kunststoffverwertung auf die Verpackungsindustrie. Durch die große Spanne des Eigenschaftsbildes lässt sich eine Verpackung aus Kunststoff den verschiedenen Anforderungen des Verpackungsgutes hervorragend anpassen. Selbst hinsichtlich Designs sind diesem Werkstoff keine Grenzen gesetzt. Auch im Bereich der Arzneimittelverpackung sind Kunststoffe nicht mehr wegzudenken und stellen gerade bei flüssigen Formulierungen aufgrund des leichten Gewichtes, der reduzierten Zerbrechlichkeit und Vielseitigkeit eine gute Alternative zu Glas dar.

Neben den eben erwähnten positiven Eigenschaften weist Kunststoff jedoch einen Nachteil auf. Um die Polymere technisch anwendbar zu machen, müssen ihnen verschiedene Additive (Antioxidantien, UV-Stabilisatoren, Antistatika, Weichmacher usw.) zugesetzt werden. Nur so wird eine ausreichende Verarbeitbarkeit und Haltbarkeit gewährleistet. Außerdem verleihen diese Stoffe Kunststoffen die Eigenschaften, die vom Hersteller und Anwender gewünscht sind. Diese Kunststoffadditive besitzen jedoch die Fähigkeit, aus dem Polymer in das Füllgut zu migrieren. Dieses Problem wird im Bereich der Lebensmittelindustrie schon sehr lange diskutiert. So wurde bereits 1940 ein Patent durch SIBLEY angemeldet, in dem von einer Antioxidantienmischung die Rede ist, welche ein vermindertes Migrationsrisiko an die Gummioberfläche aufweist [4].

1958 erfolgte in den USA die Regulierung der Lebensmitteladditive im Food Additives Amendment. Hier wurde die Verwendung von direkten (Lebensmittelzusatzstoffe) und indirekten (Stoffe, die über Kontakt mit dem Lebensmittel in dieses gelangen) Additiven diskutiert. Schon zu diesem Zeitpunkt wurden Extraktionsstudien empfohlen, um die Unbedenklichkeit der Verpackung zu zeigen [5]. Einer der Gründe für die Einführung dieser

Reglementierung waren die Untersuchungen von LIJINSKY 1957, die ergaben, dass sich im Wachs, welches zur Beschichtung von Milchkartons eingesetzt wurde, kanzerogene Bestandteile befanden [6]. KAUFMAN warnte 1959 vor einer öffentlichen Panikmache aufgrund der Vermarktung dieser Ergebnisse und dem daraus resultierenden Food Additives Amendment [7].

Untersuchungen der Stiftung Warentest von 2005 zeigten, dass trotz aktueller rechtlicher Vorgaben immer noch Lebensmittel auf dem Markt sind, deren Verpackungen Zusatzstoffe mit gesundheitlichem Risiko enthalten, bzw. die darin verpackten Lebensmittel belastet sind [8]. So wurde in Hartkäse der Weichmacher Diethylhexyladipat gefunden, in Babynahrung wurde Semicarbazid (ein Aufschäumer) detektiert, und verschiedene Pesti waren mit epoxidiertem Sojabohnenöl belastet.

Auch im Arzneimittelbereich spielt das Migrationsverhalten von Kunststoffadditiven eine große Rolle, vor allem das von DEHP (Diethylhexylphthalat), einem Weichmacher, dessen toxikologisches Risiko noch heute kontrovers diskutiert wird. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten zeigten die Migration von DEHP und dessen Abbauprodukt 2-Ethyl-1-hexanol aus PVC-Beuteln (Polyvinylchlorid), unter anderem gefüllt mit Vollblut [9], Cyclosporin-Lösung [10] oder Placebolösungen [11], sowie aus Hämodialyseschläuchen [12].

JAEGER und RUBIN entdeckten 1972 die DEHP-Einlagerung im Lungengewebe verschiedener Patienten, nachdem sie Bluttransfusionen aus PVC-Beuteln bekamen. Zu diesem Zeitpunkt war die toxikologische Bedeutung noch unklar [13], jedoch wurde empfohlen, von der Verwendung von PVC im Arzneimittelbereich abzusehen. So wird auch heute in der Fachinformation von Taxolformulierungen darauf hingewiesen, zur Herstellung der Lösung keine PVC-Behältnisse zu nutzen, um eine Gefährdung des Patienten durch DEHP Exposition zu verhindern [14, 15].

2005 zeigten BOVEN et al. ein erhöhtes Vorkommen der Autoimmunerkrankung PRCA (Pure Red Cell Aplasia = Aplasie der roten Blutkörperchen) bei Patienten mit chronischem Nierenversagen, welche mittels Epoetin aus vorgefüllten Spritzen behandelt worden waren. Durch einen Vergleich zeigte sich die Ursache in der Verwendung nicht gecoateter Gummibestandteile, die für ein erhöhtes Migrationsprofil sorgten [16].

Die toxikologischen Effekte von in Lebensmittel oder Arzneimittel migrierten Kunststoffadditiven, führten zu etlichen Veröffentlichungen über Extraktionsverfahren und Analysemethoden für die Bestimmung von Extraktiv- und Migrationsstoffen aus definierten Kunststoffen [17-22]. Auch für die FDA (Food and Drug Administration) [23] und EMEA (European Medicines Evaluation Agency) [24] war dies der Anlass, gesetzliche Regelungen vorzunehmen, welche die Durchführung von Extraktions- und Migrationsstudien für die Zulassung von Arzneimitteln, und die damit verbundene Prüfung auf toxikologische Unbedenklichkeit fordern. Vorschläge zur Art der Durchführung und zum Umgang mit den erhaltenen Ergebnissen sind jedoch nur oberflächlich. Erschwerend kommt hinzu, dass die Hersteller von Kunststoffen und Elastomeren ungern ausführliche Informationen zur Zusammensetzung ihrer Polymere der pharmazeutischen Industrie zur Verfügung stellen, da sie dies als ihr Geschäftsgeheimnis verstehen. Aufgrund der Vielzahl von Kunststoffadditiven, die bei jeder neuen Rezeptur in Frage kommen können, stellt die Identifizierung von Migrationsprofilen immer eine Herausforderung dar. 2006 veröffentlichte das PQRI (Product Quality Research Institute) eine Handlungsempfehlung über den Umgang mit Extraktions- und Migrationsstudien für OINDP's (Orally Inhaled and Nasal Drug Products), eine Anpassung für Parenteralia ist zurzeit in Arbeit [25].

Die bisher veröffentlichten Extraktions- und Analysemethoden wurden entwickelt, um ein Extraktions- oder Migrationsprofil lediglich eines bestimmten Kunststoffes zu erhalten. Mit diesen Methoden konnte demnach nur eine begrenzte Anzahl an Kunststoffadditiven extrahiert und anschließend identifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Analysemethoden zur Identifizierung und Quantifizierung einer großen Anzahl von häufig vorkommenden Kunststoffadditiven, deren Abbauprodukten und Abbauprodukten der Polymere sowie Restlösemitteln aus der Kunststoffherstellung. Die Auswahl dieser potentiellen Extraktiv- und Migrationsstoffe soll aus umfangreichen Literaturrecherchen, Herstellerinformationen und Extraktionsvorversuchen resultieren. Basis für diese Informationsbeschaffung soll eine zuvor festgelegte Kunststoff- und Elastomerauswahl sein, welche häufig auf dem pharmazeutischen Markt zum Einsatz kommen. Die so erhaltene Auswahl von potentiellen Extraktiv- und Migrationsstoffen zeichnet sich durch ein breites Spektrum an chemischen und physikalischen Eigenschaften aus, was die Verwendung unterschiedlicher Analysetechniken unerlässlich macht. Für die Analyse

leicht-flüchtiger Substanzen soll die Headspace-Gaschromatografie eingesetzt werden, für den Nachweis flüchtiger Stoffe wird die Gaschromatografie mit Direktinjektion Verwendung finden, und für die Bestimmung nicht-flüchtiger Komponenten werden zwei verschiedene flüssigchromatografische Methoden entwickelt. Diese Analytik soll anschließend an exemplarisch ausgewählten Stoffen, die die breite Spanne an chemischen und physikalischen Eigenschaften abdecken, validiert werden.

Mit Hilfe dieser Screeningmethoden sollen im Anschluss die Extrakte ausgewählter Kunststoffe und Elastomere untersucht werden. Hierfür werden Extraktionsmethoden entwickelt, die einen breiten Polaritätsbereich abdecken. Die so erhaltenen Extraktionsprofile sollen eine Grundlage für die sich anschließende Migrationsstudie darstellen. Für diesen Zweck werden die auf Extraktionsstoffe untersuchten Kunststoffe und Elastomere zu teilweise komplexen Behältnissen zusammengebaut und, befüllt mit Wasser bzw. einem Kontrastmittel, im Rahmen einer umfangreich geplanten Migrationsstudie eingelagert und anschließend untersucht. Die so erhaltenen Migrationsprofile sollen auf Grundlage der aktuellen Rechtsgrundlage toxikologisch bewertet werden.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 KUNSTSTOFFE

2.1.1 Allgemeines

Bei Kunststoffen (Polymeren) handelt es sich um makromolekulare organische Verbindungen, deren Ketten linear, verzweigt, vernetzt oder verschlauft vorliegen können (siehe Abbildung 1). Je nach Ordnungszustand erfolgt eine Unterscheidung in kristalline (geordneter Molekülaufbau) und amorphe (ungeordneter Molekülaufbau) Strukturen, wobei beide auch nebeneinander vorkommen können (teilkristalline Polymere). Zum einen sind Polymere natürlichen Ursprungs, wie beispielsweise Latex, zum anderen werden sie synthetisch durch Polyreaktionen von Monomeren hergestellt. Synthetische Kunststoffe sind vielfältiger und aus diesem Grund auch verbreiteter. Ursache hierfür ist die Vielzahl an verschiedenen Monomeren und die unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten. Da im Rahmen dieser Arbeit nur synthetische Kunststoffe untersucht wurden, werden die Naturstoffe nicht näher betrachtet.

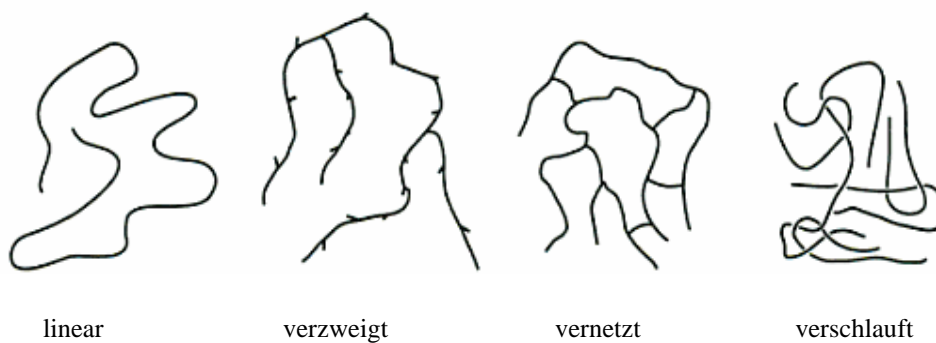


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Strukturen von Makromolekülen [26]

2.1.2 Einteilung der Kunststoffe nach ihrer Herstellung

Kunststoffe entstehen durch Polyreaktionen, die sich in

- Polymerisation,
- Polyaddition und
- Polykondensation

einteilen lassen [27]. Im Weiteren werden nur die Reaktionen vorgestellt, die bei der Herstellung der untersuchten Kunststoffe eine Rolle spielen.

Polymerisationen werden ausgelöst durch Initiatoren (radikalisch oder ionisch), Wärme, ionisierende Strahlen oder Licht. Bei der Verwendung von Ziegler-Natta-Katalysatoren oder Metallocenen kommt es durch Einlagerung des Monomers zwischen Polymerkette und Übergangsmetall des Katalysators zur Kettenverlängerung. Es handelt sich um eine Koordinations- oder Insertionspolymerisation, die bei niedrigen Drücken (unter 30 bar) und geringen Temperaturen (maximal 120 °C) abläuft [28]. Bei Ziegler-Natta-Katalysatoren handelt es sich um metallorganische Mischkatalysatoren, bestehend aus einer metallorganischen Hauptgruppenverbindung, wie Triethylaluminium, und einer Übergangsmetallverbindung, wie Titan-tetrachlorid. Der Mechanismus dieser Reaktion wird in Abbildung 2 verdeutlicht. Auf diese Weise werden unter anderem **Polyethylen, Polypropylen, Cycloolefincopolymer und Cycloolefinpolymer** hergestellt.

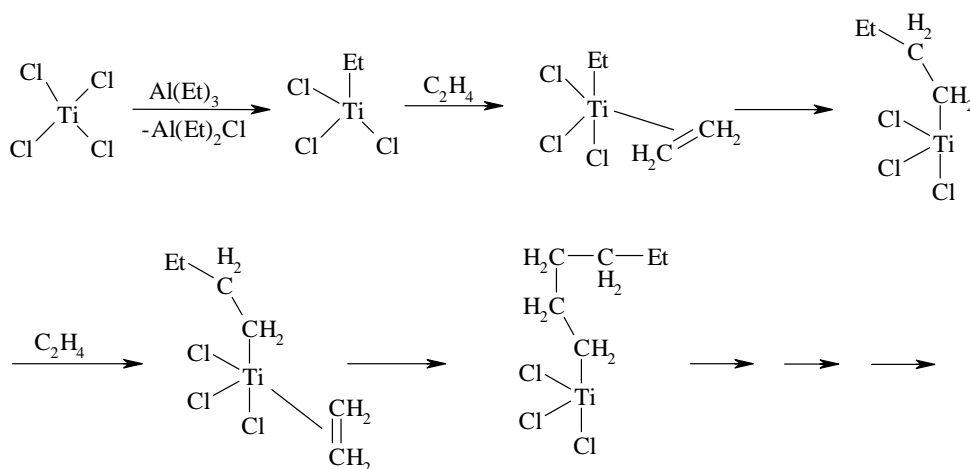


Abbildung 2 Koordinationspolymerisation unter Zuhilfenahme von Ziegler-Natta-Katalysatoren [29]

Bei der **Polykondensation** handelt es sich um eine Stufenreaktion, bei der die Monomere nicht durch Initiatoren, sondern schrittweise über Oligomere, die ihrerseits mit anderen Monomeren oder Oligomeren weiter reagieren, zu längeren Polymerketten wachsen. So laufen bei der Polykondensation mehrere Teilreaktionen parallel ab, unter Abspaltung von niedermolekularen Verbindungen, wie Wasser, Alkoholen oder Halogenwasserstoffen. Eine spezielle Form der Polykondensation ist die Grenzflächenkondensation, bei der die Bildung des Polymers an der Grenzfläche zweier nicht mischbarer Flüssigkeiten abläuft, wobei jede Flüssigkeit eines der beiden Ausgangsmomere enthält. So entsteht aus Phosgen und dem Natriumsalz des Bisphenol A **Polycarbonat**, ein Polyester.

Um Kunststoffen gummielastische Eigenschaften zu verschaffen, werden plastische, kautschukartige, gesättigte oder ungesättigte Polymere vulkanisiert. Mit Hilfe von energiereicher Strahlung oder Peroxiden werden diese vernetzt. Bei Elastomeren mit C,C-Doppelbindungen erfolgt die **Vulkanisation** zumeist mit Schwefel oder schwefelhaltigen Verbindungen. Bei Temperaturen von 120-160 °C (Heißvulkanisation) bilden sich Schwefelbrücken aus, deren Anzahl die Elastizität des Polymers bestimmt. Für diese Reaktion kommen außerdem Aktivatoren oder Verzögerer zum Einsatz, die den Prozess entsprechend beschleunigen oder verlangsamen. Zu den Aktivatoren zählen unter anderem Xanthogenate, Thioharnstoffderivate, Thiazole oder Dithiocarbamate.

2.1.3 Thermische Einteilung von Kunststoffen

Neben der Unterscheidung der Polymere nach ihrem Herstellungsprozess ist es auch üblich, diese anhand ihrer thermischen Eigenschaften zu differenzieren. Daraus erfolgt eine Unterteilung in [30]

- Thermoplaste,
- Elastomere und
- Duroplaste.

Bei **Thermoplasten** handelt es sich um nicht vernetzte Kunststoffe, die bei amorpher Struktur oberhalb ihrer Erweichungstemperatur fließen und bei teilkristalliner Struktur oberhalb ihrer Schmelztemperatur schmelzen. In diesem Zustand können sie verarbeitet werden. Nach dem

Abkühlen behalten sie ihre Gestalt. Der Vorgang des Aufschmelzens und Erstarrens bzw. Kristallisierens kann beliebig oft wiederholt werden. Dies trifft für **Duroplasten** nicht zu. Die chemisch engmaschigen, meist amorphen Kunststoffe liegen in vernetzten Strukturen vor, deren Kettensegmente sich oberhalb der Erweichungstemperatur begrenzt bewegen können. Duroplasten zersetzen sich ab einer bestimmten Temperatur irreversibel. Auch **Elastomere** sind nicht schmelzbar, lediglich erweichbar, wie Duroplaste. Diese weitmaschigen, chemisch vernetzten Polymere sind bis zur Zersetzungstemperatur gummielastisch, eine Verformung nach der Vulkanisation ist nicht mehr möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Elastomere und Thermoplaste untersucht (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Kunststoffe, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden

Thermoplaste	Elastomere
Polyethylen	Polyisoprenkautschuk
Polycarbonat	Chlorierter Butylkautschuk
Polypropylen	Bromierter Butylkautschuk
Cycloolefinpolymer	
Cycloolefincopolymer	

2.1.4 Zusatzstoffe

Kunststoffe und Elastomere sind in der Regel nicht sofort nach der Synthese verarbeitbar und verwend- bzw. haltbar [30]. Aus diesem Grund werden diesen Polymeren Stoffe zugegeben, um

- mechanische Eigenschaften zu verändern oder zu verbessern,
- einen verbesserten Schutz vor Abbau während Weiterverarbeitung oder Anwendung zu erzeugen,
- das Aussehen des Produktes zu verbessern,
- die Verarbeitbarkeit des Rohmaterials zu optimieren,
- die Vulkanisation von Polymeren zu ermöglichen,
- oder um die Leistungsfähigkeit des Produktes zu erhöhen.

Zudem ist es oft sinnvoll, Füllstoffe zuzusetzen, welche die Kosten erheblich reduzieren können [31]. Für diese Arbeit relevante Kunststoffadditive werden im Folgenden näher beschrieben.

2.1.4.1 Antioxidantien

Antioxidantien werden dem Polymer zugesetzt, um dessen Lebensdauer zu verlängern, indem sie den oxidativen Abbau, verursacht durch Wärme, Licht, UV-Strahlung, Scherbeanspruchung bei der plastischen Verarbeitung, metallische Verunreinigungen oder Spuren von Hydroperoxiden aus der Synthese, verlangsamen oder verhindern [30]. Die dabei entstehenden freien Radikale können zum Abbau des Polymers führen. Die durch erhöhte Temperatur verursachte Radikalbildung ist in Abbildung 3 dargestellt.

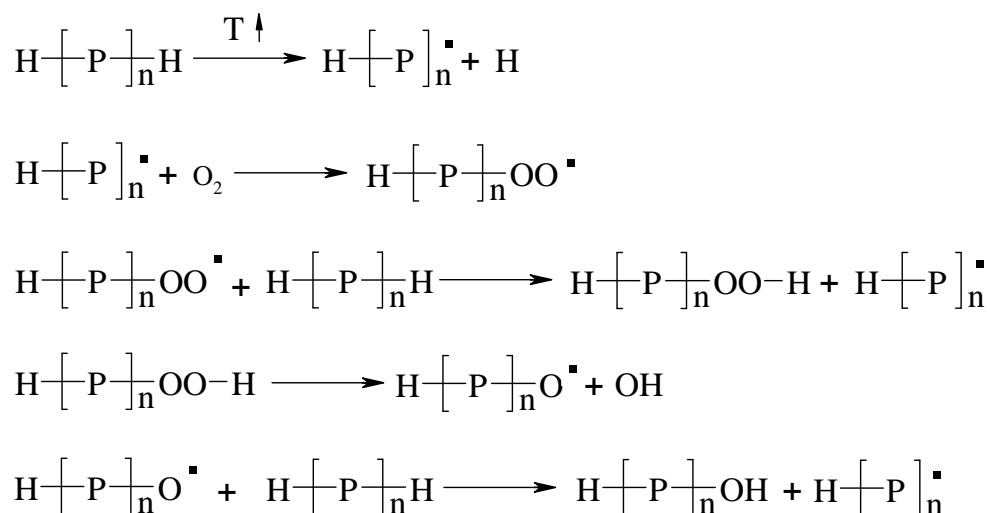


Abbildung 3 Bildung freier Radikale durch den Einfluss erhöhter Temperatur, P = Polymerkette [32]

Folge dieses Prozesses kann eine Kettenspaltung sein, die zur Abnahme der molekularen Masse führt. Alternativ kann es jedoch auch zur Vernetzung und daraus resultierenden Zunahme des Molgewichtes kommen [32]. Für den Anwender wird dies zusammenfassend als Alterungserscheinung sichtbar, was sich in Form von Vergilbung, Glanz- und Transparenzverlust, Oberflächenrissen oder Verlust an mechanischen Eigenschaften äußern kann [33]. Um dies zu verhindern, werden dem Polymer Antioxidantien (= AO) zugesetzt. Zum einen

existieren so genannte Endgruppenbildner (primäre AO), welche durch Reaktion mit freien Radikalen die Oxidation verhindern [34]. Hierzu zählen substituierte Phenole und aromatische Amine. Zum anderen haben sich präventiv wirkende Peroxidzer-setzer (sekundäre AO) etabliert, welche Hydroperoxide und Peroxide in nicht radikalische, stabile Verbindungen umwandeln und somit die Bildung freier Radikale verhindern [32]. Phosphite, Phosphonate und Thio-Verbindungen zählen zu dieser Klasse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige AO auf ihr Migrationsverhalten untersucht, eine Sortierung nach Wirkungsweise ist in Tabelle 2 abgebildet. Chemische Formeln dieser Stoffe befinden sich in den Kapiteln 3.2 und 3.3.

Tabelle 2 primäre und sekundäre AO, welche für diese Arbeit relevant sind

Primäre AO	Sekundäre AO
B-BHA	Irgafos 168
BHT	Additiv 16 Ph. Eur.
MTBC	
Additiv 8 Ph. Eur.	
Additiv 13 Ph. Eur.	
Topanol	
Irganox 1010	
Irganox 1330	
ODPA	
Irganox 565	
Irganox 1076	

2.1.4.2 UV-Stabilisatoren

Die Absorption von ultraviolettem Licht kann im Polymer zum photochemischen Abbau führen, was durch die Bildung von Radikalen mit eventuell begleitender Oxidation bedingt wird. Veränderungen der Farbe, Verlust an Flexibilität und Glanz, sowie Veränderungen der molaren Masse können die Folge sein [33]. Schutzmaßnahmen können Überzüge, wie Metalle oder Lacke sein. Des Weiteren ist es möglich, UV-Absorber einzusetzen, welche in der Lage sind, UV-Strahlung zu absorbieren und Infrarotstrahlung zu emittieren. Vertreter dieser Klasse sind Hydroxybenzophenone, Hydroxyphenylbenzotriazole und Ruß. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten UV-Stabilisatoren befindet sich in Tabelle 3. Chemische Formeln dieser Stoffe befinden sich in Kapitel 3.3.

Tabelle 3 UV-Absorber, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden

UV-Absorber	
DHBP	Tinuvin 326
DHMBP	Tinuvin 327
DHDMBP	Tinuvin 329
Eusolex	Chimasorb 81
Tinuvin P	

2.1.4.3 Weichmacher

Weichmacher kommen bei Polymeren zum Einsatz, um deren Flexibilität, Verarbeitbarkeit und Dehnbarkeit zu erhöhen. Hierbei wird zwischen „innerer Weichmachung“ und „äußerer Weichmachung“ unterschieden. Bei der **inneren Weichmachung** werden zwei verträgliche Monomere mit stark differierenden Glasübergangstemperaturen copolymerisiert, wobei es zu einer festen chemischen Verknüpfung harter und weicher Segmente kommt, was in einer temperaturabhängigen Flexibilität resultiert. Bei der **äußeren Weichmachung** (Primär- und Sekundärweichmacher) handelt es sich um den Zusatz niedermolekularer Stoffe, welche durch Einlagerung in die Polymerketten und die Ausbildung von Nebenvalenzkräften zur Quellung oder Solvataion führen. Primärweichmacher sollen gut gelieren und im Polymer nicht ausschwitzen. Zu diesen zählen Phthalsäureester, wie Diethylhexylphthalat (DEHP) oder Dibutylphthalat (DBP), aber auch Adipate, wie Di-(2-ethylhexyl) adipate (DEA), welches oft mit Sekundärweichmachern, wie epoxidiertem Sojaöl, kombiniert wird. Sekundärweichmacher sind dipolarme, mäßige Gelierer und werden nur in Kombination mit Primärweichmachern eingesetzt, um die Migrationstendenz zu verringern und die Kältefestigkeit sowie Extraktionsbeständigkeit zu erhöhen. Wegen der anhaltenden Diskussion über ein eventuelles genotoxisches Potential von DEHP wird dessen Verwendung stark limitiert und in pharmazeutischen Produkten bewusst darauf verzichtet [15]. Im Rahmen dieser Arbeit wird neben DEHP des Weiteren DBP untersucht. Chemische Formeln dieser Stoffe befinden sich in Kapitel 3.2.

2.1.4.4 Gleit- und Schmiermittel

Die thermoplastische Verarbeitung von Polymeren erfolgt bei amorphen Typen oberhalb der Glasübergangstemperatur, bei kristallinen Werkstoffen oberhalb des Kristallitschmelzpunktes. Die makromolekulare Struktur führt zu Schmelzen mit sehr hoher Viskosität, was zur Folge hat, dass eine Förderung und Verformung nur unter Einfluss von Druck stattfinden kann. Dies kann zu Dissipation führen und ein damit einhergehenden Abbau des Polymers bewirken. Additive, die im Inneren der Polymerphase in der Lage sind, deren rheologische Eigenschaften zu beeinflussen, werden als **innere Gleitmittel** bezeichnet. Sie können die Viskosität erniedrigen oder eine scherverflüssigende und dissipationsmindernde Wirkung haben. Als **äußere Gleitmittel** werden Additive bezeichnet, welche das Verhalten der heißen Kunststoffmasse an Grenzflächen zu anderen Werkstoffen bestimmen. Sie können trennwirksam oder reibungsmindernd sein [33]. Tabelle 4 führt die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gleitmittel auf. Chemische Formeln dieser Stoffe befinden sich in Kapitel 3.3.

Tabelle 4 Gleitmittel, welche in dieser Arbeit untersucht worden sind

Gleitmittel
Erucamid
Oleamid
Stearinsäure

2.1.5 Untersuchte Kunststoffe

Im Folgenden werden die Kunststoffe vorgestellt, welche im Rahmen der Extraktions- und Migrationsstudie untersucht wurden. Dabei handelt es sich um Materialien, die als Bestandteile von Primärverpackungen pharmazeutischer Produkte häufig zum Einsatz kommen.

2.1.5.1 Polyethylen

Polyethylene bestehen aus der Grundeinheit Ethylen und können differenziert werden in

- PE niedriger Dichte (LD-PE),
- Lineares PE niedriger Dichte (LLD-PE),

- PE mittlerer Dichte (MD-PE),
- PE hoher Dichte (HD-PE),
- PE hoher Dichte und hoher Molekularmasse (HD-HMW-PE) und
- PE hoher Dichte und ultrahoher Molekularmasse (HD-UHMW-PE).

Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Verzweigungsgrades und damit verbunden in Dichte und Kristallinität. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich LLD-PE untersucht worden ist, wird im Folgenden nur auf dieses Material eingegangen.

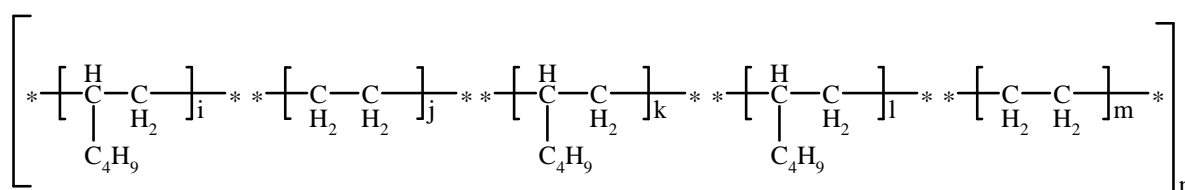


Abbildung 4 Polyethylen, bestehend aus Ethylen und 1-Buten als Comonomer [35]

Bei linearen Polyethylenen niederer Dichte handelt es sich um Copolymere aus Ethylen und 5-10 % Olefinen höherer Kettenlänge. Comonomer des untersuchten LLD-PE ist 1-Buten (siehe Abbildung 4). Diese Copolymerisation mit α -Olefinen führt zu einem geringeren Kristallinitätsgrad durch statistische Kurzkettenverzweigung und damit zu einer geringeren Dichte.

Kunststoffadditive, die bei der Herstellung von LLD-PE zum Einsatz kommen, sind Antioxidantien, UV-Stabilisatoren, Antiblock- und Antislipmittel, aber auch Füllstoffe (z. B. Kreide, Talkum, Glimmer und Kaolin) und Verstärkungsmittel (z. B. Glasfasern) [30]. Polyethylene für die Verpackung von Parenteralia und Ophthalmika sind im europäischen Arzneibuch aufgeführt und dürfen die Zusatzstoffe 7 – 17 laut Ph. Eur. in angegebenen Konzentrationen enthalten (siehe Kapitel 2.3.6).

Verwendung findet LLD-PE unter anderem bei der Herstellung von Ampullen und Kathetern [30]. Im Rahmen dieser Arbeit wird anhand mehrerer Polyethylenchargen der Einfluss verschiedener Herstellungsansätze auf das Extraktionsprofil untersucht.

2.1.5.2 Polypropylen

Nach Polyethylen ist Polypropylen der am häufigsten verwendete Kunststoff in Europa [2]. Polypropylene entstehen durch Koordinationspolymerisation unter Verwendung von Ziegler-Natta-Katalysatoren, wobei heutzutage zunehmend Metallocene zum Einsatz kommen. Bei Propylen-Homopolymeren ist Propen das Monomer (siehe Abbildung 5), bei Copolymeren können Ethylen, 1-Buten oder höhere α -Olefine als Comonomere verwendet werden. Die Synthese des Polymers führt zu isotaktischen (alle Methylgruppen zeigen in eine Richtung), syndiotaktischen (die Ausrichtung der Methylgruppen alteriert) oder ataktischen (die Anordnung der Methylgruppen ist unsymmetrisch) Polypropylenen, wobei das isotaktische Polymer das technisch bedeutsamste ist. Mit Zunahme des isotaktischen Anteils erhöht sich auch der Kristallinitätsgrad.

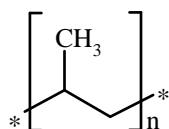


Abbildung 5 Grundeinheit von Polypropylen

Da Polypropylene noch stärker licht- und oxidationsempfindlich sind als Polyethylene, ist der Zusatz von Antioxidantien und UV-Stabilisatoren unumgänglich. Um die Materialkosten zu senken, werden häufig Füllstoffe, wie Mineralien, Kreide und Talkum verwendet. Auch Verstärkungsstoffe, wie Glasfaser, können addiert werden. Polypropylene für die Verpackung von Parenteralia und Ophthalmika sind im europäischen Arzneibuch aufgeführt und dürfen die Additive 7 – 17 in vorgegebenen Konzentrationen beinhalten (siehe Kapitel 2.3.6).

Polypropylene zeichnen sich, wie alle Polyolefine durch eine geringe Wasserdampfdurchlässigkeit aus und werden deswegen oft zum Schutz von Lebensmitteln eingesetzt. Innerhalb dieser Arbeit ist Polypropylen in Form eines Luerdeckels Bestandteil der Glaskartusche.

2.1.5.3 Polycarbonat

Bei Polycarbonat handelt es sich um einen linearen, thermoplastischen Polyester der Kohlensäure mit aliphatischen oder aromatischen Dihydroxy-Verbindungen, der sich durch seine hohe Transparenz, Zähigkeit und sein gutes elektrisches Isolationsvermögen auszeichnet [36]. Die Alkoholkomponente des in dieser Arbeit verwendeten Polycarbonates stellt Bisphenol A dar, welches zudem der am häufigsten verwendete Vertreter dieser Stoffklasse ist (siehe Abbildung 6). Polycarbonat entsteht aus Bisphenol A und Diphenylcarbonat durch Umesterung oder durch Phasengrenzflächenpolykondensation des Alkohols mit Phosgen in Pyridin. Dies ist die häufigste Art der Synthese.

Der regelmäßige Molekülaufbau könnte eine Kristallinität des Thermoplasten vermuten lassen, es handelt sich jedoch um einen amorphen Werkstoff. Durch die Carbonatestergruppe ist Polycarbonat empfänglich für hydrolytische Spaltung, v. a. bei längerem Kontakt mit heißem Wasser.

Polycarbonat neigt zur thermooxidativen Anfälligkeit, was sich durch Vergilbung des Materials zeigt. Aus diesem Grund werden zur Erhöhung der Stabilität während des Verarbeitungsprozesses Phosphite und Phosphonite eingesetzt, die jedoch für einen Langzeitschutz nicht ausreichen. Hierfür eignet sich der Zusatz von phenolisch gehinderten Antioxidantien, wie Irganox 1010 oder Irganox 1076, sowie die Verwendung von UV-Absorbern, wie die Gruppe der Tinuvine (Hydroxyphenylbenzotriazole). Des Weiteren können Stabilisatoren gegen den hydrolytischen Abbau, Flammschutzmittel, optische Aufheller, Füllstoffe oder Verstärkungstoffe wie Glasfaser zugesetzt werden.

Polycarbonate finden hauptsächlich im Bereich der Elektrotechnik und Elektronik ihren Einsatz. Wegen der relativ hohen Sauerstoff- und Kohlendioxid-durchlässigkeit ist die Verwendbarkeit im Bereich der Verpackungen begrenzt. Im Falle der vorliegenden Arbeit wird Polycarbonat als Kappe der Glaskartusche eingesetzt.

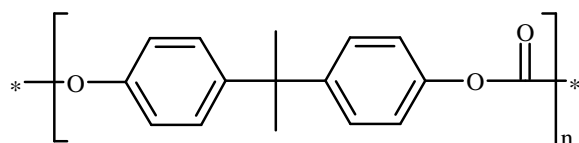


Abbildung 6 Grundeinheit von Polycarbonat mit Bisphenol A als Alkoholkomponente

2.1.5.4 Cycloolefinpolymer und Cycloolefincopolymer

Mit Hilfe der Metallocen-Katalysatoren ist es möglich, Polymere mit heterocyclischen Seitenketten herzustellen. Cycloolefinpolymere entstehen durch Polymerisation des Monomers Norbornen. Für die Synthese des Copolymers wird zusätzlich das Comonomer Ethylen verwendet (siehe Abbildung 7). Häufig eingesetzte Zusatzstoffe sind Antioxidantien oder Anti-blockmittel. Beide Materialien sind sehr unpolar, zeichnen sich durch eine sehr geringe Wasserdampfdurchlässigkeit aus und sind beständig gegen hydrolytischen Abbau [3]. Aufgrund der Transparenz eignen sie sich besonders für optische Bauteile. Außerdem finden sie Anwendung als Küvettenmaterial und im Bereich der Verpackung (Blisterfolien, Schrumpfetiketten). Im Rahmen dieser Arbeit ist COP das Zylindermaterial der Kunststoffkartuschen. Zusätzlich werden während der Extraktionsversuche verschiedene Chargen untersucht. COC wird in Form eines Granulates während der Extraktionsversuche berücksichtigt.

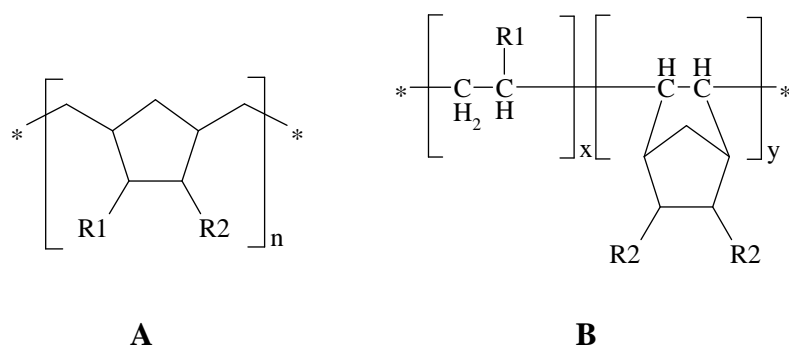


Abbildung 7 Grundbaustein von A Cycloolefinpolymer [37] und B Cycloolefincopolymer

2.1.5.5 Elastomere

In der vorliegenden Arbeit werden zum einen Formlinge aus bromiertem und chloriertem Butylkautschuk und zum anderen aus Polyisoprenkautschuk untersucht (siehe Abbildung 8).

Polyisopren kommt in einer Vielzahl von Pflanzen vor und liegt zum einen als 1,4-cis-Polyisopren (Naturkautschuk) und zum anderen als 1,4-trans-Polyisopren (Guttapercha) vor. Dieses Polymer kann jedoch auch durch Isopren-Polymerisation in Anwesenheit von Lithiumalkylen in Kohlenwasserstoffen synthetisiert werden. Bei der anschließenden Vulkanisation verschieben sich die viskosen zu elastischen Eigenschaften. Hierbei

kommt es zur Vernetzung der Polymerketten über Schwefelbrücken unter Anwesenheit von Schwefel oder schwefelhaltigen Verbindungen unter Einsatz von Katalysatoren und hoher Temperatur. Für dieses Verfahren müssen in den Polymerketten Doppelbindungen vorliegen. Ist dies nicht der Fall, so erfolgt die Vernetzung durch energiereiche Strahlung, Peroxide oder Metalloxide.

Butylkautschuk entsteht durch die Polymerisation von Isopren und Isobutylen. Das so entstandene Polymer wird in Hexan oder Pentan gelöst und mit elementarem Brom bzw. Chlor versetzt. Die ionische Substitution an den Isopreneinheiten führt zur Halogenierung des Polymers. Anschließend wird das Material getrocknet [38].

Die Vulkanisation des halogenierten Butylkautschuks wird üblicherweise mit Schwefel, Zinkoxid oder Peroxiden durchgeführt.

Gängige Zusatzstoffe in Elastomeren sind Antioxidantien und Füllstoffe wie Ruß. Anwendung finden sie in Dichtungs- oder Verschlusssystemen. Innerhalb dieser Arbeit werden sie als Stopfen, Kolbenstopfen, Dichtungsringe und Verschlusskappen für Kartuschen und Vials eingesetzt.

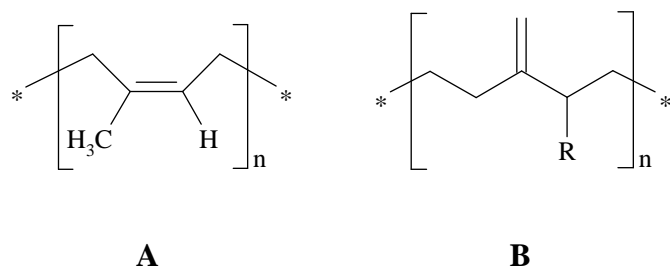


Abbildung 8 Grundbausteine von A Polyisoprenkautschuk und B Butylkautschuk

2.2 EXTRAKTIONS- UND MIGRATIONSSTOFFE

Im Rahmen der gültigen Rechtsgrundlagen wird zwischen Extraktiv- und Migrationsstoffen aus Verpackungen unterschieden. Im Folgenden sollen beide Begriffe definiert werden.

2.2.1 Extraktivstoffe

Extraktionsversuche werden durchgeführt, um eine Grundlage für die sich anschließende Migrationsstudie zu liefern. Das zu untersuchende Material soll mit Extraktionsmitteln behandelt werden, deren Eigenschaften dem späteren Arzneimittel ähnlich sind. Unter Verwendung extremer Bedingungen werden Extraktionsprofile erstellt, welche Aufschluss darüber geben sollen, welche Substanzen im Arzneimittel gefunden werden könnten. Zudem ist es üblich dieses Extraktionsprofil durch den Einsatz von Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polaritäten zu erweitern, um den Worst Case (schlimmsten anzunehmenden Fall) abzubilden.

Es wird unterschieden zwischen primären, sekundären und tertiären Extraktivstoffen (= Extractables). Bei **primären Extraktivstoffen** handelt es sich um Kunststoffadditive, welche dem Polymer absichtlich zugesetzt werden, um dessen Eigenschaften zu beeinflussen (z. B. DEHP als Weichmacher in PVC). Unter **sekundären Extraktivstoffen** werden Verunreinigungen von Zusatzstoffen verstanden, also Stoffe, welche unabsichtlich im Kunststoff vorliegen. Zu dieser Gruppe zählt Myristinsäure, welche eine Verunreinigung der Stearinsäure (Gleitmittel) darstellt. Außerdem sind Herstellungsrückstände von Hilfsstoffen Teil dieser Gruppe (z. B. Cyclohexanon). **Tertiäre Extraktivstoffe** umfassen Stoffe, welche erst während der Produktion des Kunststoffes entstehen, wie beispielsweise Essigsäure, welche durch Gammastrahlung entsteht und so extrahiert werden kann. Diese Gruppe lässt sich am schwersten zuordnen, da sie sich, im Gegensatz zu primären und sekundären Extraktivstoffen, nur schwierig durch Herstellerangaben erklären lassen. [39, 40]

2.2.2 Migrationsstoffe

Bei Migrationsstoffen (= Leachables) handelt es sich um Substanzen, die durch Arzneimittelkontakt während der normalen Anwendung aus der Primärverpackung ins Füllgut wandern [1]. Es wird unterschieden in passive und reaktive Migrationsstoffe.

Passive Migrationsstoffe reagieren nicht mit dem Füllgut und können somit auch als Extraktivstoffe bezeichnet werden. Reagieren extrahierte Stoffe jedoch mit Bestandteilen des Füllgutes, handelt es sich um **reaktive Migrationsstoffe**. Sie stellen keine Extraktivstoffe dar, eine Verlinkung ist jedoch möglich. [39, 40]. Migrationsstudien sollen parallel zur Stabilitätsprü-

fung des Arzneimittels durchgeführt werden, welche die spätere Lagerung simulieren. Das zuvor generierte Extraktionsprofil soll die Identifizierung gefundener Migrationsstoffe erleichtern. Konnten während der Migrationsstudie Migrationsstoffe gefunden werden, so ist eine toxikologische Bewertung des erhaltenen Profils notwendig.

2.3 REGULARIEN

Da die Migration von Bestandteilen des Primärpackmittels in das Arzneimittel ein toxikologisches Risiko für den Patienten darstellen kann, wird die Durchführung von Extraktions- und Migrationsstudien einschließlich der toxikologischen Beurteilung der erhaltenen Profile behördlich vorgeschrieben. Die in Tabelle 5 aufgeführten Regularien und Empfehlungen nehmen in unterschiedlicher Ausführlichkeit und Ausrichtung Stellung zur Durchführung und Beurteilung von Studien zum Extraktions- und Migrationsverhalten von Verpackungsbestandteilen. Mit Ausnahme der Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG stammen alle Regularien aus dem Pharmabereich. Diese nehmen zum Teil Bezug auf die Festlegungen im Lebensmittelbereich, weshalb die Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG näher beschrieben wird.

Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich organische Extraktions- und Migrationsstoffe, sowie Schwefel, untersucht wurden, wird bei der folgenden Beschreibung relevanter Regularien auf die *EMEA- Richtlinie zu Grenzwerten für Rückstände von Metallkatalysatoren* [41] verzichtet.

Tabelle 5 Richtlinien und Empfehlungen, die sich mit der Durchführung und Beurteilung von Extraktions- und Migrationsstudien befassen

	Titel	dt. Beschreibung
ICH-Guideline Q8	Pharmaceutical development	Pharmazeutische Entwicklung
ICH-Guideline Q6A	Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances	Spezifikationen: Prüfverfahren und Grenzwerte für neue Arzneistoffe und Arzneimittel: chemische Substanzen
ICH-Guideline Q3B	Impurities in new drug products	Verunreinigungen in neuen Arzneimitteln
ICH-Guideline Q3C	Impurities: Guideline for residual solvents	Verunreinigungen: Richtlinie für Restlösemittel

	Titel	dt. Beschreibung
ICH-Guideline Q1A	Stability Testing of new drug substances and products	Stabilitätsuntersuchungen für neue Arzneistoffe und Arzneimittel
FDA-Guidance	Guidance for industry: container closure systems for packaging human drugs and biologics	Leitlinie für die Industrie: Behältnisse für Arzneimittel und biologische Erzeugnisse zur menschlichen Anwendung
EMA-Guideline	Guideline on plastic immediate packaging materials	Richtlinie über Primärpackmittel aus Kunststoffen
EMA-Guideline	Guideline on the limits of genotoxic impurities	Richtlinie zu Grenzwerten von genotoxischen Verunreinigungen
EMA-Guideline	Guideline on the specification limits for the residues of metal catalysts	Richtlinie zu Grenzwerten für Rückstände von Metallkatalysatoren
EG-Richtlinie	Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG	-
Europäisches Arzneibuch	Behältnisse und deren Materialien	-
PQRI-Recommendation	Safety thresholds and best practices for extractables and leachables an orally inhaled and nasal drug products	Handlungsempfehlung über die Durchführung und Beurteilung von Extraktions- und Migrationsstudien für OINDPs

Im Rahmen der Migrationsstudie wurden flüssige Arzneiformen untersucht, deren Behältnisse eine parenterale Applikation vorsehen. Aus diesem Grund wird diese Formulierung hervorgehoben.

2.3.1 Richtlinien der ICH

Die ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) hat zum Ziel Beurteilungskriterien für Arzneimittel als Basis der Arzneimittelzulassung in Europa, Japan und den USA zu harmonisieren. So wird auch der Umgang mit Extraktions- und Migrationsstoffen international geregelt.

In der *ICH-Richtlinie Q8 Pharmazeutische Entwicklung* [42] wird festgelegt, dass bei der Wahl des Primärpackmittels für ein Arzneimittel eine Beurteilung von möglichen Wechselwirkungen zwischen Verpackungsmaterial (inklusive Etikettierung und Bedruckung) und Füllgut stattfinden soll.

Die *ICH-Richtlinie Q6A Spezifikationen: Prüfverfahren und Grenzwerte für neue Arzneistoffe und Arzneimittel: chemische Substanzen* [43] schreibt die Durchführung von Extraktionsstu-

dien für flüssige Arzneimittel zur oralen und parenteralen Applikation einschließlich einer toxikologischen Bewertung im Rahmen von Spezifikationen vor.

Für die Beurteilung von Verunreinigungen, die Reaktionsprodukte zwischen Primärpackmittel und Arzneistoff bzw. Hilfsstoff darstellen, liefert die *ICH-Richtlinie Q3B Verunreinigungen in neuen Arzneimitteln* [44] Informationen über Grenzwerte, die bei der Einreichung der Zulassungsunterlagen unterschiedliche Berichterstattung fordern. Tabelle 6 liefert einen Überblick.

Je nach prozentualem Anteil der Verunreinigung, bezogen auf die maximale tägliche Dosis des Arzneistoffes, müssen Verunreinigungen berichtet (RT = Reporting Threshold), identifiziert (IT = Identification Threshold) bzw. toxikologisch beurteilt (QT = Qualification Threshold) werden.

Tabelle 6 Grenzwerte nach ICH-Richtlinie Q3B; TD = Tägliche Dosis, VU = Verunreinigung, AS = Arzneistoff, TDI = Total Daily Intake (gesamte tägliche Einnahme)

Reporting Thresholds (RT)	
<u>TD_{max}(AS)</u>	<u>Grenzwert VU bez. auf TD_{max}(AS)</u>
≤ 1 g	0.1 %
> 1 g	0.05 %
Identification Thresholds (IT)	
<u>TD_{max}(AS)</u>	<u>Grenzwert VU bez. auf TD_{max}(AS)</u>
< 1 mg	1.0 % oder 5 µg TDI ¹
1 mg – 10 mg	0.5 % oder 20 µg TDI ¹
> 10 mg – 2 g	0.2 % oder 2 mg TDI ¹
> 2 g	0.1 %
Qualification Thresholds (QT)	
<u>TD_{max}(AS)</u>	<u>Grenzwert VU bez. auf TD_{max}(AS)</u>
< 10 mg	1.0 % oder 50 µg TDI ¹
10 mg – 100 mg	0.5 % oder 200 µg TDI ¹
> 100 mg – 2 g	0.2 % oder 3 mg TDI ¹
> 2 g	0.15 %

¹ Der kleinere beider Werte gilt als Grenzwert

Auch Restlösemittel aus der Polymerherstellung können potentielle Migrationsstoffe darstellen, weshalb die *ICH-Richtlinie Q3C Verunreinigungen: Richtlinie für Restlösemittel* [45] eine wichtige Grundlage für die Beurteilung solcher Substanzen darstellt. Inhalt dieser ICH-Richtlinie ist der Umgang mit Lösemitteln, welche während der Herstellung von Arzneistoffen, -zubereitungen oder Hilfsstoffen zum Einsatz kommen können und nicht zu 100 % entfernt wurden. Hierfür werden diese Lösemittel in drei verschiedene Kategorien eingeteilt. In **Klasse eins** befinden sich solche, welche ein inakzeptables, karzinogenes Risiko für den Patienten darstellen. Diese sollten nicht zur Anwendung kommen. Sollte ein Einsatz dieser Lösemittel unumgänglich sein, muss eine ausführliche Nutzen-Risiko-Abschätzung vorliegen. In **Klasse zwei** wurden Lösemittel eingruppiert, für die ein Grenzwert festgeschrieben ist, unter dem für den Patienten kein Risiko bezüglich Karzinogenität oder anderer irreversibler Toxizität besteht. Lösemittel, von denen ein nur sehr geringes toxikologisches Risiko ausgeht, sind in **Klasse drei** einsortiert. Hier gilt eine Konzentration von bis zu 50 mg/d als unbedenklich. Auch höhere Konzentrationen können akzeptiert werden, wenn diese die Qualität nicht beeinträchtigen. Lösemittel der Klasse drei sollten für die Herstellung von Arzneistoffen, -zubereitungen und Hilfsstoffen bevorzugt eingesetzt werden. Eine Auswahl gelisteter Lösemittel befindet sich in Tabelle 7. Dort befinden sich ebenfalls die Grenzwerte für Lösemittel der Klasse zwei (PDE = Permitted Daily Exposure; zulässige tägliche Aufnahme).

Tabelle 7 Klassifizierung einiger Lösemittel nach ICH-Guideline Q3C

Klasse 1	Klasse 2 / PDE [mg/d]	Klasse 3
Benzen	Hexan / 2,9	Aceton
Tetrachlormethan	Cyclohexan / 38,8	2-Butanol
1,2-Dichlorethan	Methanol / 30,0	Ethanol
1,1-Dichlorethan	Ethylenglycol / 6,2	1-Propanol
1,1,1-Trichlorethan	Xylen ² / 21,7	2-Propanol

² Üblicherweise bestehend aus 60 % m-Xylen, 14 % p-Xylen, 9 % o-Xylen und 17 % Ethylbenzen

Zusätzlich werden in dieser Richtlinie Lösemittel aufgelistet, für die die momentane Datenlage eine Berechnung von Grenzwerten nicht zulässt. Hier muss der Hersteller selbst eine toxikologische Beurteilung vornehmen. Hierzu zählen z. B. Isooctan, Petrolether, Isopropylether oder Trifluoressigsäure.

Es wird empfohlen, Migrationsstudien während der Stabilitätsüberprüfungen durchzuführen. Die Forderung nach Stabilitätstests für die Zulassung neuer Arzneistoffe und Arzneimittel wird in der *ICH-Richtlinie Q1A Stabilitätsuntersuchungen für neue Arzneistoffe und Arzneimittel* [46] beschrieben. Sie legt fest, welche Stabilitätsdaten bei der Zulassung von neuen Arzneistoffen und Arzneimitteln eingereicht werden müssen. Ziel von Stabilitätsuntersuchungen soll die Beurteilung der Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in Abhängigkeit von der Zeit unter Einfluss verschiedener äußerer Faktoren, wie Temperatur, Licht und Feuchtigkeit sein. Die zu untersuchenden Lagerungsbedingungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Separat erwähnt werden Stabilitätsuntersuchungen an Arzneimitteln in semipermeabler Verpackung, solchen die kühl gelagert werden müssen ($5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) oder eine Lagerung im Gefrierschrank ($-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ bzw. $< -20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) erfordern.

Tabelle 8 Allgemeine Lagerungsbedingungen und –dauer, welche der ICH-Richtlinie Q1A entstammen; RH = Relative Humidity (relative Feuchte)

Studie	Lagerungsbedingungen	min. Lagerungsdauer, ab der eine Einreichung der Daten möglich ist
Langzeitlagerung ³	$25\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ oder $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	12 Monate
intermediäre Lagerung ⁴	$30\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	6 Monate
beschleunigte Lagerung	$40\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	6 Monate

³ Der Antragsteller darf entscheiden, welche dieser Bedingungen Verwendung finden.

⁴ Falls diese Lagerungsbedingungen bereits im Rahmen der Langzeitlagerung verwendet wurden, entfällt die intermediäre Lagerung.

2.3.2 FDA-Leitlinie für die Industrie: Behältnisse für Arzneimittel und biologische Erzeugnisse zur menschlichen Anwendung

Die Leitlinie der US-amerikanischen FDA soll dem pharmazeutischen Unternehmen eine Hilfestellung hinsichtlich der Zulassungsunterlagen für die USA für Verpackungsmaterialien sein, ohne im Detail auf spezielle Testmethoden oder Akzeptanzkriterien einzugehen. Um die Anforderungen an ein Primärpackmittel abschätzen zu können, wird die Korrelation zwischen Applikationsart des Arzneimittels und der Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen Verpackung und Formulierung näher betrachtet. Aus Tabelle 9 geht hervor, dass bei Arzneimitteln zur parenteralen Anwendung die Gefahr einer Interaktion und die Gefahr, die mit dem Applikationsweg einhergeht, besonders groß sind. Somit werden für diese Formulierungen besonders hohe Anforderungen an die Qualität und Sicherheit des Primärpackmittels gestellt.

Für die Gewährleistung von Sicherheit und Verträglichkeit müssen die Ergebnisse der Extraktionsstudien und die dazugehörige toxikologische Beurteilung eingereicht werden.

Tabelle 9 Korrelation zwischen Applikationsart des Arzneimittels und der Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen Verpackung und Formulierung

Grad der Gefährdung durch die Applikationsart	Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zw. Verpackung und Arzneimittel		
	hoch	mittel	gering
sehr hoch	Aerosole und Inhalationslösungen, Injektionslösungen und -suspensionen	Sterile Pulver und Pulver zur Injektion, Pulver zur Inhalation	
hoch	Ophthal. Lösungen und Suspensionen, transdermale Salben und Pflaster, Nasenaerosole und -sprays		
gering	Lösungen und Suspensionen zur top. oder oralen Anwendung, Aerosole zur topischen und linguallen Applikation	Pulver zur topischen oder oralen Anwendung	Tabletten und Kapseln zur oralen Applikation

Die FDA bietet die Möglichkeit, DMFs (Drug Master Files) einzureichen. Hierbei handelt es sich um ein Dokument, welches es möglich macht, detaillierte Informationen über zum Bei-

spiel technische Anlagen, Herstellprozesse oder Hilfsstoffe zur Formulierung, aber auch potentielle Extraktivstoffe direkt an die Behörde zu leiten [47].

Im Anhang dieser Richtlinie finden sich zusätzliche Angaben über die Durchführung von Extraktionsstudien. Es wird vorgeschlagen das zu untersuchende Material zu zerkleinern und mit einem geeigneten Extraktionsmittels bei erhöhter Temperatur zu extrahieren. Als geeignetes Extraktionsmittel wird ein Lösungsmittel bezeichnet, das sich in seinen Extraktionseigenschaften nicht wesentlich vom Arzneimittel unterscheidet. Empfohlen wird aus diesem Grund das Arzneimittel selbst bzw. eine Placebo-Lösung zu verwenden. Anschließend soll der Extrakt mit geeigneten analytischen Methoden, wie der HPLC oder GC, untersucht werden. Konkrete Angaben zu Grenzwerten und zur toxikologischen Bewertung der Ergebnisse werden nicht aufgeführt [23].

2.3.3 EMEA- Richtlinie über Primärpackmittel aus Kunststoffen

Diese EMEA-Richtlinie beschäftigt sich mit den Anforderungen an Primärpackmittel aus Kunststoffmaterialien. Zu Primärpackmitteln gehören neben dem Behältnis selbst auch Verschlüsse, Dichtungen sowie andere Teile, die im direkten Kontakt mit dem Arzneimittel stehen. In dieser Richtlinie sind sämtliche Elastomere nicht eingeschlossen. Das Dokument liefert dem pharmazeutischen Unternehmen Informationen über benötigte Unterlagen für die Zulassung von Arzneimitteln oder Wirkstoffen in ihren jeweiligen Behältnissen. Für flüssige Arzneimittel zur Injektion müssen neben dem chemischen Namen des Behältnismaterials, der darin enthaltenen Monomere und dem Namen des Lieferanten auch Angaben zur qualitativen Zusammensetzung inklusive aller verwendeten Additive gemacht werden, wenn das Verpackungsmaterial weder im europäischen Arzneibuch noch in einem Arzneibuch anderer Mitgliedsstaaten der EU aufgelistet ist. Gleiches gilt auch für alle Kunststoffmaterialien, die Additive enthalten, welche nicht im Kapitel 3.1.13 des europäischen Arzneibuches aufgeführt sind (siehe Kapitel 2.3.6).

Handelt es sich um die Primärverpackung von Arzneimitteln zur parenteralen Applikation, dann müssen die Hauptadditive identifiziert und Extraktionsstudien durchgeführt werden. Laut EMEA sollen die verwendeten Kunststoffe in einem geeigneten Extraktionsmedium Stressbedingungen ausgesetzt und die erhaltenen Extraktivstoffe mit Identität und Gehalt an-

gegeben werden. Als geeignetes Extraktionsmittel wird ein Lösungsmittel bezeichnet, das in seinen Extraktionseigenschaften dem Arzneimittel sehr ähnlich ist. Es empfiehlt sich, laut EMEA, die Verwendung dieses Arzneimittels selbst, oder der entsprechenden Placebo-Lösung. Des Weiteren fordert die EMEA Studien zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Primärpackmittel und Arzneimittel bzw. Wirkstoff. Diese werden unterteilt in Migrationsstudien, bei denen die Extraktion von Stoffen aus dem Kunststoff in die Formulierung bzw. Wirkstoff analysiert wird, und Sorptionsstudien, um den Verlust von Wirkstoffen oder Hilfsstoffen durch Adsorptions- oder Absorptionseffekte zu beurteilen. Migrationsstudien werden gefordert, wenn im Rahmen der Extraktionsversuche Extraktivstoffe gefunden wurden. Sie entfallen, wenn die errechneten Maximalwerte für die gefundenen Extraktivstoffe toxikologisch unbedenklich sind. Migrationsstudien erfolgen an mindestens einer Charge. Sind die verwendeten analytischen Methoden nicht im europäischen Arzneibuch oder einer anderen Pharmacopoe eines Mitgliedstaates der EU erwähnt, dann müssen sie validiert werden. Alle gefundenen Extraktiv- und Migrationsstoffe müssen toxikologisch bewertet werden [24].

2.3.4 EMEA- Richtlinie zu Grenzwerten von genotoxischen Verunreinigungen

Diese Richtlinie beschäftigt sich mit dem Umgang genotoxischer Verunreinigungen in neuen Wirkstoffen und mit neuen Applikationen bekannter Wirkstoffe, bei denen nicht sichergestellt werden kann, dass Herstellung, Prozesskontrolle bzw. Verunreinigungsprofil kein höheres Risikopotential liefern als bei bereits zugelassenen Marktprodukten mit diesem Wirkstoff. Während es für einige Stoffe Grenzwerte gibt, unter denen sie als nicht genotoxisch angesehen werden können, existieren auch viele CMR-Substanzen (Cancerogen (= Kanzerogen), Mutagen, Reproduktionstoxisch), bei denen ein entsprechender Grenzwert nicht festgelegt ist. Hierfür wurde der TTC (Threshold of Toxicological Concern = Grenzwert toxikologischer Bedenklichkeit) formuliert. Er beträgt 1,5 µg/Person/Tag und stellt einen Wert dar, unter dem Stoffe kein signifikantes kanzerogenes Potential aufweisen, das heißt weniger als eine Person von 100 000 an Krebs erkrankt. Ausgenommen von diesem Grenzwert sind die hoch potenten karzinogenen Aflatoxin-ähnlichen Stoffe, Azoxy-Substanzen und N-Nitroso-Verbindungen. Hierfür muss eine eigene toxikologische Beurteilung stattfinden. Der TTC kann überschritten werden, wenn es sich um eine kurzfristige Exposition handelt, lebensbedrohliche Zustände

behandelt werden müssen, die Lebenserwartung des Patienten nicht mehr als fünf Jahre beträgt, oder die Verunreinigung bekannt ist und die Gefahr einer Exposition durch andere Quellen viel größer ist [48].

2.3.5 Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG

Diese Richtlinie gilt im Bereich Bedarfsgegenstände aus Kunststoffen, die dafür vorgesehen sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Sie bezieht sich ausschließlich auf Kunststoffe, d.h. Elastomere und Silikone, sowie mehrschichtige Systeme, bei denen nicht alle Schichten aus reinem Kunststoff bestehen, liegen nicht im Geltungsbereich. Wesentlicher Bestandteil dieser Richtlinie sind Positivlisten mit Monomeren und Ausgangsstoffen bzw. Zusatzstoffen, die mit angegebenen Beschränkungen bei der Kunststoffherstellung ausschließlich zum Einsatz kommen dürfen. Des Weiteren befinden sich Auflistungen solcher Zusatzstoffe im Anhang, die nach nationalen Rechtsvorschriften verwendet werden dürfen, für die eine vollständige Bewertung durch die europäische Gemeinschaft jedoch noch aussteht. Diese Aufzählungen zu erlaubten Monomeren, Ausgangsstoffen und Zusatzstoffen werden regelmäßig überarbeitet und ergänzt [49 - 52]. Sind für die einzelnen Stoffe keinerlei Beschränkungen aufgeführt, so gilt es, den Gesamtmigrationsgrenzwert (GMGW) von maximal 10 mg/dm^2 Verpackung bzw. 60 mg/kg Lebensmittel für Verschlüsse, wie Stopfen, Deckel und Dichtungsringe, nicht zu überschreiten. Letzterer findet Anwendung, wenn die Kontaktfläche zwischen Verpackung und Lebensmittel nicht genau definiert werden kann. Der GMGW stellt die Summe der Migrationswerte aller Migrationsstoffe dar. In Tabelle 10 befinden sich alle für diese Arbeit relevanten Stoffe, die nach dieser Richtlinie einsortiert wurden.

Tabelle 10 Relevante Additive und Ausgangsstoffe, sortiert nach Richtlinie 2002/72/EG; Anhang II = zugelassene Monomere und Ausgangsstoffe, Anhang III/A = zugelassene Zusatzstoffe, Anhang III/B = Zusatzstoffe für die ein Antrag auf Aufnahme vorliegt, eine Bewertung jedoch aussteht

Anhang II	Anhang III/A	Anhang III/B
Schwefel	Oleamid	Tinuvin P 30 mg/kg^6
Phenol	Erucamid	Tinuvin 326 30 mg/kg^6

Anhang II	Anhang III/A	Anhang III/B
DHBP 6 mg/kg ⁵	Stearinsäure	Eusolex 6 mg/kg ⁵
Bisphenol A 3 mg/kg	Tinuvin 327 30 mg/kg ⁶	Chimasorb 6 mg/kg ⁵
1-Nonanol	Additiv 3 Ph. Eur.	MTBC 1,5 mg/kg ⁷
1-Propanol	Irganox 1330	Additiv 16 Ph. Eur. 5 mg/kg ⁸
2-Ethyl-1-hexanol 30 mg/kg	Irganox 1010	Irganox 1076 6 mg/kg
	Irgafos 168	Irganox 565 30 mg/kg
		BHT 3 mg/kg
		Additiv 13 Ph. Eur. 5 mg/kg
		DHMBP 6 mg/kg ⁵
		Topanol 5 mg/kg

2.3.6 Europäisches Arzneibuch

Im Kapitel 3 des europäischen Arzneibuches sind die Anforderungen an Behältnisse und Materialien zu finden. Kapitel 3.1. beschäftigt sich mit dem Material zur Herstellung von Behältnissen für die pharmazeutische Anwendung. In Kapitel 3.1.13. sind 22 verschiedene Additive aufgelistet, die für die Herstellung von Kunststoffbehältnissen zur pharmazeutischen Anwendung zugelassen sind.

Eine komplette Auflistung dieser Zusatzstoffe befindet sich in Tabelle 11. In den Monographien der Kunststoffe (z.B. 3.1.3. Polyolefine, 3.1.5. Polyethylen mit Additiven, 3.1.6. Polypropylen) sind die zugelassenen Additive beschrieben. Für jeden Kunststoff sind Prüfungen aufgeführt, die im Rahmen der Konformitätsprüfung durchgeführt werden müssen.

⁵ Die Summe der Migrationswerte von DHBP, Eusolex, B-BHA, 4,4'-Dihydroxybenzophenon, 2-Hydroxy-4-n-hexyloxybenzophenon und Chimasorb darf die Beschränkung von 6 mg/kg nicht überschreiten

⁶ Die Summe der Migrationswerte von Tinuvin 327, Tinuvin 326 und Tinuvin P darf die Beschränkung von 30 mg/kg nicht überschreiten

⁷ Die Summe der Migrationswerte von MTBC und 2,2'-(Methylenbis(4-ethyl-6-tert-butylphenol) darf die Beschränkung von 1,5 mg/kg nicht überschreiten

⁸ Die Summe der Migrationswerte von Additiv 16 Ph. Eur. und Dioctadecylthiodipropionat darf die Beschränkung von 5 mg/kg nicht überschreiten

Tabelle 11 Kunststoffadditive, die laut europäischem Arzneibuch zur Herstellung von Kunststoffen und Elastomeren zugelassen sind

Additiv 1	DEHP	Additiv 12	Tris (2,4-ditert-butylphenyl)phosphite = Irgafos 168
Additiv 2	Zinkoctanoat	Additiv 13	1,3,5-Tris[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxybenzyl]-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione
Additiv 3	N,N'-Diacylethylendiamin	Additiv 14	3,9-Bis(octadecyloxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-diphosphaspiro[5.5]undecane
Additiv 4	Epoxidiertes Sojaöl	Additiv 15	1,1'-Disulphanediyl dioctadecan
Additiv 5	Epoxidiertes Leinöl	Additiv 16	Didodecyl 3,3'-sulphanediyl dipropanoat
Additiv 6	Ultramarineblau	Additiv 17	Dioctadecyl 3,3'-sulphanediyl dipropanoat
Additiv 7	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol = BHT	Additiv 18	Mischung aus: • 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenyl biphenyl-4,4'-diyldiphosphonite • 2,4-Bis(1,1'-dimethylethyl)phenyl biphenyl-3,4'-diyldiphosphonite • 2,4-Bis(1,1'-dimethylethyl)phenyl biphenyl-3,3'-diyldiphosphonite • 2,4-Bis(1,1'-dimethylethyl)phenyl biphenyl-4-ylphosphonite • Irgafos 168 • 2,4-Bis(1,1'-dimethylethyl)phenyl 4'-[bis[2,4-bis(1,1 dimethylethyl)phenoxy]phosphanyl]biphenyl-4-ylphosphonate • 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol
Additiv 8	Ethylene bis [3,3-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]-butanoat]	Additiv 19	Stearinsäure
Additiv 9	Pentaerythrityl tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionat = Irganox 1010	Additiv 20	Oleamid
Additiv 10	3,3',3'',5,5',5''-hexa-tert-butyl-a,a',a''-(mesitylene-2,4,6-triyl)tri-p-cresol = Irganox 1330	Additiv 21	Erucamid
Additiv 11	Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionate = Irganox 1076	Additiv 22	Copolymer von Dimethylbutandioat und 1-(2-Hydroxyethyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol

Dem Kapitel 3.2. des europäischen Arzneibuches sind unter anderem Informationen zu Glasbehältnissen, Kunststoffbehältnissen, Kunststoffbehältnissen zur Aufnahme wässriger Infusionszubereitungen, sterilen Kunststoffbehältnissen für Blut und Blutprodukte, sterilen Einmal-

spritzen aus Kunststoff und Gummistopfen für Behältnisse zur Aufnahme von wässrigen Zubereitungen zur parenteralen Anwendung, von Pulvern und von gefriergetrockneten Pulvern zu entnehmen. Alle Behältnisse dürfen mit dem Inhalt nicht physikalisch oder chemisch reagieren, so dass die Qualität des Inhaltes soweit verändert würde, dass durch offizielle Richtlinien festgesetzte Grenzwerte überschritten werden. Zusatzstoffe, die nicht im europäischen Arzneibuch aufgeführt sind, müssen toxikologisch beurteilt werden [53].

2.3.7 PQRI- Handlungsempfehlung über die Durchführung und Beurteilung von Extraktions- und Migrationsstudien für OINDP's

Schwerpunkte dieser Empfehlung sind zum einen der Vorschlag verschiedener Grenzwerte und zum anderen Hinweise zur Durchführung von Extraktions- und Migrationsstudien.

Das PQRI legt einen SCT (Safety Concern Threshold) fest. Dieser Grenzwert besagt, dass Karzinogene unterhalb von 0,15 µg/d kein kanzerogenes Risiko darstellen. Handelt es sich um Migrationsstoffe, bei denen eine kanzerogene Wirkung ausgeschlossen werden kann, so kann bei einer Aufnahme von weniger als 5 µg/d eine toxikologische Wirkung vernachlässigt werden. Ab dem QT (Qualification Threshold) von 5 µg/d müssen die entsprechenden Migrationsstoffe qualifiziert werden. Außerdem wird in diesem Dokument ein AET_{est} (estimated AnalYTical Evaluation Threshold) diskutiert, welcher auf dem SCT basiert, aber keine absolute Größe darstellt. Dieser Grenzwert legt fest, ab welcher Konzentration Migrationsstoffe identifiziert und quantifiziert werden sollen und ist abhängig von der täglich applizierten Menge und dem Gesamtvolumen bzw. der Gesamtmenge im Behälter und wird nach Gleichung 1 berechnet.

$$AET_{est} = \left(\frac{SCT}{D_d} * D_{ges} \right) \quad (1)$$

AET_{est} = estimated Analytical Evaluation Threshold, SCT = Safety Concern Threshold, D_d = tägliche Dosis, D_{ges} = gesamte im Behälter enthaltene Dosen

Mit Hilfe dieser Gleichung wurde in der vorliegenden Arbeit bestimmt, wie groß die Bestimmungsgrenzen für die Entwicklung der analytischen Methoden sein müssen.

Im Rahmen der Migrationsstudie (siehe Kapitel 6) wurden Behältnisse mit einem maximalen Füllvolumen von 150 ml untersucht, was einer maximalen Einmalgabe entspricht. Würde es sich bei den potentiellen Migrationsstoffen um solche ohne genotoxisches Potential handeln, dann fände der $QT = 5 \mu\text{g/d}$ Anwendung. Unter Berücksichtigung der maximalen täglichen Dosis von 150 ml entspricht dies einem $AET_{QT} = 5 \mu\text{g}$, also einer Bestimmungsgrenze von $33,33 \mu\text{g/l}$.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze für genotoxische Stoffe wird die Gleichung zur Berechnung des AET_{est} verwendet, nur dass der SCT durch den Grenzwert für genotoxische Substanzen (TTC), festgelegt durch die EMEA gemäß Kapitel 2.3.4, von $1,5 \mu\text{g/d}$ ersetzt wird. Grund hierfür ist, dass es sich beim TTC um eine regulatorisch festgelegte Größe handelt, die unabhängig von der Applikationsart bestimmt wurde. Somit ergibt sich ein AET_{TTC} von $1,5 \mu\text{g}$ bei einer Einmalgabe von 150 ml, was einer Bestimmungsgrenze von $10 \mu\text{g/l}$ entspricht. Die für diese Arbeit relevanten Grenzwerte sind nochmals in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12 Grenzwerte, abgeleitet aus der PQRI Empfehlung; AET_{TTC} = Analytical Evaluation Threshold für genotoxische Stoffe, AET_{QT} = Analytical Evaluation Threshold abgeleitet vom Qualification Threshold, LOQ = Limit of Quantification

	Anwendungsbereich	Größe [$\mu\text{g/d}$]	Resultierender LOQ [$\mu\text{g/l}$]
AET_{TTC}	genotoxische Migrationsstoffe	1,5	10
AET_{QT}	Migrationsstoffe ohne genotoxisches Potential	5	33

Weiterhin relevant für die später durchgeführten Extraktionsstudien sind die Empfehlungen des PQRI hinsichtlich Extraktions- bzw. Analysemethoden. Um einen großen Polaritätsbereich abzudecken, soll mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, wie Dichlormethan, Isopropanol und Hexan extrahiert werden. Zusätzlich werden Wasser und wässrige Medien (z.B. Puffer, Placebo-Lösungen) als Extraktionsmedien diskutiert. An Extraktionsmethoden schlägt das PQRI die Anwendung von Soxhlet, Reflux und Ultraschall vor. Analytische Methoden, welche für die Quantifizierung und Identifizierung von organischen Extraktiv- und Migrati-

onsstoffen favorisiert werden, sind GC-MS, GC-FID, LC-MS und LC-UV (oder DAD). Nach Durchführung der Extraktions- und Migrationsstudien soll eine Korrelation zwischen beiden Profilen vorgenommen werden [25].

3 METHODENENTWICKLUNG FÜR DIE BESTIMMUNG POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE

3.1 ALLGEMEINES

Ziel war es, Screening-Methoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, eine große Zahl von in Primärpackmitteln häufig vorkommenden Extraktivstoffen zu identifizieren und quantifizieren. Hierfür wurde zu Beginn eine Auswahl an Kunststoffadditiven und deren Abbauprodukten, Kunststoffmonomeren, Ausgangsstoffen zur Additivherstellung und Restlösemitteln zusammengestellt, die sich zum Teil aus Herstellerinformationen und zum großen Teil aus Literaturangaben ergab [54 - 59]. Diese konnten aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften verschiedenen Analysemethoden zugeordnet werden:

- Headspace-Gaschromatographie: leichtflüchtige Substanzen
- Gaschromatographie: flüchtige Substanzen
- Flüssigchromatographie: nicht flüchtige Substanzen

Die Auswahl der zu bestimmenden Stoffe mittels HPLC und UPLC beruhte ausschließlich auf Herstellerangaben und Literaturhinweisen [60, 61]. Für die Entwicklung der GC Methoden wurde für eine geschickte Analytenauswahl neben umfangreichen Literaturrecherchen zusätzlich anhand exemplarischer Materialien ein vorläufiges Extraktionsprofil erstellt. Mittels der hierdurch vermuteten Extraktivstoffe wurden die Methoden optimiert.

Die Herstellung der Stammlösungen der potentiellen Extraktivstoffe erfolgte durch 15 minütiges Erwärmen auf 40 °C im Ultraschallbad. Die Entwicklung der LC Methoden und der GC-MS erfolgte mit Isopropanol als Lösemittel. Zusätzlich sollten auch Hexan, Wasser und ein Kontrastmittel als Lösemittel bewertet werden, da sie im Rahmen der Extraktions- bzw. Migrationsstudie zum Einsatz kamen. Bei diesem Kontrastmittel handelt es sich um eine hochviskose und hochkonzentrierte Lösung, die, um einen Analyse im Ultraspurenbereich möglich zu machen, bei einigen Methoden eine zusätzliche Probenvorbereitung notwendig machte.

Mittels HS-GC-FID sollten ausschließlich wässrige Medien untersucht werden, die Methodenentwicklung hierfür erfolgte somit an wässrigen Lösungen. Einzelheiten zur Probenvorbereitung befinden sich in den folgenden Kapiteln.

3.2 ENTWICKLUNG GASCHROMATOGRAPHISCHER METHODEN FÜR DIE BESTIMMUNG LEICHT FLÜCHTIGER UND FLÜCHTIGER POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE

3.2.1 Vorversuche

Um die für die gaschromatografischen Methoden relevanten Stoffe zusammenzustellen, wurden zu Beginn je drei Thermoplaste (Polyethylen, COP und COC) und Elastomere (ein bromierter und ein chlorierter Butyl-, sowie ein Polyisoprenkautschuk) mittels bereits bestehender Methoden untersucht. Hierfür wurden die Materialien sowohl mit Hexan und Isopropanol als auch mit Wasser extrahiert. Für die Extraktion mit den organischen Lösemitteln wurde jedes Material in einem Rundkolben entsprechend einem Oberflächen-Extraktionsmittel-Verhältnis von $0,5 \text{ cm}^2$ zu 1 ml gegeben [53, 90] und mit 100 ml Lösemittel eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Die Extraktion mittels Wasser erfolgte nach dem Europäischen Arzneibuch (Kapitel 3.2.9 des Ph. Eur.) im Autoklaven (60 min, 121 °C). Hierfür wurde das gleiche Oberflächen-Extraktionsmittel-Verhältnis gewählt. Nach Abkühlen der Extrakte erfolgte die Analyse anhand der Methoden in Tabelle 13.

Tabelle 13 Verwendete HS-GC-MS Methode nach RÜCK [62] und GC-MS Methode unter Verwendung von Standardparametern für die Abschätzung des Extraktionsprofils der eingesetzten Kunststoffe

	Headspace-GC-MS	GC-MS
NaCl Zugabe	1 g	-
Probenvolumen	5 ml	-
Temperatur Spritze	95 °C	-
Temperatur Schüttler	90 °C	-
Geschwindigkeit Schüttler	250 r/min	-
Dauer des Schüttelns	15 min	-
Flussgeschwindigkeit He	2 ml/min	1,5 ml/min
Split	2,5:1	Splitless

	Headspace-GC-MS	GC-MS
Injektionsvolumen	2000 µl	1 µl
Liner	Agilent Liner 4 mm ID	Agilent liner 4 mm ID tap GW
Inlettemperatur	260 °C	300 °C
Säule	Varian; FactorFour capillary columns VF-624ms; 60 m * 0.25 mm; 1.4 µm	HP-5MS, 30 m * 0.25 mm, 0.25 µm
Temperaturprogramm	60 °C (1 min) 6 °C/min 260 °C	40 °C (1 min) 5 °C/min 300 °C (7 min)
Detektion	MS Scan Modus (M = 30 – 400 amu)	MS Scan Modus (M = 80 – 500 amu)

Die Auswertung der Chromatogramme und Spektren ergab eine Vielzahl möglicher Extraktivstoffe. Diese resultierten aus dem Vergleich der erhaltenen Massenfragmente mit den Literaturdatenbanken⁹. Berücksichtigt wurden nur Substanzen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % dem Spektrum der Datenbank entsprachen und in mindestens zwei Materialien vorzukommen schienen. Dies brachte folgende Zusammenstellung mit sich:

- OMCTS – Hexadecan – 3-Methylhexan
- HMCTS – Eicosan – 1-Propanol
- DMCPS – Docosan – 2-Butanol
- BHT – Decan – 3-Pentanol
- Tetradecan – 1-Nonanol – 2-Ethyl-1-hexanol
- Octadecan – Hexacosan – 2-Hexanon
- Dodecan – t-Butanol – m-Xylen
- Dihexylether – Methylcyclohexan
- Ethylbenzen – o-Xylen

Die verwendeten Methoden sollten im Anschluss für den geplanten Einsatz optimiert werden.

⁹ wiley7n.1, wiley138.1, wiley275.1

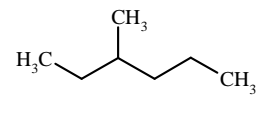
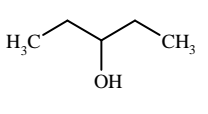
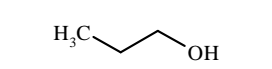
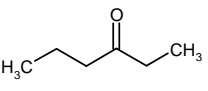
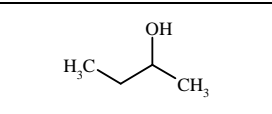
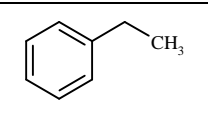
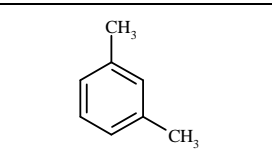
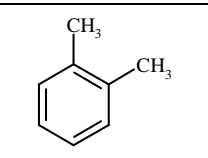
3.2.2 Entwicklung einer HS-GC-FID Methode für die Bestimmung leichtflüchtiger potentieller Extraktivstoffe

Bei der Headspace-Analyse handelt es sich um die indirekte Bestimmung verdampfbarer Stoffe in Flüssigkeiten und Feststoffen, die den Vorteil mit sich bringt, auf eine aufwändige Probenvorbereitung verzichten zu können. So wird sie neben der Bestimmung von Lösemittelrückständen, Aromastoffen und des Blutalkohols auch zur Analyse von leicht flüchtigen Bestandteilen in Kunststoffen verwendet [63].

Bei der Entwicklung der HS-GC-FID Methode wurden die Extraktivstoffe berücksichtigt, deren Siedepunkte unterhalb von 200 °C liegen. Neben denen, die sich aus den Vorversuchen ergaben, wurde zusätzlich p-Methylstyren analysiert, ein Monomer aus synthetischem Kautschuk, welches laut Hersteller extrahiert werden könnte. Somit ergaben sich 12 verschiedene Substanzen, die Bestandteil der Methodenentwicklung werden sollten (siehe Tabelle 14 und Tabelle 15).

Sowohl bei der Methodenoptimierung als auch den Vorversuchen wurde eine Säule der Firma Varian verwendet. Dabei handelt es sich um eine Phase aus Dimethylpolysiloxan mit sechs prozentigem Cyanopropyl/Phenyl-Anteil, die sehr gut für die Analytik von leichtflüchtigen organischen Komponenten, Kohlenwasserstoffen, Aromaten und Lösemitteln geeignet ist. (factorFour VF-624ms, Varian).

Tabelle 14 Restlösemittel für die HS-GC-FID Bestimmung

3-Methylhexan		3-Pentanol	
1-Propanol		3-Hexanon	
2-Butanol		Ethylbenzen	
m-Xylen		o-Xylen	

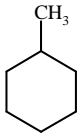
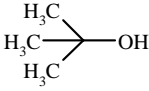
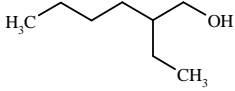
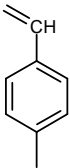
Methylcyclohexan			
------------------	---	--	--

Tabelle 15 Weitere Stoffe für die HS-GC-FID Bestimmung

t-Butanol <i>Abbauprodukt von Irganox 1010</i>		2-Ethyl-1-hexanol <i>Abbauprodukt von DEHP</i>	
p-Methylstyren <i>Monomer in synthetischem Kautschuk</i>			

3.2.2.1 Herstellung der Probenlösung

Mit Hilfe der HS-GC-FID sollten wässrige Medien untersucht werden. Zunächst wurde versucht die ausgewählten Substanzen in Wasser zu lösen. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht bekannt, dass auch Ethylbenzen und p-Xylen bedeutende potentielle Extraktivstoffe sind. Deshalb wurden sie bei diesen Versuchen nicht berücksichtigt.

Da 3-Hexanon und 2-Ethyl-1-hexanol schwer löslich und m-Xylen, Methylcyclohexan sowie 3-Methylhexan praktisch unlöslich in Wasser sind, galt es, einen geeigneten Lösungsvermittler zu finden, der alle Stoffe in Wasser in Lösung bringt. Untersucht wurden DMSO und Aceton, da diese in der Praxis häufig zur Anwendung kommen [59]. Die zu untersuchenden Stoffe wurden sowohl in DMSO als auch in Aceton gelöst (100 mg/l). Aus diesen Stammlösungen wurden wässrige Verdünnungen (5 mg/l) hergestellt, die 20, 40 beziehungsweise 50 % des jeweiligen Lösungsvermittlers enthielten. Die Auswertung der Chromatogramme zeigte eine Reduktion der Peakflächen mit zunehmender Konzentration des Lösungsvermittlers. Der Vergleich beider Lösungsvermittler lieferte die Erkenntnis, dass durch Zusatz von Aceton die Analyse sensitiver wurde als durch Zugabe von DMSO. Somit wurde Aceton als Lösungsvermittler gewählt. Anschließend sollte die optimale Konzentration an Aceton bestimmt werden, die erforderlich ist, um die potentiellen Extraktivstoffe zu lösen und die gleichzeitig die höchstmögliche Sensitivität liefert. Weitere Versuche ergaben, dass mindestens 5 % Aceton

notwendig waren, um alle zu analysierenden Stoffe zu lösen. Im Anschluss wurden wässrige Verdünnungen (5 mg/l) mit 5, 10 und 20 % Aceton vergleichend untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sich eine niedrige Aceton-Konzentration positiv auf die Sensitivität der Methode auswirkt. Es wurde fortan mit einem 5 %igen Aceton-Zusatz gearbeitet. Dies galt neben den Referenzlösungen auch für wässrige Extrakte und die wässrigen sowie Kontrastmittel-Proben der Migrationsstudie.

3.2.2.2 Optimierung der Geräteparameter zur verbesserten Auflösung

Während die Vorversuche zur Ermittlung potentieller Extraktivstoffe mit Hilfe eines HS-GC-MS durchgeführt worden sind, sollte die Routine-Methode auf einem alternativen Gerät, gekoppelt mit einem FID (Flammenionisationsdetektor), etabliert werden. Neben den unterschiedlichen Detektionsverfahren differieren beide Geräte zusätzlich in der Regulierung der Trägergasgeschwindigkeit. Während bei dem HS-GC-MS ein konstanter Fluss von 2 ml/min eingestellt wurde, wurde beim HS-GC-FID mit einem konstanten Druck von 13 psi gearbeitet.

Unter Verwendung der gleichen Säule erfolgte eine Anpassung des Temperaturgradienten und des Splitverhältnis von 2,5:1 auf 10:1. Letzteres führte durch eine reduzierte Probenaufgabe zur verbesserten Peaksymmetrie. Die vollständige Beschreibung der Geräteparameter befindet sich in Tabelle 16.

3.2.2.3 Optimierung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Da die Untersuchung auf Extraktiv- und Migrationsstoffe das Arbeiten im Ultraspurenbereich erfordert, war es wichtig, die bestmögliche Sensitivität der Methode zu erreichen. Außerdem sollten die Ergebnisse eine gute Reproduzierbarkeit aufweisen. Hierfür wurden NaCl-Zugabe, Probenvolumen, Temperatur und Temperierdauer für die Gleichgewichtseinstellung zwischen Flüssigkeit und Dampfphase verändert [64].

Einfluss NaCl-Zugabe und Probenvolumen

Ausgehend von der ursprünglichen Methode, bei der 1 g NaCl und 5 ml Probe verwendet wurden, sind die NaCl Einwaage zwischen 1 g und 4 g und das Probenvolumen zwischen 5 ml und 10 ml variiert worden. Zur Beurteilung des Einflusses dieser Parameter wurden die Peakflächen von t-Butanol, Ethylbenzen, m-Xylen, o-Xylen und 2-Ethyl-1-hexanol ausgewertet (siehe Abbildung 9). Es war zu erkennen, dass eine Verdoppelung des Probenvolumens allein nicht ausreicht, um eindeutig erhöhte Peakflächen zu erhalten. Erst durch gleichzeitige Verdoppelung der NaCl Menge wurde eine signifikante Vergrößerung erreicht. Der Zusatz von 4 g NaCl und ein Probenvolumen von 10 ml lieferten für alle 5 Stoffe die größten Peakflächen mit einem akzeptablen Variationskoeffizienten von 2,8 – 4,0 %.

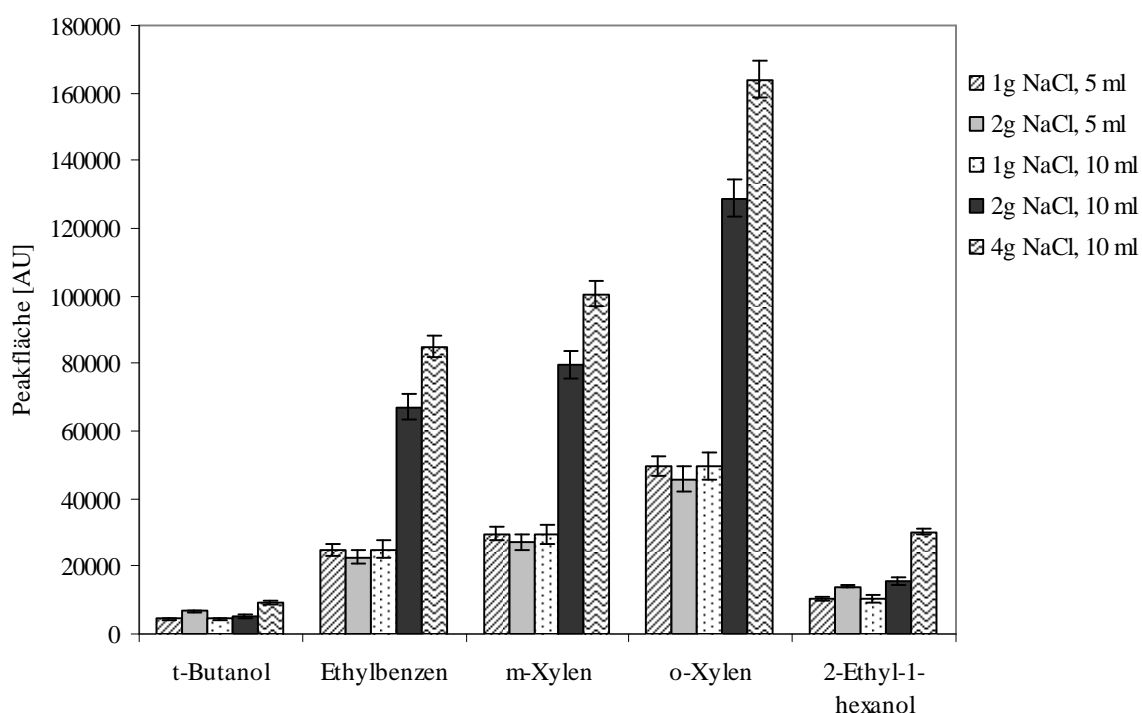


Abbildung 9 Einfluss von NaCl Zugabe und Probenvolumen auf die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der HS-GC-FID Methode, n = 5

3.2.2.4 Einfluss der Temperatur und Temperierdauer auf die Gleichgewichtseinstellung

Beim Headspaceaufgabesystem soll durch Temperierung der flüssigen Probe im gasdicht verschlossenen Probengläschen ein Gleichgewicht zwischen Probenlösung und dem Dampfraum darüber entstehen. Durch Erhöhung des Sättigungsdampfdruckes der reinen Spurenkomponente kann die Nachweisgrenze gesenkt werden, was durch Temperaturerhöhung möglich ist. Da dies jedoch auch zum Substanzverlust oder Gefäßbruch führen kann, sind dem Grenzen gesetzt, welche im Folgenden untersucht werden sollten [65].

Bei der HS-GC wird das Vial bei definierter Temperatur und Geschwindigkeit für eine festgelegte Zeit geschüttelt. Nach Temperierung wird ein bestimmtes Volumen aus dem Dampfraum mittels Spritze entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, dass es zur Einstellung des Konzentrationsgleichgewichtes kommt. Um dies zu erreichen, wurden sowohl Temperatur des Schüttlers (70, 80, 90 °C) als auch die Temperierdauer (10, 15, 20, 30 min) variiert. Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleiches der Peakflächen von t-Butanol, Ethylbenzen, m-Xylen, o-Xylen und 2-Ethyl-1-hexanol. Die Versuche ergaben eine signifikante Erhöhung der Peakflächen bei Zunahme der Temperatur. Außerdem wirkte sich die Temperaturerhöhung günstig auf die VKs aller 5 Stoffe aus, was eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Methode widerspiegelte. Beim Vergleich der Temperierzeiten war zu erkennen, dass nach 15 min die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Flüssigkeit und Dampfraum erreicht wurde, da sich die Peakflächen nach 20 und 30 min nicht signifikant von denen nach 15 min unterschieden. Eine zehnminütige Temperierung führte nicht zur Gleichgewichtseinstellung, erkennbar an den Flächen der Benzolderivate, die signifikant kleiner waren als nach 15 min Temperierung. Abbildung 10 verdeutlicht die Ergebnisse.

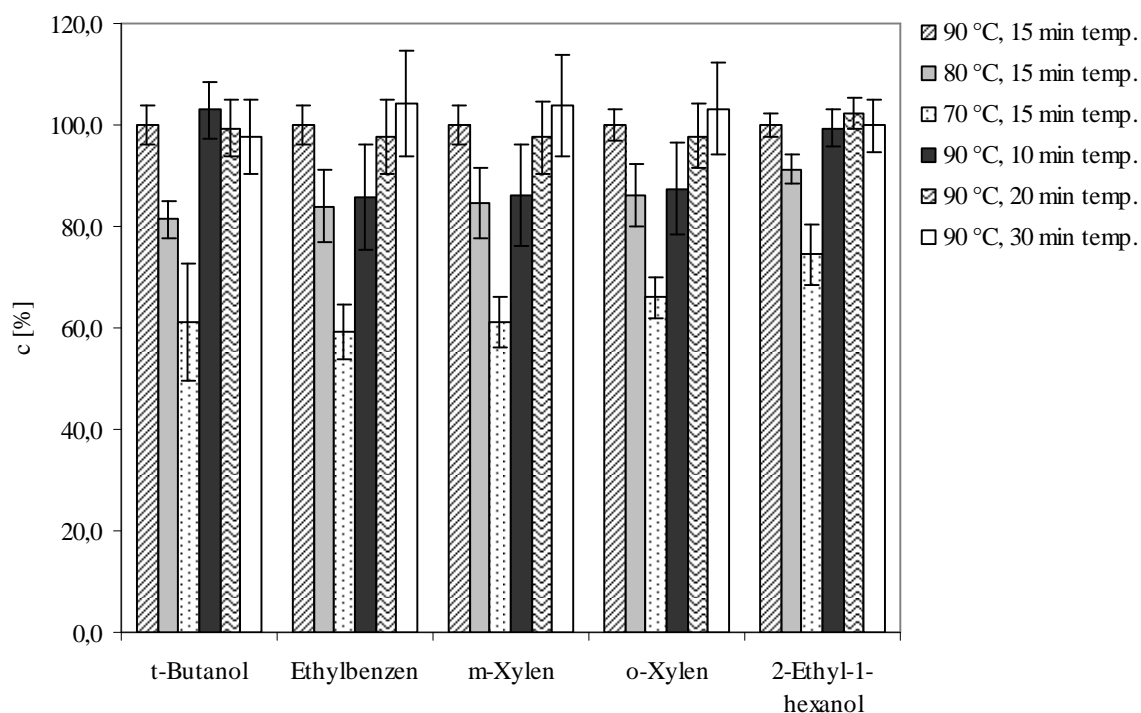


Abbildung 10 Einfluss der Temperatur und Temperierzeit auf die Gleichgewichtseinstellung zwischen Flüssigkeit und Dampfphase bei der HS-GC-FID Methode, n = 5

Die beschriebene Optimierung führte zur finalen Methode in Tabelle 16, wodurch das Chromatogramm aus Abbildung 11 erhalten wurde.

Tabelle 16 Optimierte HS-GC-FID Methode zur Bestimmung leicht flüchtiger Extraktivstoffe

NaCl Zugabe:	4 g
Probenvolumen:	10 ml
Temperatur Spritze:	95 °C
Temperatur Schüttler:	90 °C
Geschwindigkeit Schüttler:	250 r/min
Dauer des Schüttelns:	15 min
Druck Trägergas He _{konst.} :	13 psi (entspricht Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min bei 60 °C)
Split:	10:1
Injektionsvolumen:	2000 µl
Liner:	Agilent Liner 4 mm ID

Inlettemperatur:	260 °C
Säule:	Varian; FactorFour capillary columns VF-624ms; 60 m * 0.25 mm; 1.4 µm
Temperaturprogramm:	50 °C (10 min) 4 °C/min 140 °C 5 °C/min 220 °C
Detektion:	FID (Temp.: 260 °C)

Da mittels HS-GC-FID ausschließlich wässrige Medien untersucht werden sollten, war eine Überprüfung der Eignung für Isopropanol und Hexan als Lösemittel nicht notwendig. Während der Migrationsstudie wurde jedoch zusätzlich zu Wasser auch ein Kontrastmittel untersucht. Wie die Validierung in Kapitel 4.2.1 zeigt, eignete sich die entwickelte Methode einschließlich Probenvorbereitung auch für dieses Medium.

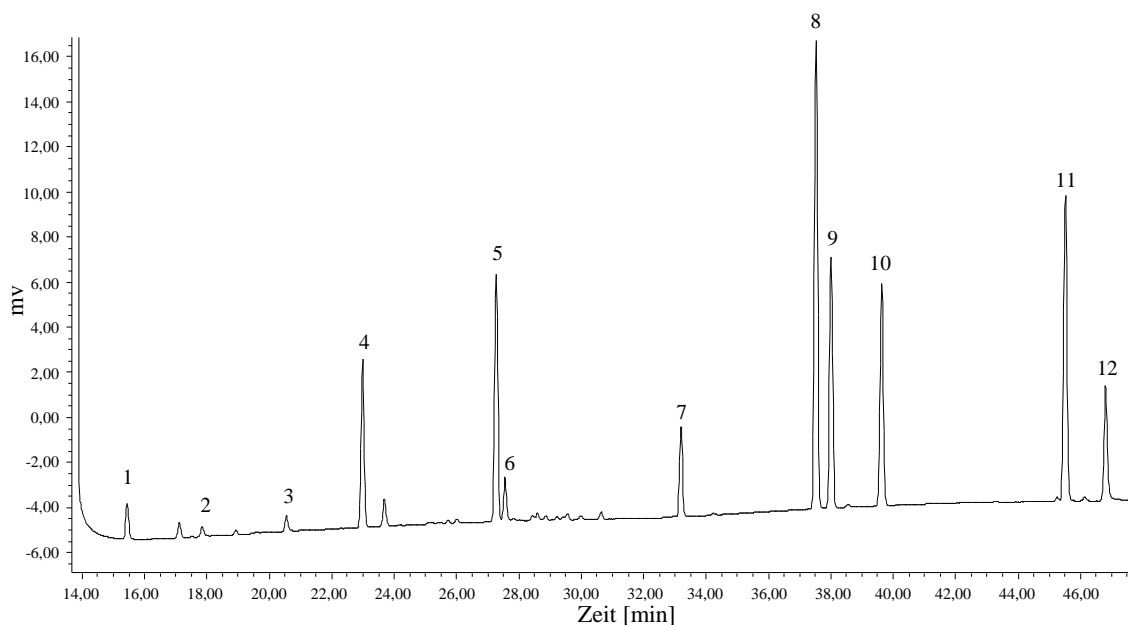


Abbildung 11 HS-GC-FID Chromatogramm: 1=t-Butanol, 2=1-Propanol, 3=2-Butanol, 4=3-Methylhexan, 5=Methylcyclohexan, 6=3-Pentanol, 7=3-Hexanon, 8=Ethylbenzen, 9=m-Xylen, 10=o-Xylen, 11=p-Methylstyren, 12=2-Ethyl-1-hexanol, 1 ppm Lösung

3.2.3 Entwicklung einer GC-MS Methode zur Bestimmung flüchtiger potentieller Extraktivstoffe

Für die Entwicklung einer GC-MS Methode wurden die Stoffe aus den Vorversuchen berücksichtigt, deren Siedepunkte oberhalb von 200 °C liegen. Diese Auswahl wurde ergänzt durch sieben weitere Kunststoffadditive bzw. deren Abbauprodukte, welche laut Hersteller potentielle Extraktivstoffe darstellen können. Eine Auflistung der mittels GC-MS zu untersuchenden Substanzen findet sich in den Tabellen 17, 18 und 19.

Tabelle 17 Silikonölderivate für die GC-MS Bestimmung

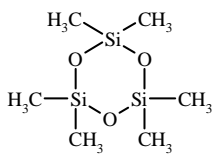
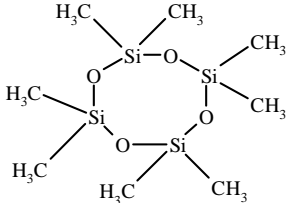
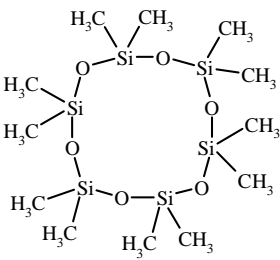
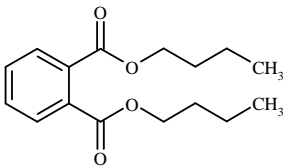
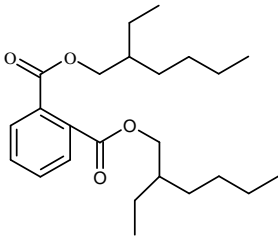
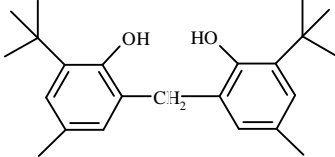
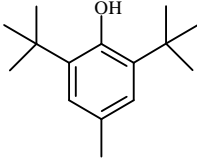
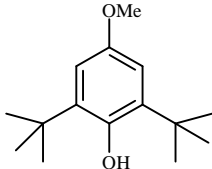
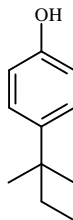
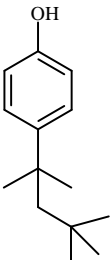
HMCTS		OMCTS	
DMCPS			

Tabelle 18 Abbauprodukte Polyolefine für die GC-MS Bestimmung

Decan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	Dodecan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
Tetradecan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$	Hexadecan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$
Octadecan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$	Docosan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CH}_3$
Eicosan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$	Hexacosan	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_3$

Tabelle 19 Kunststoffadditive und Abbauprodukte für die GC-MS Bestimmung

<p>DBP <i>Weichmacher</i></p>		<p>DEHP <i>Weichmacher</i></p>	
<p>MTBC <i>Antioxidans</i></p>		<p>BHT <i>Antioxidans</i></p>	
<p>B-BHA <i>Antioxidans</i></p>		<p>t-Amylphenol <i>Abbauprodukt Antioxidans</i></p>	
<p>t-Octylphenol <i>Abbauprodukt Antioxidans</i></p>		<p>1-Nonanol <i>Abbauprodukt Weichmacher</i></p>	<p>$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{OH}$</p>
<p>Dihexylether <i>Restlösemittel</i></p>	<p>$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{OCH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$</p>		

3.2.3.1 Herstellung der Probenlösungen

Während alle relevanten Substanzen sowohl in Isopropanol als auch in Hexan gut löslich sind, sind sie in Wasser sehr schlecht löslich oder praktisch unlöslich. Aus diesem Grund wurde der Zusatz eines Lösungsvermittlers notwendig. Bei der Probenvorbereitung zur HPLC Analyse wurde für eine verbesserte Löslichkeit in Wasser mit einem 50 %igen Isopropanolzusatz gearbeitet. Da auf gleiche Weise auch die späteren Extrakte und Migrationsproben vorbehandelt werden mussten, sollte für eine vereinfachte Probenvorbereitung in den späteren Studien der gleiche Lösemittelzusatz für die GC-MS Analyse gewählt werden.

Der Zusatz von Isopropanol lieferte reproduzierbare Ergebnisse mit akzeptabler Sensitivität. Außerdem bot er die Möglichkeit, geringe, für das bloße Auge nicht sichtbare Niederschläge an Extraktiv- bzw. Migrationsstoffen, welche sich durch erhöhte Temperatur noch in Lösung befinden könnten, jedoch nach Abkühlung wieder ausfallen, wieder zu lösen.

Reines Kontrastmittel war für die GC-MS Analyse mit Direktinjektion nicht geeignet, da sie zum Verkleben der Spritze führte, weshalb eine Injektion unmöglich war. Aus diesem Grund sollte das Kontrastmittel mit Hexan extrahiert werden. Um das richtige Verhältnis zwischen Probe (10 ml) und Extraktionsmittel zu finden, wurde das Volumen an Hexan zwischen 1 und 2 ml variiert. Zudem wurde der Einfluss der Extraktionszeit auf die Reproduzierbarkeit und Menge der extrahierten Stoffe überprüft. Für diesen Versuch wurde eine Standardlösung von OMCTS, BHT, B-BHA und DEHP in Isopropanol (je 100 mg/l) hergestellt. Diese wurde mit Kontrastmittel auf eine Endkonzentration der Analyten von 100 µg/l beziehungsweise 1 mg/l verdünnt. Beiden Lösungen wurde soviel Isopropanol zugesetzt, dass sie je 1 % des Lösungsvermittlers enthielten.

Diese Lösungen wurden für $n = 5$ unterschiedlich lang und mit einem unterschiedlichen Probe-Extraktionsmittel-Verhältnis extrahiert. Hierfür wurden die Proben in ein 20 ml Probengläschen gefüllt und nach dem Zusatz von Hexan bei 170 U/min geschüttelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20 Ergebnisse der Extraktionsversuche; Wdf = Wiederfindungsrate, Wdf_M = mittlere Wiederfindungsrate = Mittelwert aus den Wiederfindungsraten der 100 µg/l und 1 mg/l Lösung, s_{relM} = relative Standardabweichung der mittleren Wiederfindungsrate

Stoffe		1,5 h Extraktion						2,0 h Extraktion					
		1 ml Hexan			2 ml Hexan			1 ml Hexan			2 ml Hexan		
		100 µg/l	1,0 mg/l	Wdf_M	100 µg/l	1,0 mg/l	Wdf_M	100 µg/l	1,0 mg/l	Wdf_M	100 µg/l	1,0 mg/l	Wdf_M
OMCTS	Wdf [%]	73,1	78,1	75,6	70,6	71,7	71,2	84,6	95,8	90,2	78,3	84,7	81,5
	s_{relM} [%]			3,5			0,8			8,0			4,5
BHT	Wdf [%]	103,4	99,4	101,4	92,0	87,5	89,8	104,7	114,1	109,4	95,4	98,1	96,7
	s_{relM} [%]			2,8			3,2			6,7			1,9
B-BHA	Wdf [%]	102,8	102,8	102,8	93,6	93,1	93,4	114,1	120,8	117,5	105,5	107,0	106,3
	s_{relM} [%]			0,0			0,3			4,7			1,1
DEHP	Wdf [%]	103,0	111,3	107,1	88,6	93,9	91,3	93,9	126,1	110,0	88,9	105,1	97,0
	s_{relM} [%]			5,9			3,7			22,8			11,5

Die Versuche zeigten, dass die Verwendung von 1 ml Hexan die schlechteste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lieferte, was sich über relative Standardabweichungen der mittleren Wiederfindungsrate von 0,01 – 22,8 % widerspiegelte. Außerdem stellte 1 ml Extraktionsflüssigkeit ein zu geringes Volumen dar, um nach der Extraktion sauber abpipettiert werden zu können. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass hierbei auch Kontrastmittel ins GC-Vial überführt und somit die Ergebnisse verfälscht wurden. Bei der Extraktion mit 2 ml Hexan zeigten sich sowohl nach 1,5 h als auch nach 2 h geringere Wiederfindungsraten (70,6 – 107,0 %), wobei die relativen Standardabweichungen der mittleren Wiederfindungsraten nur zwischen 0,3 und 11,5 % variierten. Da vor allem DEHP nach 90 min Extraktion eine geringere relative Standardabweichung lieferte als nach zweistündiger Extraktion, wurden diese Extraktionsparameter als Mittel der Wahl angesehen. Sie führen außerdem zur Zeiterparnis, was für die Etablierung als Routinemethode von großer Bedeutung ist.

3.2.3.2 Optimierung der GC-Parameter

In der vorliegenden Arbeit kam ein EI-QMS (Electron-Impact-Quadrupol-Massenspektrometer) zum Einsatz. Zur Erfassung der aufgeführten Substanzen wurde eine unpolare Standardkapillare (HP-5MS, Agilent) mit geringem polarem Anteil verwendet. Sie ist besonders geeignet für die Trennung von Kohlenwasserstoffen, Phenolen und leicht flüchtigen Stoffen. Das optimierte Temperaturprogramm erwies sich als guter Kompromis zur Trennung aller 20 Komponenten innerhalb von 35 min. Die Identifizierung und Quantifizierung sollte im SIM Modus (SIM = Selected Ion Monitoring) sowohl über Retentionszeitvergleich als auch über das charakteristische Massenspektrum vollzogen werden, da hier die Sensitivität größer war als im Scan Modus, und somit niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht werden konnten. Für diesen Zweck mussten zunächst die für jeden Stoff typischen Fragmente bestimmt werden, um nach diesen später gezielt zu suchen. Eine Auflistung der gewählten Fragmente befindet sich in Tabelle 21 . Nachteil des SIM-Modus ist das Ignorieren von Peaks anderer Fragmente, welche durch das Ausblenden von Masse-Ladungs-Verhältnissen nicht sichtbar werden. Dies kann zum Übersehen von wichtigen Extraktivstoffen führen. Aus diesem Grund wurden innerhalb der Studien auch Chromatogramme im Scan-Modus aufgenommen und ausgewertet. Die GC Parameter wurden hierbei nicht verändert.

Tabelle 21 GC Stoffe mit Retentionszeit und Fragmenten

Stoff	t _R [min]	Fragmentationen [m/z]
HMCTS	4,74	191; 207
OMCTS	7,50	207; 281
Decan	8,01	43; 57
DMCPS	9,97	73; 267; 355
1-Nonanol	10,79	43; 56; 70
Dodecan	11,19	43; 57; 71
Dihexylether	12,24	43; 85
Tetradecan	14,01	43; 57
t-Amylphenol	14,08	107; 135
BHT	15,47	205; 220
Hexadecan	16,52	43; 57; 71
t-Octylphenol	16,73	107; 135
B-BHA	17,01	221; 236
Octadecan	18,76	43; 57; 71
Eicosan	20,79	43; 57; 71
DBP	21,01	102; 239; 256
Docosan	22,65	43; 57; 71
MTBC	24,62	161; 177; 340
DEHP	25,50	149; 167
Hexacosan	25,92	43; 57; 71

Mit Hilfe dieser Angaben wurde festgelegt, in welchem Retentionszeitfenster nach welchen Fragmenten gesucht werden sollte. In Tabelle 22 sind die Methodenparameter der optimierten Methode aufgelistet das daraus resultierende Chromatogramm (SIM) ist in Abbildung 12 zu sehen.

Tabelle 22 Optimierte GC-MS Methode zur Bestimmung flüchtiger Extraktivstoffe

Flussgeschwindigkeit Trägergas He	1,5 ml/min
Split:	Splitless
Injektionsvolumen:	1 µl
Liner:	Agilent Liner 4 mm ID Tap GW

Methodenentwicklung

Inlettemperatur:	300 °C
Säule:	HP-5MS, 30 m * 0.25 mm, 0.25 µm
Temperaturprogramm:	40 °C (1 min) 10 °C/min 350 °C (3 min)
Detektion:	MS SIM Modus

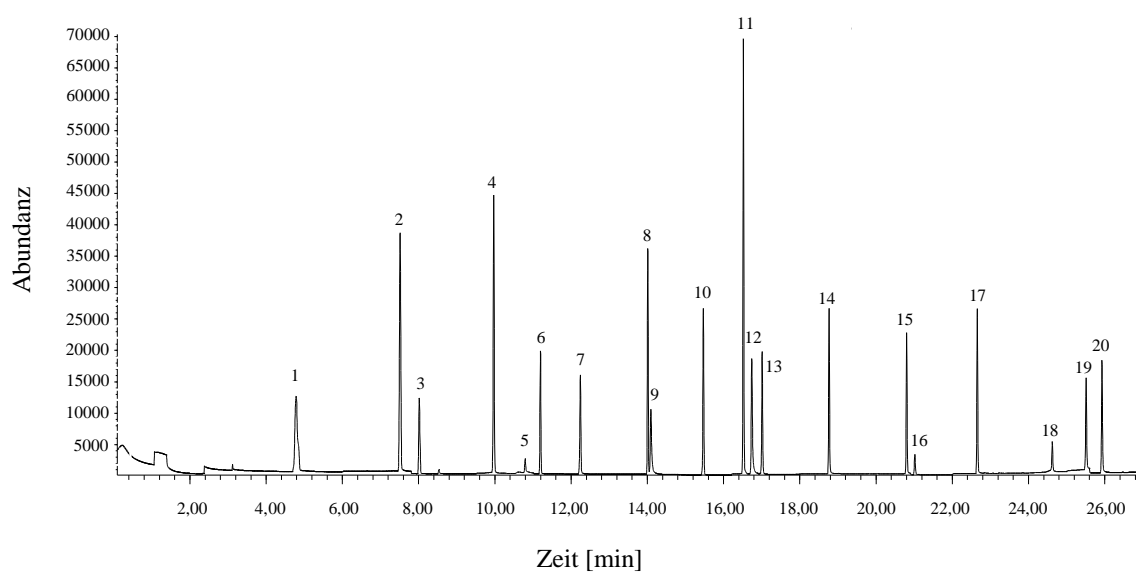


Abbildung 12 GC-MS Chromatogramm; 1 = HMCTS, 2 = OMCTS, 3 = Decan, 4 = DMCPs, 5 = 1-Nonanol, 6 = Dodecan, 7 = Dihexylether, 8 = Tetradecan, 9 = t-Amylphenol, 10 = BHT, 11 = Hexadecan, 12 = t-Octylphenol, 13 = B-BHA, 14 = Octadecan, 15 = Eicosan, 16 = DBP, 17 = Docosan, 18 = MTBC, 19 = DEHP, 20 = Hexacosan, 1 ppm Lösung

3.2.4 Geräte und Chemikalien

3.2.4.1 Geräte

HS-GC-FID

Gaschromatograph: Hewlett Packard 5890 Series II Gaschromatograph, Multi purpose Sampler MPS2-Twister

Auswertesoftware: ChemStation Rev. B.02.01-SR2[260], Agilent Technologies 2001-2006

GC-MS:

Gaschromatograph: Hewlett packard, HP 6890 Series GC Systems

MS: Hewlett Packard 5973 Mass selective Detector

Auswertesoftware: MSD Security ChemStation A.02.00.376, Agilent Technologies 1989-2005

weitere Geräte:

Schüttler: GFL 3017

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex RK 510 Transistor

Waagen: Analysenwaage BP211D Sartorius AG

Analysenwaage IsoCAL Sartorius AG

Millipore Anlage: Milli-Q A10 Gradient, Pack name: Q-Gard® 2

3.2.4.2 Chemikalien

HS-GC-FID

<u>t-Butanol</u>	Merck, Darmstadt
<u>1-Propanol</u>	VWR International, Darmstadt
<u>2-Butanol</u>	Fisher Scientific, Schwerte
<u>3-Methylhexan</u>	Merck, Darmstadt
<u>Methylcyclohexan</u>	Acros Organics, Geel
<u>3-Pentanol</u>	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
<u>3-Hexanon</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>m-Xylen</u>	Acros Organics, Geel
<u>o-Xylen</u>	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Ethylbenzen</u>	Acros Organics, Geel
<u>p-Methylstyren</u>	ABCR, Karlsruhe
<u>2-Ethyl-1-hexanol</u>	ABCR, Karlsruhe
<u>Natriumchlorid</u>	Riedel-de Haen, Seelze
<u>Aceton, p.a.</u>	Acros Organics, Geel

GC-MS

<u>HMCTS</u> (Hexamethylcyclotrisiloxan)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>OMCTS</u> (Octamethylcyclotetrasiloxan)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>DMCPS</u> (Decamethylcyclopentasiloxan)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Decan</u>	Merck, Darmstadt
<u>t-Amylphenol</u>	Acros Organics, Geel
<u>t-Octylphenol</u>	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Tetradecan</u>	Merck, Darmstadt

<u>Hexadecan</u>	Merck, Darmstadt
<u>Octadecan</u>	Merck, Darmstadt
<u>Dodecan</u>	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
<u>Docosan</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Eicosan</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Hexacosan</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>DBP</u> (Dibutylphthalate)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>1-Nonanol</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Dihexylether</u>	ABCR, Karlsruhe
<u>Add. 7 Ph. Eur., BHT</u> (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>MTBC</u> (2,2`methylenebis(6-t-butyl-4-methylphenol))	ABCR, Karlsruhe
<u>B-BHA</u> (2,6-Di-tert-butyl-4-methoxyphenol)	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Add. 1 Ph. Eur., DEHP</u> (Diethylhexylphthalat)	LGC, Luckenwalde
<u>Isopropanol</u> , spectrophotometric grade	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Hexan</u> , p. a.	Merck, Darmstadt
<u>Millipore-Wasser</u>	Milli-Q A10 Gradient, Pack name: Q-Gard [®] 2; Millipore GmbH

3.3 ENTWICKLUNG FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHER METHODEN FÜR DIE BESTIMMUNG NICHT FLÜCHTIGER POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE

3.3.1 Allgemeines

Für die Erfassung nicht flüchtiger Extraktivstoffe wurde mit einer HPLC-UV gearbeitet. Die auf diesem Gerät entwickelte Methode soll im Nachhinein routinemäßig zum Einsatz kommen. Des Weiteren sollte die Eignung einer UPLC-UV-MS für die Überprüfung von Extraktions- und Migrationsprofilen von Kunststoffverpackungen getestet werden.

3.3.2 Entwicklung einer HPLC-UV Methode für die Bestimmung nicht flüchtiger potentieller Extraktivstoffe

In der Vergangenheit sind bereits zahlreiche Methoden für die Untersuchung bestimmter Kunststoffe durch verschiedene Autoren beschrieben worden [11, 61, 66]. Jedoch existiert bis heute keine Screening-Methode, die eine gezielte Auswahl häufig vorkommender materialübergreifender Extraktivstoffe erfasst. Ausgangspunkt der Methodenentwicklung stellte die Methode nach Cristina Nerin [60] dar. Hier wurde das Extraktionsprofil von Polycarbonat durch Lösen des Materials erstellt. Da diese HPLC-UV-Fluoreszenz-Methode die Trennung von 22 verschiedenen Kunststoffadditiven bzw. Kunststoffmonomeren ermöglichte, stellte sie eine sehr gute Grundlage für die Zwecke dieser Arbeit dar. Ergänzt wurde die Substanzauswahl durch weitere Additive bzw. Abbauprodukte, die laut Hersteller potentielle Extraktivstoffe darstellen. Die für die HPLC-UV relevanten Stoffe sind in den Tabellen 23, 24 und 25 aufgeführt.

Tabelle 23 Antioxidantien für die HPLC-UV Bestimmung

B-BHA		BHT	
Additiv 8 Ph. Eur		Irganox 1010	
Additiv 13 Ph. Eur.		Irganox 1330	
MTBC		ODPA	
Topanol		Irgafos 168	

Methodenentwicklung

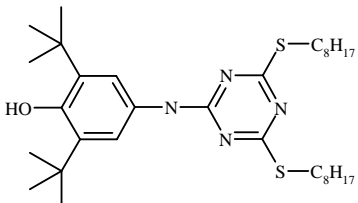
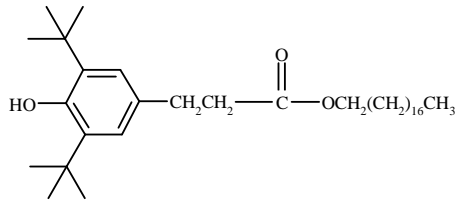
Irganox 565		Irganox 1076	
-------------	---	--------------	--

Tabelle 24 UV-Absorber für die HPLC-UV Bestimmung

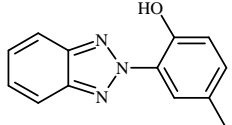
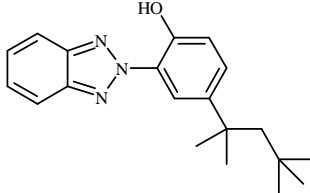
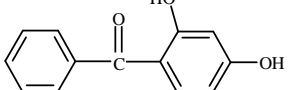
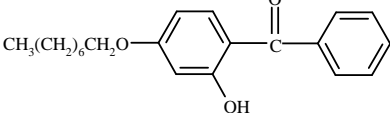
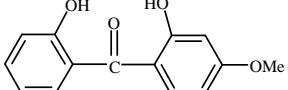
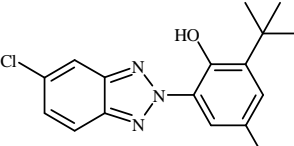
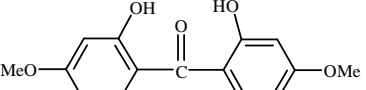
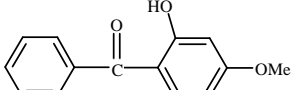
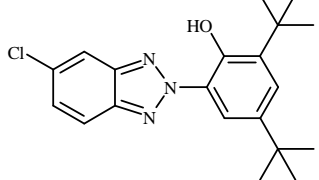
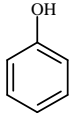
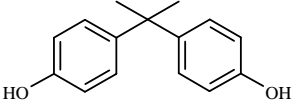
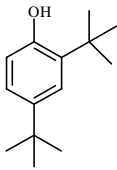
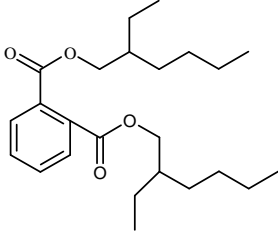
Tinuvin P		Tinuvin 329	
DHBP		Chima-sorb	
DHMBP		Tinuvin 326	
DHDMBP		Eusolex	
Tinuvin 327			

Tabelle 25 Weitere Stoffe für die HPLC-UV Bestimmung

Phenol <i>Abbauprodukt von Polycarbonat</i>		Bisphenol A <i>Abbauprodukt von Polycarbonat</i>	
DTBP <i>Abbauprodukt von Irgafos 168</i>		DEHP <i>Weichmacher</i>	
Schwefel <i>Vulkanisations- hilfsstoff</i>	S		

3.3.2.1 Herstellung der Probenlösungen

Die Herstellung der Hexan- und Isopropanol-Stammlösungen stellte sich als unproblematisch heraus. Bei der Verwendung von Wasser als Lösemittel war der Zusatz eines Lösungsvermittlers notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass 50 % Isopropanol notwendig sind, um die ausgewählten Stoffe mit einer Konzentration von 10 mg/l in Wasser zu lösen. Auf gleiche Weise wurden die Standards, gelöst in einem Kontrastmittel, für die Migrationsstudie hergestellt. Gleiches betraf die Extraktions- und Migrationsproben der späteren Studien. Der organische Zusatz bot den Vorteil, dass sich Extraktiv- und Migrationsstoffe, welche sich bei erhöhter Temperatur noch in Lösung befinden und erst nach Abkühlen ausfallen, dauerhaft in Lösung gebracht werden. Hexanhaltige Standards und Proben mussten vor der HPLC-UV Analyse weiterverarbeitet werden, da sich Hexan als Lösungsmittel für die HPLC Analytik nicht eignete. Durch dessen starke Elutionskraft kam es bei RP-Säulen zur Verschleppung der Probe, was zu einem Fronting oder sogar zu Doppelpeaks der zeitig eluierenden Stoffe führte. Um dies zu vermeiden, wurden 10 ml des Hexan-Extraktes zur Trockne eingeeengt und mit 10 ml Isopropanol aufgenommen. Die Isopropanollösung konnte nun mittels HPLC-UV untersucht werden.

Im Laufe der Methodenentwicklung stellte sich heraus, dass das Antioxidans Irgafos 168 sofort nach dem Lösen in Isopropanol oxidiert wird und so das entsprechende Phosphat entsteht (siehe Abbildung 13). Im Chromatogramm waren bei der ersten Injektion sofort nach Herstellung der Lösung zwei Peaks erkennbar (siehe Abbildung 14). Da beide Stoffe einen unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten haben, Irgafos 168 oxid jedoch käuflich nicht zu erwerben ist, wurde für eine reproduzierbare Quantifizierung die erschöpfende Oxidation von Irgafos 168 erzwungen und somit die Quantifizierung über sein Oxid ermöglicht.

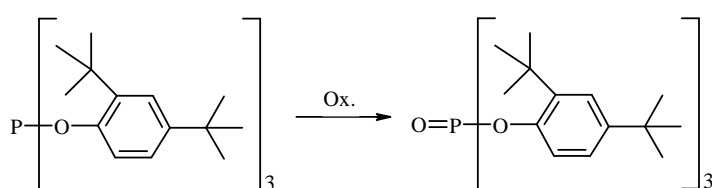


Abbildung 13 Oxidation des Irgafos 168 zum Irgafos 168 oxid

In Anlehnung an J. A. Garde [67] wurde versucht, Irgafos 168 in THF zu lösen, wobei nach 24 h eine quantitative Umsetzung zum Oxid stattfinden sollte. Mit Hilfe der HPLC-UV konnte dies bestätigt werden. Bei den später im Rahmen der Extraktions- und Migrationsstudien zu untersuchenden Proben wurden Isopropanol (100 % und 50 %) bzw. Hexan als Lösemittel eingesetzt, weshalb die Oxidation von Irgafos 168 auf möglichst einfache Weise in die bereits angewandte Probenvorbereitung integriert werden sollte. Das Antioxidans wurde unter Zusatz von 10 % Wasserstoffperoxid (30 %ig) in Isopropanol gelöst und nach 12 Stunden mittels HPLC-UV bei 220 nm vermessen. Eine quantitative Umsetzung zum Oxid wurde mittels HPLC-UV und LC-MS bestätigt.

Im Rahmen der Extraktions- und Migrationsstudie wurden die Proben in denen Irgafos 168 enthalten ist, ein zweites Mal nach Zusatz von Wasserstoffperoxid vermessen und als Oxid quantifiziert. Hexanextrakte wurden eingengt und mit Isopropanol aufgenommen. Der Isopropanolextrakt wurde entsprechend oxidiert.

3.3.2.2 Optimierung der Methoden-Parameter

Ziel dieser Methodenoptimierung war es, für alle 26 Substanzen eine Basislinientrennung zu erreichen, da ein gleichzeitiges Vorkommen der Stoffe möglich ist. So sollte eine reproduzierbare Quantifizierung benachbarter Peaks gewährleistet werden. Da diese Bedingung durch die Nerin-Methode [60] nicht erfüllt wurde, war eine Anpassung dieser Methode notwendig.

Für die Trennung der 26 Stoffe wurde eine PAH-Säule (YMC PAH 150 * 4 mm; 3 µm) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine C18-Säule, die besonders dafür geeignet ist, chemisch sehr ähnliche Stoffe voneinander zu trennen. Die Säulentemperatur betrug 45 °C. Nach der Verwendung verschiedenster Fließmittel kamen in der finalen Methode Acetonitril und Wasser zum Einsatz. Da das gewählte Substanzspektrum mit einem großen Polaritätsbereich einherging, sich die Stoffe teilweise jedoch sehr ähnlich waren, war ein komplexer Stufen- und Flussgradient notwendig, um für alle Analyten eine Basislinientrennung zu erreichen. So steigt der Acetonitrilanteil in der finalen Methode von 35 % auf 100 % und der Fluss von 1,0 ml/min auf 2,0 ml/min (siehe Tabelle 26). Die Wellenlänge wurde anlehnend an Literaturdaten [68 - 70] auf 220 nm festgelegt, da dies den bestmöglichen Kompromis bezüglich Signal-Rausch-Verhältnis für alle Analyten darstellte. Das resultierende Chromatogramm zeigt Abbildung 14.

Tabelle 26 HPLC Gradient

t [min]	Fluss [ml/min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0,0	1,0	65	35
13,0-20,0	1,2	49	51
60,0	1,5	0	100
69,0	2,0	0	100

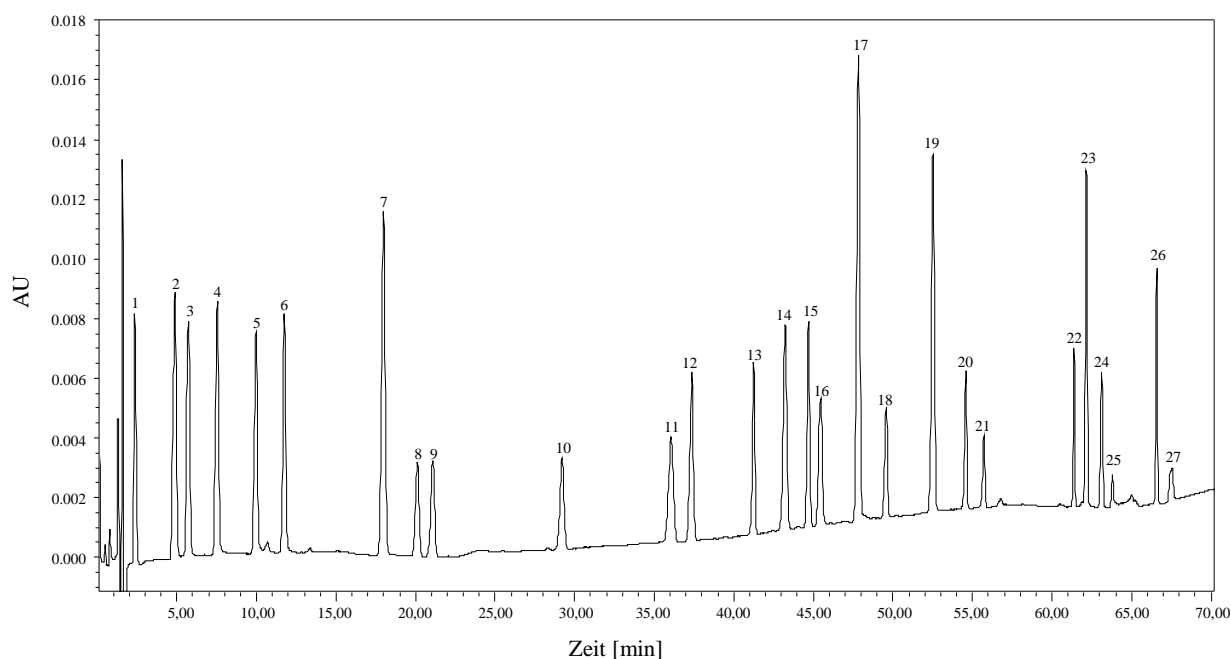


Abbildung 14 HPLC-UV Chromatogramm (0,5 ppm) der 26 getrennten potentiellen Extraktivstoffe; 1 = Phenol, 2 = BPA, 3 = DHBP, 4 = DHMBP, 5 = DHDMBP, 6 = Eusolex, 7 = B-BHA, 8 = Tin P, 9 = DTBP, 10 = BHT, 11 = S, 12 = MTBC, 13 = Add 8 Ph. Eur., 14 = Tin 329, 15 = Topanol, 16 = Chimasorb, 17 = Tin 326, 18 = DEHP, 19 = Tin 327, 20 = Add 13 Ph. Eur., 21 = ODPa, 22 = Irg 1010, 23 = Irg 1330, 24 = Irg 565, 25 = Irgafos 168 oxid, 26 = Irgafos 168, 27 = Irg 1076, 1 ppm Lösung

Bei der Analyse des Kontrastmittels zeigten sich Grenzen der Methode auf. Das polare Kontrastmittel eluierte in Form eines sehr breiten Peaks zu Beginn des Chromatogramms und verhinderte die Identifizierung und Quantifizierung der ersten 6 Peaks (Phenol, Bisphenol A, DHBP, DHMBP, DHDMBP und Eusolex). Des Weiteren musste eine Vorsäule des gleichen Materials verwendet werden, die durch das Zurückhalten von Verunreinigungen die Lebensdauer der Säule verlängerte.

3.3.3 Entwicklung einer UPLC-UV-MS Methode für die Bestimmung nicht flüchtiger potentieller Extraktivstoffe

Bei der UPLC (Ultra Pressure Liquid Chromatography) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der HPLC, bei der Säulenmaterialien mit Partikeln eines Durchmessers kleiner als 2,5 µm entwickelt wurden. Laut van-Deemter-Gleichung (siehe Gleichung 2) verkleinert sich die Bodenhöhe durch Abnahme der Eddy-Diffusion und dem reduzierten Massenübergang zwischen stationärer und mobiler Phase, was sich vorteilhaft auf die Effizienz der Säule aus-

übt. Diese beiden Terme werden beeinflusst durch den Teilchendurchmesser der stationären Phase [76].

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u \quad (2)$$

H = Bodenhöhe, A = Eddy-Diffusion, B = Longitudinaldiffusion, C = beschreibt den Massenübergang zwischen stationärer und mobiler Phase, u = Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase

Außerdem können Partikel mit einem Durchmesser kleiner als 2 μm über einen größeren Bereich der linearen Geschwindigkeit eingesetzt werden, ohne an Trennleistung zu verlieren. Dies führt zur Verkürzung der Analysenzeit bei gleichzeitiger Zunahme der Auflösung und Empfindlichkeit [71].

Während bereits mehrere Veröffentlichungen über die Erstellung von Extraktionsprofilen mittels HPLC oder GC zu finden sind, sind Informationen über die Nutzung von UPLC rar. BENTAYEB et al. untersuchte rezykliertes PET mittels UPLC-MS, erzeugte jedoch nur Totalionenchromatogramme, deren Identifizierung zum größten Teil noch aussteht [72]. Eine Screening-Methode für die UPLC existiert bis heute nicht. Daher sollte eine UPLC-Methode entwickelt werden, die bei den Extraktions- und Migrationsstudien vergleichend zum Einsatz kam.

3.3.3.1 Herstellung der Probenlösung

Da mit dieser Methode hauptsächlich Substanzen untersucht werden sollten, die auch mittels HPLC analysiert wurden, wurden die Probenlösungen auf gleiche Weise hergestellt. Eine Ausnahme stellte Additiv 3 Ph. Eur. dar. Während alle Stoffe in einer Konzentration von 10 mg/l in Isopropanol gelöst wurden, konnten von diesem zusätzlich untersuchten Additiv aufgrund seiner schlechten Löslichkeit maximal 5 mg/l in Lösung gebracht werden.

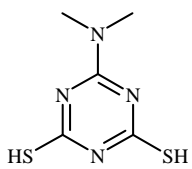
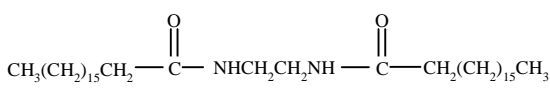
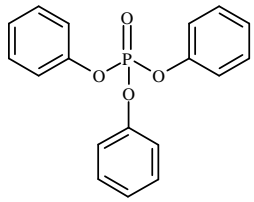
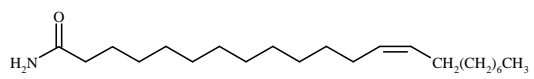
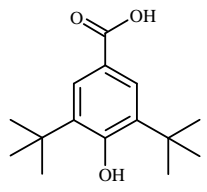
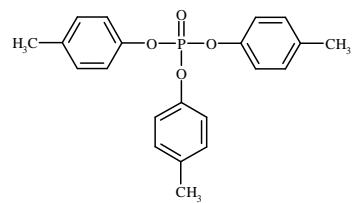
3.3.3.2 Optimierung der UPLC-UV-MS-Parameter

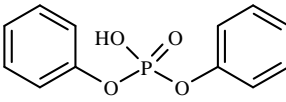
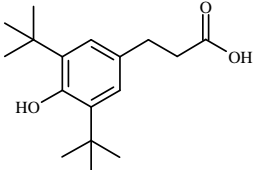
Das flüssigchromatographische Verfahren wurde gekoppelt mit einem MS-TOF (= Massenspektrometer-Time of Flight), das den Vorteil der möglichen Identifizierung unbekannter Peaks bietet. Als Ionenquelle wurde die APCI Technik (Atomic Pressure chemical Ionization) verwendet. Mit Hilfe dieser Ionisierungsart können Moleküle mit einer molaren Masse von bis zu 2000 g/mol untersucht werden. Vorteil ist die geringe Wahrscheinlichkeit der Fragmentierung. Die Identifizierung unbekannter Peaks erfordert jedoch einige Erfahrung, da eine elektronische Datenbanksuche im Gegensatz zur GC-MS aufgrund fehlender Vergleichsspektren nicht möglich ist. Zusätzlich zur MS-Detektion erfolgte die Auswertung über einen PDA (Photo Diode Array) Detektor im Bereich von 200 bis 500 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die bereits mittels HPLC-UV bestimmten Stoffe als auch neun weitere Substanzen für die Methodenentwicklung an der UPLC-UV-MS sowie Irgafos 168 oxidiert berücksichtigt. Hierbei handelte es sich um Kunststoffadditive und Abbauprodukte welche in Tabelle 27 aufgezählt sind.

Die Bestimmung von Phenol war mit dieser Methode nicht möglich. Aufgrund seiner Polarität eluierte Phenol bereits mit dem Lösemittelpeak und war nicht analysierbar. Durch die entwickelte HPLC-UV Methode wurde die ggf. notwendige Identifizierung jedoch sichergestellt.

Tabelle 27 Zusätzliche Stoffe für die UPLC Bestimmung

<p>DBATD</p> <p><i>Vulkanisationshilfsstoff</i></p>		<p>Additiv 3</p> <p>Ph. Eur.</p> <p><i>Antiblockmittel</i></p>	
<p>TPP</p> <p><i>Abbauprodukt von Irgafos 168</i></p>		<p>Additiv 21</p> <p>Ph. Eur.</p> <p><i>Gleitmittel</i></p>	
<p>DTBHB</p> <p><i>Abbauprodukt von Irganox 1010</i></p>		<p>TpTP</p> <p><i>Abbauprodukt von Irgafos 168</i></p>	

<p>DPP</p> <p>Abbauprodukt von Irgafos 168</p>		<p>DTBHP</p> <p>Abbauprodukt von Irganox 1010</p>	
<p>Stearinsäure</p> <p>Gleitmittel</p>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—OH}$		

Für die Analyse der 35 Stoffe wurde eine C18 Säule mit einer Partikelgröße von 1,7 µm verwendet (Waters Acquity BEH UPLC C18, 50 * 2,1 mm, 1,7 µm). Als Eluenten wurden Acetonitril und Wasser genutzt. Eine Anpassung des Gradienten der HPLC Methode war unumgänglich, um den Vorteil der verkürzten Analysezeit nutzen zu können. Nicht nur die Verwendung des Säulenmaterials mit sehr kleiner Partikelgröße, sondern auch die Kopplung an das Massenspektrometer führten zur enormen Zeitersparnis. Durch die Selektion bestimmter Ionen bot das MS die Möglichkeit, coeluerende Substanzen aufgrund ihrer charakteristischen Ionen zu unterscheiden und eine Basislinientrennung war nicht erforderlich.

Eine Ausnahme stellte Schwefel dar. Eine Ionisation war in diesem Fall nicht möglich, weshalb die Identifizierung und Quantifizierung im UV erfolgte. Ebenso im UV analysiert wurden Tinuvin P und BHT, da hier eine verbesserte Sensitivität erreicht wurde. Aus diesem Grund wurde für diese drei Stoffe eine Basislinientrennung im UV angestrebt um eine reproduzierbare Quantifizierung bei gleichzeitiger Anwesenheit benachbarter Peaks zu gewährleisten. Der daraus resultierende Gradient ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28 Gradient der UPLC-UV-MS Methode

t [min]	Fluss [ml/min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0,0-0,5	0.5	90	10
2,0	0.5	65	35
2,3-3,3	0.5	50	50
6,0-9,0	0.7	5	95

Die Analyse mittels Massenspektrometer erfolgte sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Modus. Die Methodenparameter sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29 MS-Parameter der UPLC-UV-MS Methode

Parameter	Positiv-Modus	Negativ-Modus
Ionisierungsmodus	APCI	APCI
Analysenmodus	W-Modus	W-Modus
Kapillarspannung [V]	1500	1000
Konusspannung (Sample Cone) [V]	20	10
Aperture 1 Spannung [V]	10	20
Desolvatationstemperatur [°C]	400	200
Quellentemperatur[°C]	100	100
Zerstäubergas [ml/min]	20	20
Desolvatationsgas [ml/min]	200	200
Massenbereich [m/z]	100-1300	100-1300
Scandauer [s]	0,1	0,1

Tabelle 30 gibt eine Übersicht über alle Substanzen, deren Retentionszeiten und charakteristische Ionen, sowie die Wellenlänge, bei der eine Identifizierung und Quantifizierung im MS bzw. UV (relevante Stoffe sind hervorgehoben) erfolgte.

Tabelle 30 Retentionszeiten und Ionen für die MS-Analyse

Nr.	Substanz [zu bestimmendes Ion bzw. Fragment]	t _R [min]	m/z Positiv-Modus	m/z Negativ-Modus	λ [nm]
1	DPP [M-H ⁺]	0,70		249,0317	
2	DBATD [M-H ⁺]	1,83		271,1051	
3	Bisphenol A [M-H ⁺]	2,61		227,1072	
4	DHBP [M-H ⁺]	2,67		213,0552	
5	DHMBP [M-H ⁺]	2,85		243,0657	
6	DHDMBP [M-H ⁺]	3,07		273,0763	
7	DTBHB [M-H ⁺]	3,11		249,1491	
8	Eusolex [M-H ⁺]	3,32		227,0708	
9	DTBHP [M-H ⁺]	3,47		277,1804	

Nr.	Substanz [zu bestimmendes Ion bzw. Fragment]	t _R [min]	m/z Positiv-Modus	m/z Negativ-Modus	λ [nm]
10	TPP [M+ACN+H ⁺]	3,91	368,1052		
11	Tinuvin P	4,09			212
12	DTBP [M-H ⁺]	4,39		205,1592	
13	B-BHA [M-H ⁺]	4,40		235,1698	
14	TpTP [M+H ⁺]	4,66	369,1256		
15	BHT	4,80			220
16	Additiv 8 Ph. Eur. [M-H ⁺]	5,10		793,468	
17	MTBC [M-H ⁺]	5,11		339,2324	
18	Schwefel	5,22			222
19	Topanol [M-H ⁺]	5,34		543,3839	
20	Chimasorb 81 [M-H ⁺]	5,45		325,1804	
21	Tinuvin 329 [M-H ⁺]	5,48		322,1919	
22	Tinuvin 326 [M-H ⁺]	5,65		314,106	
23	Additiv 19 Ph. Eur. [M-H ⁺]	5,72		283,2637	
24	DEHP [M+H ⁺]	5,78	391,2848		
25	Additiv 21 Ph. Eur. [M+H ⁺]	5,88	338,3423		
26	Tinuvin 327 [M-H ⁺]	5,99		356,153	
27	Additiv 13 Ph. Eur. [M-219]	6,04		564,3478	
28	ODPA [M+H ⁺]	6,23	394,3474		
29	Irganox 1010 [M+Na ⁺]	6,58	1199,7738	1175,7762	
30	Irganox 1330 [M-H ⁺]	6,72		773,5873	
31	Irganox 565 [M+H ⁺] oder [M-H ⁺]	6,86	589,3974	587,3817	
32	Irgafos 168 oxid[M+H ⁺]	6,97	663,4542		
33	Irganox 1076 [M-H ⁺]	7,28		529,4621	
34	Irgafos 168 [M+H ⁺]	7,88	647,4593		
35	Additiv 3 Ph. Eur. [M+H ⁺]	7,89	593,5985		

In Abbildung 15 befindet sich das UV Chromatogramm der UPLC Analyse. Die Zuordnung der Peaks ist Tabelle 30 zu entnehmen.

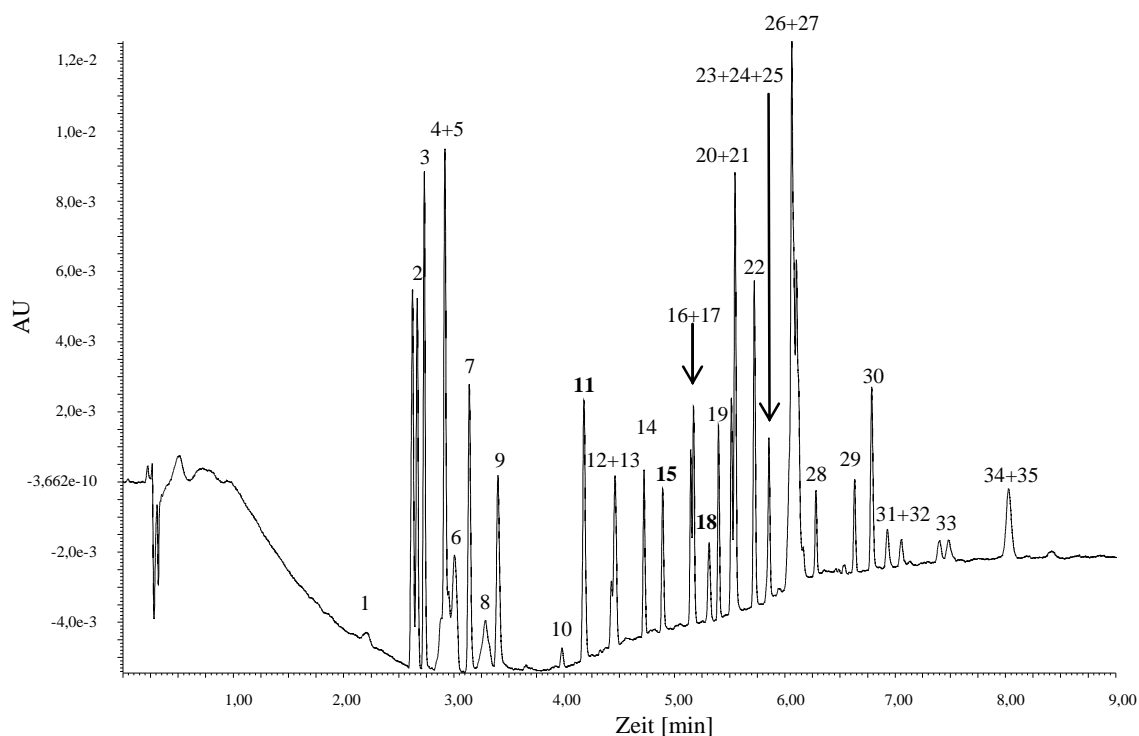


Abbildung 15 UPLC-UV Chromatogramm bei $\lambda=220$ nm, 0,5 ppm Lösung

Das Kontrastmittel ist nicht geeignet für diese Methode. Die hochkonzentrierte Lösung führte trotz Verwendung einer Vorsäule zur Überladung der UPLC-Säule, was eine Analyse im Ultraspurenbereich kaum ermöglichte.

3.3.4 Geräte und Chemikalien

3.3.4.1 Geräte

HPLC-UV:

Autosampler: WatersTM 717 plus Autosampler

Pumpe: WatersTM 616 Pump

Controller: WatersTM 600S Controller

Ofen: Column-Thermostat Jetstream 2 plus, VDS optilab

Entgaser: Degasys DG-2410, Uniflows

<u>Detektor:</u>	Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector
<u>Auswertesoftware:</u>	Empower 2 Software, Waters Corporation
<u>UPLC-UV-MS:</u>	
<u>UPLC:</u>	Acquity™ Ultra Performance LC; Waters
<u>Massenspektrometer:</u>	LCT Premier XE, Micromass® MS Technologies; Waters
<u>Sonstige Geräte:</u>	
<u>Ultraschallbad:</u>	Bandelin Sonorex RK 510 Transistor
<u>Waagen:</u>	Analysenwaage BP211D Sartorius AG Analysenwaage IsoCAL Sartorius AG
<u>Millipore Anlage:</u>	Milli-Q A10 Gradient, Pack name: Q-Gard® 2

3.3.4.2 Chemikalien

<u>Phenol</u>	Riedel-de Haen, Seelze
<u>Bisphenol A</u>	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
<u>DHBP</u> (2,4-Dihydroxybenzophenone)	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>DHMBP</u> (2,2`-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone)	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>DHDMBP</u> (2,2` dihydroxy 4,4` dimethoxybenzophenone)	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Eusolex</u> (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone)	Merck, Darmstadt
<u>B-BHA</u> (2,6-Di-tert-butyl-4-methoxyphenol)	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Tinuvin P</u> (2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-cresol)	Ciba, Basel
<u>DTBP</u> (2,4-Di-tert-butylphenol)	Merck, Darmstadt

Methodenentwicklung

Add. 7 Ph. Eur., BHT

(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)

Alfa Aesar, Karlsruhe

Schwefel

Sigma Aldrich, Steinheim

MTBC

(2,2`methylenebis(6-t-butyl-4-methylphenol))

ABCR, Karlsruhe

Add. 8 Ph. Eur.

(Ethylene bis [3,3-bis[3-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]butanoate])

LGC, Luckenwalde

Tinuvin 329

(2-(2-Hydroxy-5-t-octylphenyl)-benzotriazole)

Ciba, Basel

Topanol

(1,1,3-Tris(2-methyl-4-hydroxy-5-tert-butylphenyl)butane)

Sigma Aldrich, Steinheim

Chimasorb 81

(2-Hydroxy-4-(octyloxy)-phenyl-methanone)

Ciba, Basel

Tinuvin 326

(2-(5-chloro-2H-benzotriazole-2-yl)-6-(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol)

Ciba, Basel

Add. 1 Ph. Eur., DEHP

(Diethylhexylphthalat)

LGC, Luckenwalde

Tinuvin 327

(2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-bezotriazol-2-yl)phenol)

Ciba, Basel

Add. 13 Pr. Eur.

(1,3,5-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-s-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione)

LGC, Luckenwalde

ODPA

(Octylated Diphenylamine)

C. H. Erbslöh, Krefeld

Add. 9 Ph. Eur.

(Pentaerythrityl tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionate)

Ciba, Basel

Add. 10 Ph. Eur.

(3,3`,3`,5,5`,5`-hexa-tert-butyl-a,a`,a`-(mesitylene-2,4,6-triyl)tri-p-cresol)

Ciba, Basel

Add. 12 Ph. Eur.

(Tris (2,4-ditert-butylphenyl)phosphite)

ABCR, Karlsruhe

<u>Irganox 565</u> (2,6-di-tert-butyl 4(4,6 bis(octylthio)-1,3,5-triazin-2-ylamino)-phenol)	Ciba, Basel
<u>Add. 11 Ph. Eur.</u> (Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate)	Ciba, Basel
<u>2-dibutylamine-4-6-dithiol-s-triazin</u>	TCI Europe, Zwijndrecht
<u>Diphenylphosphat</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>3,5-Ditertbutyl-4-hydroxybenzoesäure</u>	ABCR, Karlsruhe
<u>3,5-Ditertbutyl-4-hydroxyphenylpropionsäure</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Triphenylphosphat</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Tri-p-tolyl phosphat</u>	Acros Organics, Geel
<u>N,N-Ethylenbis(stearamid)</u>	ABCR, Karlsruhe
<u>Didodecyl 3,3`-thiodipropionat</u>	LGC, Luckenwalde
<u>Stearinsäure</u>	Alfa Aesar, Karlsruhe
<u>Oleamid</u>	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Erucamid</u>	ABCR, Karlsruhe
<u>Isopropanol, spectrophotometric grade</u>	Sigma Aldrich, Steinheim
<u>Acetonitril, gradient grade</u>	Merck, Darmstadt
<u>Hexan, p. a.</u>	Merck, Darmstadt
<u>Millipore-Wasser</u>	Milli-Q A10 Gradient, Pack name: Q-Gard® 2; Millipore GmbH

3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der entwickelten analytischen Methoden können 64 verschiedene potentielle Extraktiv- und Migrationsstoffe identifiziert und quantifiziert werden. Ein routinemäßiger Einsatz mittels der gängigen Analysegeräte (HPLC-UV, GC-MS, HS-GC-MS) und Chemikalien ist in jedem gut ausgestatteten Labor der Qualitätssicherung möglich. Eine Ausnahme stellt hier die UPLC-UV-MS dar, welche in vielen Laboren nicht vorhanden ist.

Neben der Analyse üblicher Medien wie Wasser, Hexan und Isopropanol konnte auch eine begrenzte Anwendbarkeit der Methoden auf das untersuchte Kontrastmittel als Medium gezeigt werden. Um eine Untersuchung dieser Lösung auf Migrationsstoffe möglich zu machen, sollte eine zusätzliche Probenvorbereitung, wie die Extraktion mit Hilfe geeigneter Lösemittel, durchgeführt werden. Dies wurde anhand der GC-MS Methode (Extraktion mit Hilfe von Hexan) erfolgreich demonstriert.

4 VALIDIERUNG DER ANALYTISCHEN METHODEN ZUR BESTIMMUNG POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE

4.1 Allgemeines

Allgemein kann Validierung als Teil eines umfassenden Konzeptes zur Sicherung von Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit von Arzneistoffen und -mitteln betrachtet werden. Es handelt sich um einen dokumentierten Nachweis der Eignung für eine bestimmte Aufgabenstellung [73]. Zur Methodvalidierung in der pharmazeutischen Analytik existiert die ICH-Richtlinie Q2, auf der viele qualitätssichernde Bestimmungen und Anforderungen der arzneimittelzulassenden Behörden (z.B. EMEA und FDA) beruhen. Auf Vorgaben von Grenz- und Richtwerten wird meist verzichtet, womit die Beurteilung der Güte eines analytischen Verfahrens im Ermessen des Analytikers liegt [74].

Gemäß FDA und EMEA [23, 24] müssen analytische Methoden zur Bestimmung von Extraktivstoffen nicht validiert werden. Solche zur Bestimmung von Migrationsstoffen bedürfen jedoch einer Validierung zur Überprüfung der Eignung für den beabsichtigten Zweck [75]. Für diesen Prozess ist es notwendig, zuvor Spezifikationen und Qualitätsmerkmale genau zu definieren. Im Rahmen dieser Arbeit betrifft dies nachstehende Parameter:

- Linearität
- System- und Methodenpräzision
- Nachweisgrenze
- Bestimmungsgrenze
- Richtigkeit
- Selektivität
- Robustheit

Die in Kapitel 6 beschriebene Migrationsstudie wurde für Wasser und ein Kontrastmittel durchgeführt. Anhand ausgewählter Stoffe, die ein breites Spektrum an physikalischen und chemischen Eigenschaften bieten, sollte für diese Füllgüter gezeigt werden, dass eine Validie-

rung unter Vorgabe der entsprechenden Parameter möglich ist. Eine umfangreiche Darstellung der Validierung erfolgte anhand der wässrigen Proben. Ergebnisse zur Validierung des Kontrastmittels befinden sich im Anhang.

Im Folgenden sollen die Kenngrößen der Validierung definiert und die Anforderungen an diese beschrieben werden.

4.1.1 Linearität

Bei der Linearität eines analytischen Verfahrens handelt es sich um seine Fähigkeit innerhalb des festgelegten Arbeitsbereiches Messergebnisse zu erzielen, die der Analytkonzentration in der Probe direkt proportional sind [75, 76]. Der Arbeitsbereich einer analytischen Methode ist das Intervall zwischen oberer und unterer Analytkonzentration innerhalb dessen ein geeignetes Maß an Richtigkeit, Präzision und Linearität gewährleistet werden sollte.

Zur Bestimmung der Linearität wurden Lösungen der zu validierenden Substanzen in definierten Konzentrationen ($n \geq 5$) hergestellt und anschließend mit den entsprechenden Methoden dreifach vermessen. Die Beurteilung der Linearität erfolgte auf Grundlage des Korrelationskoeffizienten der linearen Regression, welcher größer als 0,990 sein sollte [77]. Zusätzlich wurde anhand des t-Testes nach Gleichung 3 überprüft, ob sich der y-Achsenabschnitt signifikant vom Erwartungswert Null unterscheidet (für $P = 99\%$), und dadurch eine Mehrpunktkalibrierung notwendig wird.

$$t = \frac{|\bar{x} - \text{Erwartungswert}|}{s} \sqrt{n} \quad (3)$$

\bar{x} = Mittelwert der Messwerte, s = Standardabweichung der Messwerte, n = Anzahl der Messwerte

4.1.2 Präzision

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich System- und Methodenpräzision untersucht. Auf die Überprüfung der laborinternen Vergleichspräzision wurde verzichtet, da die Durchführung der Methode durch andere Mitarbeiter oder an anderen Geräten nicht erwartet wird.

Bei der **Systempräzision** handelt es sich um ein Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden können. Hierfür wurde eine Lösung der zu validierenden Stoffe definierter Konzentration sechsfach aufeinander folgend analysiert. Über die Flächen der erhaltenen Signale wurde der Variationskoeffizient (= VK) errechnet. Von einer ausreichenden Präzision des Systems konnte gesprochen werden, wenn der VK unterhalb von 10 % lag [77]. Zudem sollte der VK des Systems nicht größer sein als der der Methode.

Über die Bestimmung der **Methodenpräzision** werden Schwankungen der Ergebnisse, verursacht während der gesamten Methode, erfasst. Hierzu zählen u. a. Wiegen, Verdünnen und Auswerten [78]. Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurden sechs Lösungen durch sechs unabhängige Einwaagen der jeweiligen Substanzen hergestellt und auf eine definierte Konzentration verdünnt. Der aus den Peakflächen ermittelte Variationskoeffizient sollte einen Wert von 15 % nicht überschreiten.

4.1.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als **Bestimmungsgrenze** (LOQ, Limit of Quantification) wird die kleinste noch quantifizierbare Menge an Analyt bezeichnet. Hierfür wurden die zu validierenden Stoffe soweit verdünnt, bis ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 erreicht war.

Die kleinste noch identifizierbare Menge an Analyt wird **Nachweisgrenze** (LOD, Limit of Detection) genannt und bei einem Signal/Rausch Verhältnis von 2:1 erhalten. [75].

Nach ICH Richtlinie Q2 ist außerdem die Bestimmung der LOQ und LOD über

- visuelle Bewertung
- die Berechnung aus der Standardabweichung des Blindwertes
- oder die Berechnung aus der Kalibrierfunktion möglich.

4.1.4 Richtigkeit

Eine analytische Methode ist dann richtig, wenn es zur Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Wert und einem als richtig angesehenen Wert kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies über die Wiederfindungsrate bestimmt. Hierfür wurde jede zu validierende Sub-

stanz mit einer definierten Konzentration zum einen allein, zum anderen in Anwesenheit der anderen Stoffe der jeweiligen Methode hergestellt und dreifach vermessen. Die erhaltenen Flächen wurden anschließend verglichen, wobei die Flächen der Stoffe, die durch die Einzelinjektion erhalten wurden, als Referenzwerte mit einer Wiederfindungsrate von 100 % angesehen wurden. Die Wiederfindungsrate der zu validierenden Stoffe in Anwesenheit der anderen sollte nicht um mehr als das Vierfache des VK der Methode vom theoretischen Wert 100 % abweichen [9]. Einen weiteren Richtwert liefert Dennis Jenke [77], nach dem eine Abweichung von 30 % vom theoretischen Wert 100 % akzeptiert werden kann.

4.1.5 Selektivität

Unter Selektivität wird die Möglichkeit einer Methode verstanden, verschiedene Verbindungen, die nebeneinander vorkommen könnten, störungsfrei zu analysieren. Für die Methoden mit UV- bzw. Flammenionisations-Detektion wurde dies mittels Vergleich der Chromatogramme einer Leerprobe und der Analysenprobe ermittelt. Das Chromatogramm der Leerprobe sollte keine störenden Signale zu den Retentionszeiten der zu untersuchenden Stoffe zeigen. Des Weiteren wurde die Auflösung R bestimmt, die sich durch der Gleichung 4 nach U. S. Pharmacopeia errechnete und den Wert $R \geq 1,5$ nicht unterschreiten sollte [90, 78].

$$R_{1,2} = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad (4)$$

$R_{1,2}$ = Auflösung der Komponenten 1 und 2, $t_{R1/2}$ = Retentionszeiten der Komponenten 1 und 2 [min], $w_{1/2}$ = Peakbreite der Komponenten 1 und 2 [min]

Hierfür wurden alle zu analysierenden Stoffe betrachtet unter besonderer Berücksichtigung der Peakpaare, deren Auflösung nach visueller Einschätzung kritisch zu bewerten war.

4.1.6 Robustheit

Die Robustheit beschreibt die Fähigkeit einer Methode, unabhängig von kleinen Änderungen relevanter Einflussparameter, stabile Ergebnisse zu liefern. Für alle Methoden wurde die Ro-

bustheit der Probenlösung nach 24 Stunden überprüft. Während für die flüssigchromatographischen Methoden zusätzlich die Robustheit der Säule überprüft wurde, ist darauf bei der Validierung der GC-Methoden verzichtet worden, da ein Wechsel der Säulen in den Anlagen nicht forciert wird, bevor dieser nicht aus Gründen der überschrittenen Lebensdauer notwendig wird. Als robust galt eine Methode dann, wenn sich die Analysenergebnisse durch Veränderungen der entsprechenden Parameter im F- und t-Test (siehe Gleichung 5 und 6) nicht signifikant unterschieden haben. Die Ergebnisse der Robustheitsüberprüfung wurden für die Methoden kurz erwähnt. Eine Auflistung der Einzelwerte befindet sich im Anhang.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (5)$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} * \sqrt{n}; \quad \bar{x}_1 > \bar{x}_2 \quad (6)$$

4.2 VALIDIERUNG DER GASCHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN FÜR DIE BESTIMMUNG FLÜCHTIGER POTENTIELLER EXTRAKTIVSTOFFE

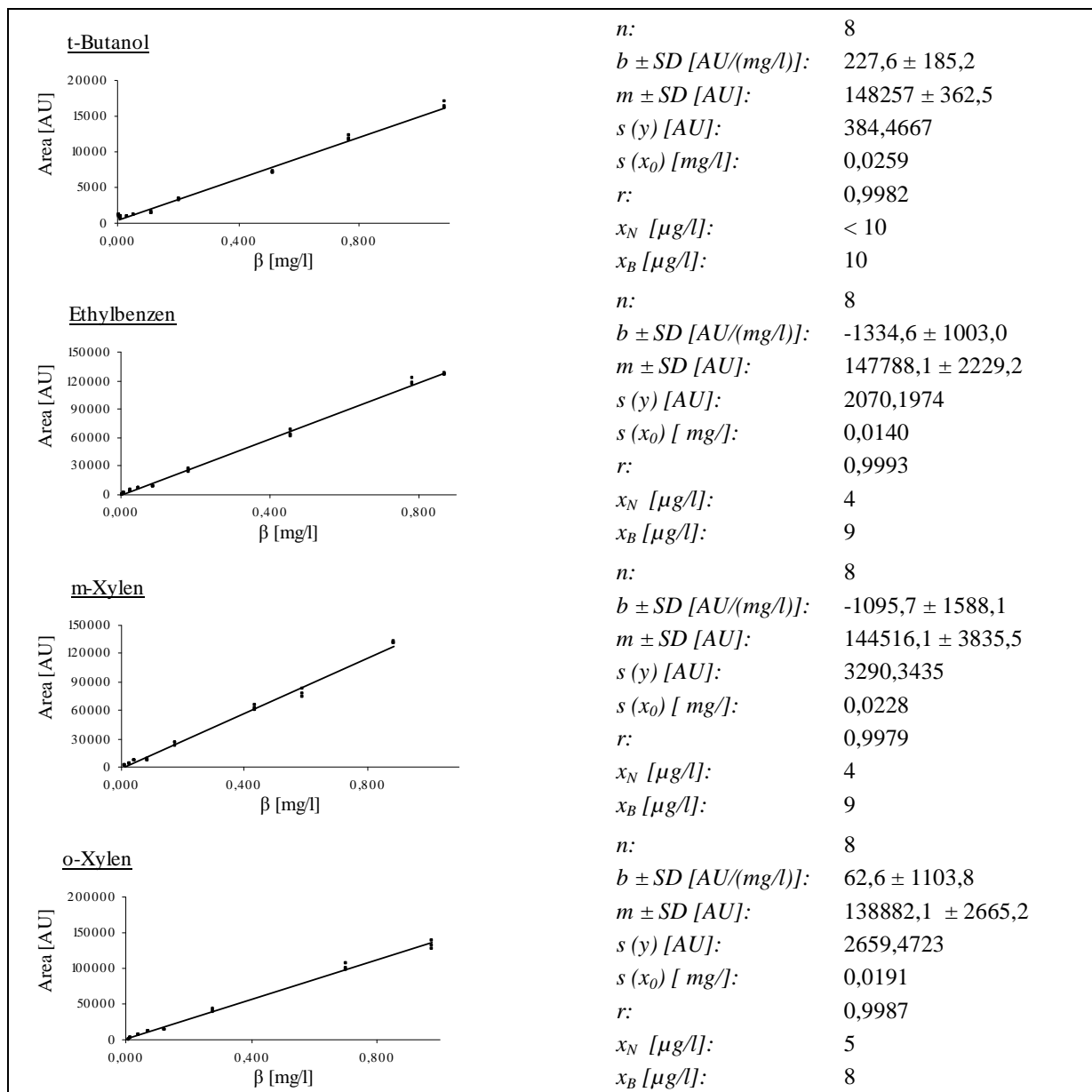
4.2.1 Validierung der HS-GC-FID Methode

4.2.1.1 Allgemeines

Von den 12 Substanzen, welche mittels der HS-GC-FID Methode bestimmt werden können, wurden t-Butanol, Ethylbenzen, m-Xylen, o-Xylen und 2-Ethyl-1-hexanol beispielhaft validiert.

4.2.1.2 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität des Kalibrationsbereiches wurden acht verschiedene Konzentrationen (6 µg/l bis 1 mg/l) der zu validierenden Substanzen analysiert (n = 3) und die Kalibriergerade durch Regression aus den Daten errechnet.



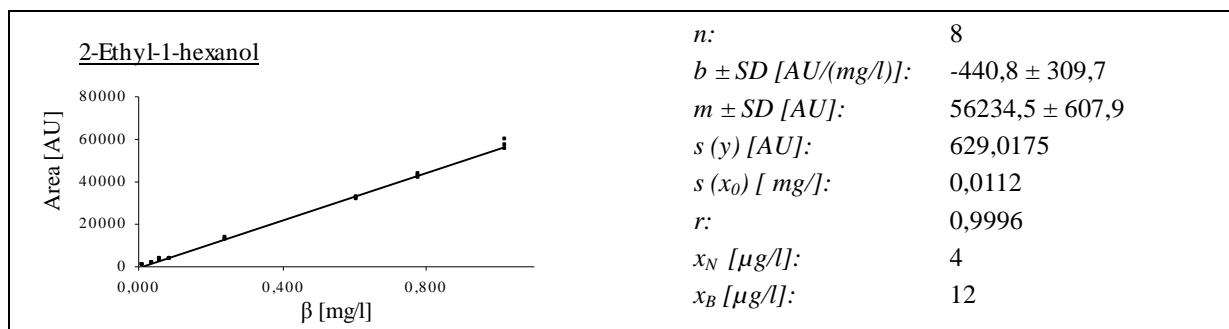


Abbildung 16 Kalibriergeraden (Wasser) von t-Butanol, Ethylbenzen, m-Xylen, o-Xylen und 2-Ethyl-1-hexanol; β = Massenkonzentration, n = Anzahl Messpunkte, b = y-Achsenabschnitt, m = Steigung, SD = Standardabweichung, $s(y)$ = Reststandardabweichung, $s(x_0)$ = Verfahrensstandardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, x_N = Nachweisgrenze, x_B = Bestimmungsgrenze

Die Kenngrößen der Linearität, die sich aus der Regression ergeben, sind in Abbildung 16 aufgeführt. Dieser Abbildung sind auch Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu entnehmen, welche sich nach Kapitel 4.1.3 bestimmen ließen. Da sich bei allen Kalibriergeraden die y-Achsenabschitte nicht signifikant vom Erwartungswert Null unterschieden, war eine Mehrpunktkalibrierung nicht erforderlich [Tabelle A - 20]. Die Konzentrationen der Kalibrierlösung sollten aber im Bereich der zu erwartenden Konzentration liegen.

4.2.1.3 Präzision

Für die Bestimmung der System- und Methodenpräzision wurden, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, Lösungen mit der Konzentration von 50 ppb hergestellt und analysiert. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 31.

Tabelle 31 Präzision HS-GC-FID mit Wasser als Medium

Parameter	Sollwert	t-Butanol	Ethylbenzen	o-Xylen	m-Xylen	2-Ethyl-1-hexanol
VK Systempräzision [%]	≤ 10	2,612	5,665	4,860	5,059	1,841
VK Methodenpräzision [%]	≤ 15	12,904	6,100	6,628	5,103	4,771

Die erhaltenen Präzisionen der einzelnen Stoffe entsprachen den festgelegten Spezifikationen.

4.2.1.4 Richtigkeit

Um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen, wurden Proben entsprechend 4.1.4 hergestellt und analysiert. Die ermittelten Wiederfindungsraten lagen zwischen 90,6 % und 103,1 %. Eine ausführliche Aufstellung der Werte befindet sich in Tabelle 32.

Tabelle 32 Daten der Richtigkeit für HS-GC-FID mit Wasser als Medium; Wdf₂₀₀ = Wiederfindungsrate bei 200 ppb, VK_{M4} = vierfacher VK der Methode

	Wdf ₂₀₀ [%]	VK _{M4}
t-Butanol	92,1	51,6
Ethylbenzen	90,6	24,4
m-Xylen	91,5	26,5
o-Xylen	103,1	20,4
2-Ethyl-1-hexanol	107,4	19,1

Die Methode entsprach sowohl nach Kromidas, als auch nach Jenke (siehe 4.1.4) den Anforderungen an die Richtigkeit.

4.2.1.5 Selektivität

Als Maß für die Selektivität wurde bei der HS-GC-FID die Bestimmung der Auflösung, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben, verwendet. Bei Betrachtung benachbarter Peaks konnte festgestellt werden, dass die Auflösung $R \geq 1,5$ ist, also den Anforderungen entspricht (siehe Tabelle 33). Eine Ausnahme stellt das Peakpaar Methylcyclohexan/3-Pentanol dar. Hier entspricht die Auflösung R nicht der Spezifikation. Bei gleichzeitigem Auftreten beider Stoffe in einer Probe sollte die Methode optimiert werden, um eine Basislinientrennung von Methylcyclohexan und 3-Pentanol zu erreichen. Beim Vergleich der Chromatogramme der Leerprobe mit denen der Analyse wurde festgestellt, dass zur Retentionszeit von t-Butanol in der Leerprobe ein Systempeak auftaucht. Aus diesem Grund wurden die Flächen beider Peaks voneinander abgezogen. Zusätzlich wurde die Anwesenheit von t-Butanol in der Analyse bei der Extraktions- und Migrationsstudie (vor der Einlagerung und nach sechs Monaten) mittels HS-GC-MS überprüft. Mit Hilfe der MS-Detektion konnte gezeigt werden, dass es sich beim

Systempeak in der Leerprobe nicht um t-Butanol handelt und eine Quantifizierung über die für t-Butanol markanten Massenfragmente möglich ist.

Tabelle 33 Auflösung R für die HS-GC-FID Methode (Wasser); tB = t-Butanol, Prop = 1-Propanol, 2But = 2-Butanol, 3MH = 3-Methylhexan, MCH = Methylcyclohexan, 3Pent = 3-Pentanol. 3Hex = 3-Hexanon, EB = Ethylbenzen, mX = m-Xylen, oX = o-Xylen, pMS = p-Methylstyren, 2-E-1-H = 2-Ethyl-1-hexanol

Peakpaare	tB/Prop	Prop/2But	2But/3MH	3MH/MCH	MCH/3Pent	3Pent/3Hex
Auflösung R	8,28	9,03	8,13	14,76	1,02	28,83

Peakpaare	3Hex/EB	EB/mX	mX/oX	oX/pMS	pMS/2-E-1-H
Auflösung R	14,68	1,63	5,62	19,31	1,23

4.2.1.6 Robustheit

Für die HS-GC-FID Methode wurde neben der Robustheit der Lösung nach 24 h auch der Einfluss der NaCl Menge auf die Analysenergebnisse nach den Vorgaben in Kapitel 4.1.6 untersucht. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 17 zu sehen. Die vollständige Darstellung der Ergebnisse befindet sich im in Tabelle A - 1, Tabelle A - 2 und Tabelle A - 3 des Anhangs.

Robustheit der Lösung nach 24 h

Hierfür wurde die Analysenlösung mit einer Konzentration von 200 ppb hergestellt und fünf-fach vermessen. Dies wurde 24 h später mit der gleichen Probe, welche sich bereits in Vials abgefüllt in der Anlage befand, wiederholt. Entsprechend der Vorgaben gilt die Robustheit der Lösung nach 24 h als bewiesen.

Einfluss der NaCl-Zugabe auf die Analysenergebnisse

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Ungenauigkeit der NaCl Einwaage auf die Messergebnisse hat, wurden zum einen 4,5 g und zum anderen 3,5 g NaCl eingewogen und mit der Referenzprobe 4,0 g NaCl verglichen. Jede Lösung wurde fünffach vermessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels F- und t-Test. Es konnte zwischen den Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, also gilt die Methode hinsichtlich der NaCl Einwaage im Bereich von 3,5 – 4,5 g NaCl als robust.

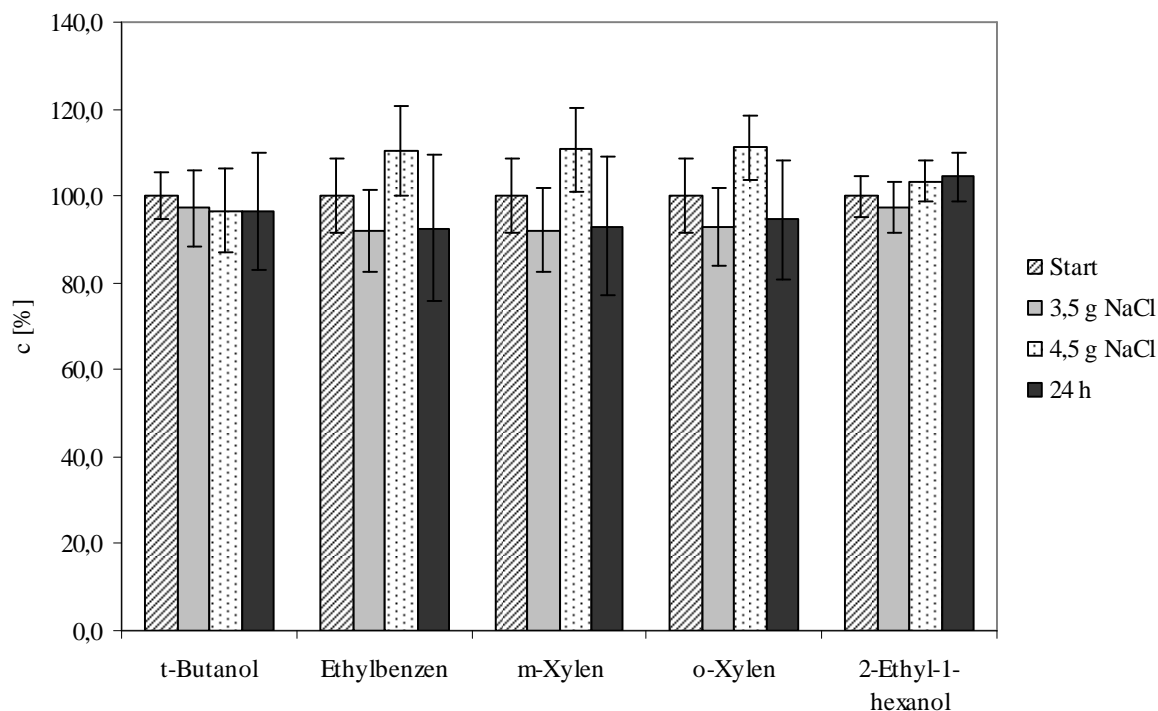


Abbildung 17 Robustheit der HS-GC-FID Methode, n = 5

4.2.1.7 Validierungsergebnisse des Kontrastmittels

In einem Konzentrationsbereich von der jeweiligen Bestimmungsgrenze der Stoffe bis 1 ppm bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration der Analyten im Untersuchungsmedium und deren resultierenden Peakflächen mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,9961 und 0,9991. Da sich bei allen Kalibriergeraden die y-Achsenabschnitte nicht signifikant vom Erwartungswert Null unterschieden, war eine Mehrpunktkalibrierung nicht erforderlich. Die Nachweisgrenze der Stoffe betrug 5 bis 32 $\mu\text{g}/\text{l}$, während sich die Bestimmungsgrenze von 8 – 113 $\mu\text{g}/\text{l}$ bewegte. Mit Variationskoeffizienten von 2,71 % bis 8,70 % des Systems und 6,25 % bis 8,86 % der Methode lieferte die Analyse gemäß der Spezifikation präzise Ergebnisse. Dass die Ergebnisse der Methode als richtig bezeichnet werden können, belegen die Wiederfindungsraten, welche sich zwischen 92,8 % und 101,6 % bewegten. Durch Bestimmung der Auflösung wurde für 10 Peakpaare die Selektivität der Methode bewiesen. Für Methylcyclohexan/3-Pentanol betrug die Auflösung R 1,18 und lag damit unterhalb der Spezifi-

kation. Beim gleichzeitigen Vorkommen beider Stoffe in einer Probe muss die Methode für eine Basislinientrennung optimiert werden. Die Robustheit der Lösung nach 24 Stunden konnte bewiesen werden. Ebenso zeigte eine Änderung der NaCl-Einwaage zwischen 3,5 g und 4,5 g keinen Einfluss auf die Analysenergebnisse. Eine ausführliche Auflistung aller Validierungsparameter befindet sich im Anhang (Tabelle A - 4 bis Tabelle A - 9, Tabelle A - 24, Abbildung A - 1).

4.2.2 Validierung der GC-MS Methode

4.2.2.1 Allgemeines

Die exemplarische Validierung der Methode wurde an folgenden Substanzen durchgeführt:

- OMCTS
- BHT
- B-BHA
- DEHP

4.2.2.2 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität des Kalibrationsbereiches wurden acht bis elf verschiedene Konzentrationen (1 µg/l bis 1,5 mg/l) der zu validierenden Substanzen vermessen ($n = 3$) und die Kalibriergerade durch Regression aus den Daten errechnet.

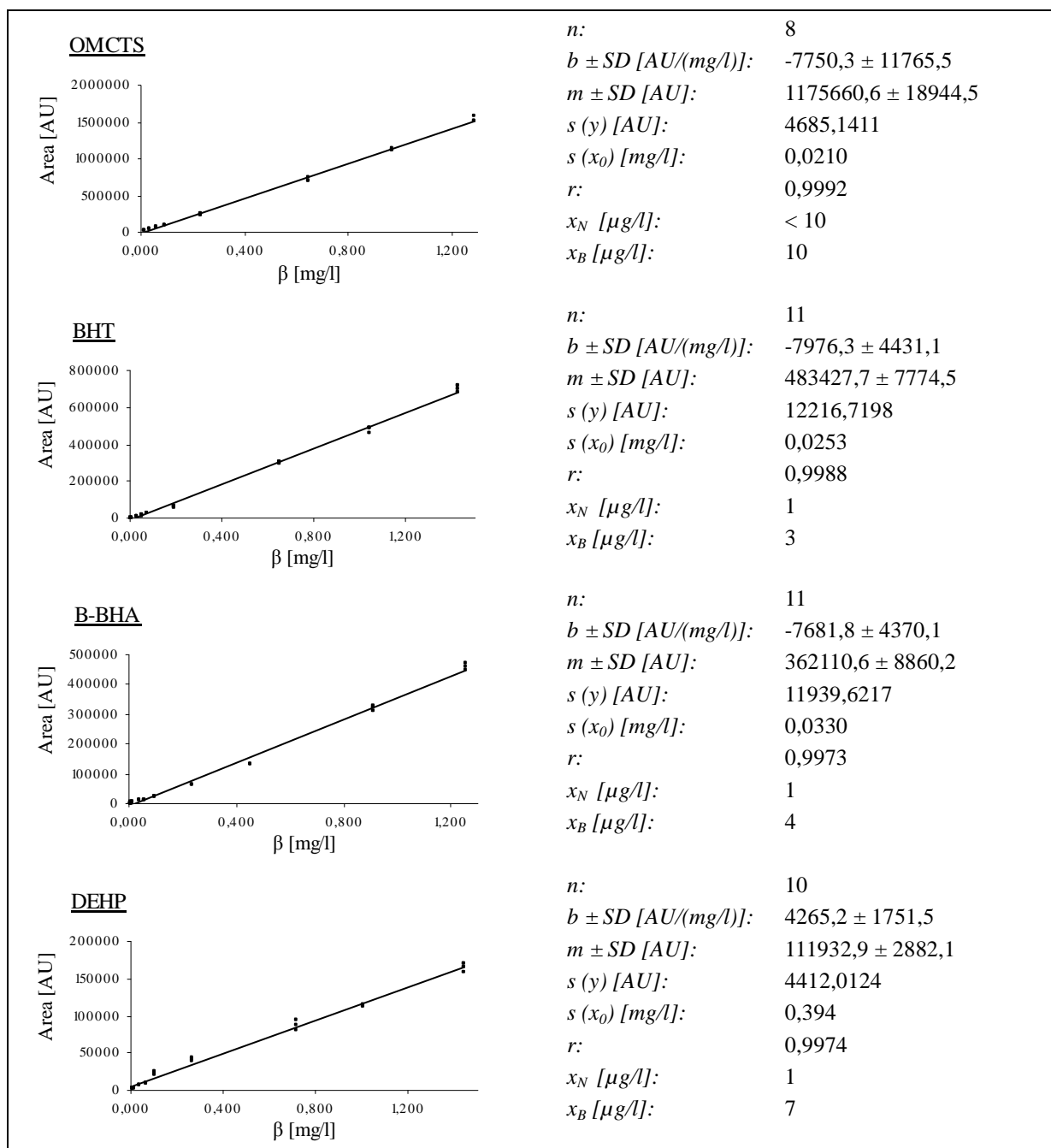


Abbildung 18 Kalibriergeraden (Wasser) für OMCTS, BHT, B-BHA und DEHP; β = Massenkonzentration n = Anzahl Messpunkte, b = y-Achsenabschnitt, m = Steigung, SD = Standardabweichung, $s(y)$ = Reststandardabweichung, $s(x_0)$ = Verfahrensstandardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, x_N = Nachweisgrenze, x_B = Bestimmungsgrenze

Die sich aus der Regression ergebenden Kenngrößen sind der Abbildung 18 zu entnehmen. Dort sind auch Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aufgeführt, welche sich aus der Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses ergaben. Da sich bei der Kalibriergeraden von OMCTS der y-Achsenabschnitt signifikant vom Erwartungswert Null unterschied, war eine

Mehrpunktkalibrierung erforderlich. Die y-Achsenabschnitte von BHT, B-BHA und DEHP waren nicht signifikant verschieden vom Erwartungswert Null, weshalb eine Mehrpunktkalibrierung nicht notwendig war [Tabelle A - 21]. Die Konzentrationen der Kalibrierlösung sollten aber im Bereich der zu erwartenden Konzentration liegen.

4.2.2.3 Präzision

Für die Bestimmung der System- und Methodenpräzision sind Lösungen auf einem Konzentrationsniveau von 100 µg/l nach Kapitel 4.1.2 hergestellt worden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 34 aufgelistet. Bezug nehmend auf die zuvor festgelegte Spezifikation kann die Methode hinsichtlich Methode und System als präzise bezeichnet werden.

Tabelle 34 Präzision der DIR-GC Methode mit Wasser als Medium

Parameter	Sollwert	OMCTS	BHT	B-BHA	DEHP
VK Systempräzision [%]	≤ 10	3,84	3,72	2,34	6,00
VK Methodenpräzision [%]	≤ 15	8,52	7,94	9,44	10,15

4.2.2.4 Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden Lösungen entsprechend des Kapitels 4.1.4 mit einer Konzentration von 200 µg/l hergestellt und vermessen. Die Wiederfindungsraten bewegen sich zwischen 97,6 und 110,7 % (siehe Tabelle 35). Somit entspricht diese Methode sowohl nach Kromidas als auch nach Jenke den Anforderungen an die Richtigkeit.

Tabelle 35 Daten der Richtigkeit für GC-MS mit Wasser als Medium; Wdf₂₀₀ = Wiederfindungsrate bei 200 ppb, VK_{M4} = vierfacher VK der Methode

	Wdf ₂₀₀ [%]	VK _{M4} [%]
OMCTS	106,7	34,1
BHT	110,7	31,8
B-BHA	103,7	37,8
DEHP	97,6	40,6

4.2.2.5 Selektivität

Beim Vergleich der Chromatogramme von Leerprobe und Probe konnte gezeigt werden, dass die Analyse durch das verwendete Lösemittel nicht gestört wird. Die Bestimmung der Auflösung nach Kapitel 4.1.5, unter besonderer Berücksichtigung der visuell als kritisch zu beurteilenden Peakpaare ergab für jedes Peakpaar eine Auflösung $R \geq 1,5$. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 36, wobei die kritischen Peakpaare fett gedruckt sind.

Tabelle 36 Auflösung R für die GC-MS Methode (Wasser): Dec = Decan, 1Non = 1-Nonanol, Dode = Dodecan, Dihex = Dihexylether, Tetrad = Tetradecan, tAP = t-Amylphenol, Hexad = Hexadecan, tOP = t-Octylphenol, Octa = Octadecan, Eico = Eicosan, Doco = Docosan, Hexac = Hexacosan

Peakpaare	HMCTS/OMCTS	OMCTS/Dec	Dec/DMCPS	DMCPS/1Non	1Non/Dode
Auflösung R	16,12	3,78	17,45	11,47	6,00
Peakpaare	Dode/Dihex	Dihex/Tetrad	Tetrad/tAP	tAP/BHT	BHT/Hexad
Auflösung R	9,52	16,86	8,50	7,50	9,08
Peakpaare	Hexad/tOP	tOP/B-BHA	B-BHA/Octa	Octa/Eico	Eico/DBP
Auflösung R	2,00	2,54	15,39	16,75	1,76
Peakpaare	DBP/Doco	Doco/MTBC	MTBC/DEHP	DEHP/Hexac	
Auflösung R	12,96	16,67	10,59	4,44	

4.2.2.6 Robustheit

Die Robustheit der Lösung nach 24 Stunden wurde überprüft. Hierfür wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 100 µg/l fünffach vermessen. Dies wurde 24 Stunden später wiederholt, wobei es sich um die gleiche Lösung handelte, die bereits in Vials abgefüllt im Autosampler der Anlage stand. F- und t-Test konnten zeigen, dass zwischen beiden Injektionszeitpunkten kein signifikanter Unterschied bestand, die Lösung nach 24 Stunden somit stabil ist. Eine umfangreiche Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang (Tabelle A - 10).

4.2.2.7 Validierungsergebnisse des Kontrastmittels

Da in Kapitel 3.2.3.1 gezeigt werden konnte, dass das Ausschütteln des Kontrastmittels mit Hexan Wiederfindungsraten entsprechend den Vorgaben lieferte, wurden die Stoffe für die Validierung in Hexan gelöst und analysiert. Der Einfluss der Matrix hinsichtlich Richtigkeit der Ergebnisse ist somit bereits bestätigt worden. Die Referenzen für die externe Kalibrierung während der Migrationsstudie wurden in Hexan gelöst, wobei die bestimmte Wiederfindungsrate bei der Berechnung der Konzentration der migrierten Stoffe im Rahmen der Studie berücksichtigt wurde.

Bei der Prüfung auf Linearität wurde der Konzentrationsbereich von der Bestimmungsgrenze der Stoffe bis 1 mg/l gewählt. Innerhalb dieser Grenzen konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentrationen der Analyten proportional zu ihren Peakflächen verhalten. Da sich bei allen Kalibriergeraden die y-Achsenabschitte nicht signifikant vom Erwartungswert Null unterschieden, war eine Mehrpunktkalibrierung nicht erforderlich. Die Bestimmungsgrenzen liegen zwischen 1 und 7 µg/l, die Nachweisgrenzen zwischen 1 und 3 µg/l. Die Variationskoeffizienten des Systems bewegen sich zwischen 0,69 % und 6,41 %, die der Methode zwischen 2,76 % und 8,30 %. Somit kann im Sinne von Kapitel 4.1.2 von einer präzisen Methode gesprochen werden. Die Robustheit der Lösung nach 24 Stunden wurde bestätigt. Bei der Bestimmung der Auflösung der kritischen Peakpaare zeigte sich für Tetradecan/t-Amylphenol eine Auflösung von $R = 1,08$. Dies entspricht nicht den Anforderungen nach Kapitel 4.1.5. Bei gleichzeitigem Vorkommen beider Stoffe in einer Probe sollte die Methode für eine Basislinientrennung optimiert werden. Eine ausführliche Auflistung der Ergebnisse für das Kontrastmittel ist im Anhang (Tabelle A - 10 bis Tabelle A - 13, Tabelle A - 25, Abbildung A - 2) zu sehen.

4.3 VALIDIERUNG DER FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN

4.3.1 Validierung der HPLC-UV Methode für die Bestimmung nicht flüchtiger Extraktivstoffe

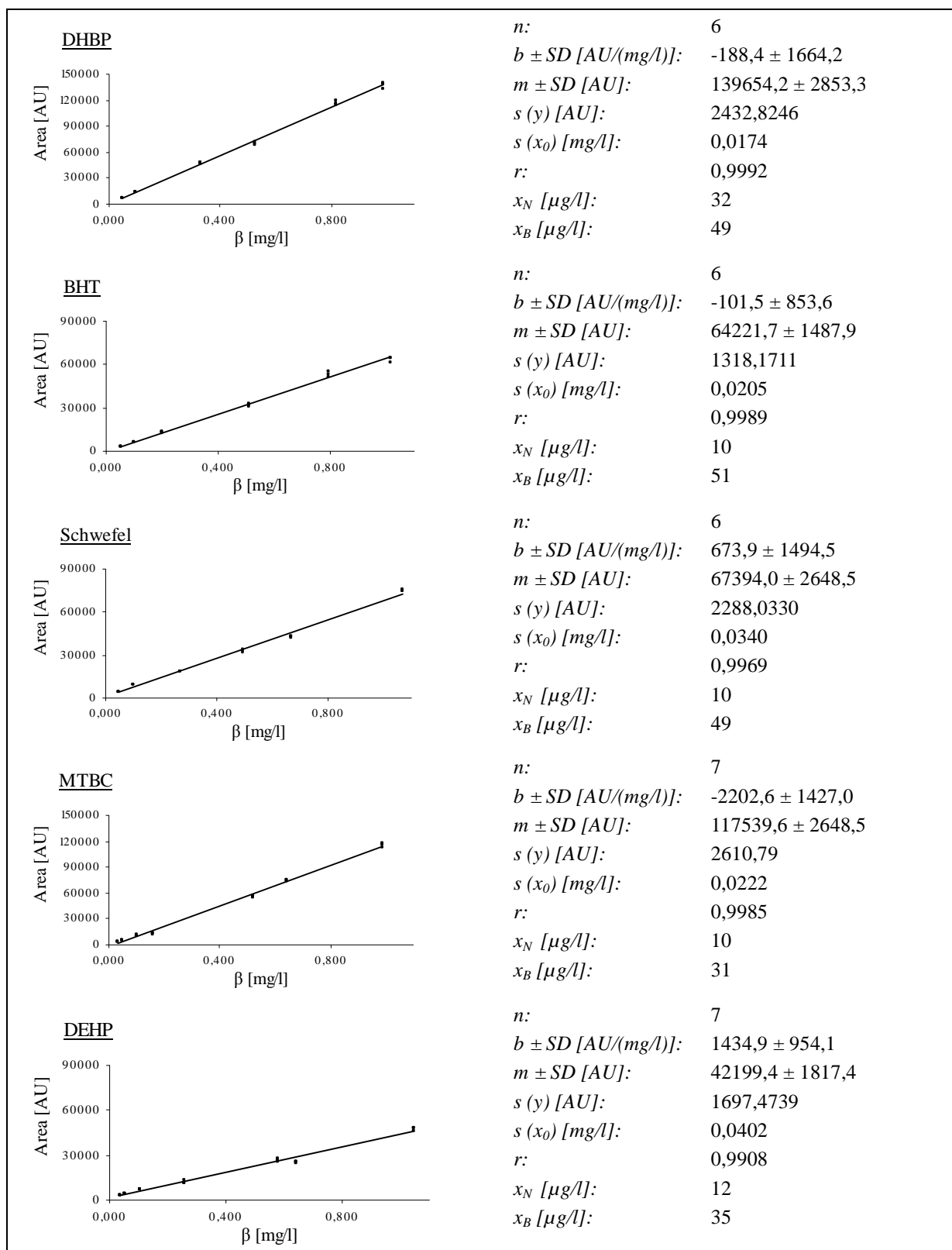
Für die Validierung der HPLC-UV Methode wurden folgende Stoffe berücksichtigt:

- DHBP
- BHT
- Schwefel
- MTBC
- DEHP
- Irganox 1010

Zudem wurde Irgafos 168 über sein Oxidationsprodukt Irgafos 168 oxid validiert. Da dies später nur in organischen Extrakten gefunden werden konnte, wurde diese Substanz in Isopropanol gelöst validiert.

4.3.1.1 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität des Kalibrationsbereiches wurden sieben verschiedene Konzentrationen (11 µg/l bis 1,3 mg/l) der zu validierenden Substanzen vermessen (n = 3) und die Kalibriergerade durch Regression aus den Daten errechnet.



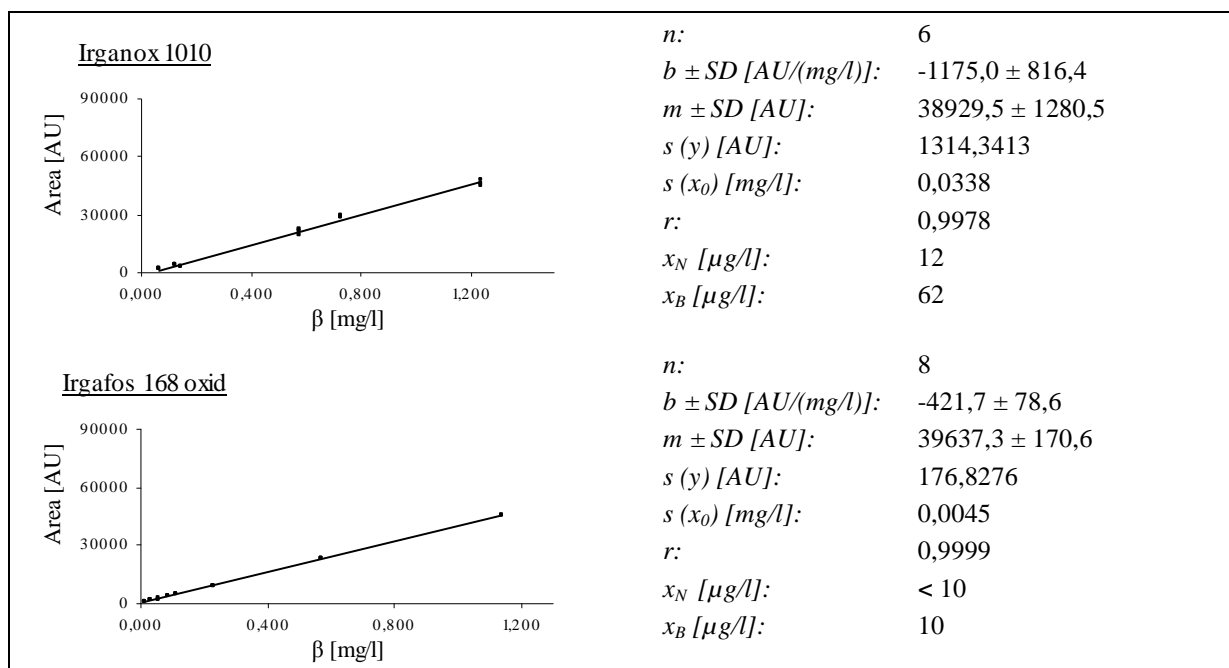


Abbildung 19 Kalibriergeraden (Wasser) für DHBP, BHT, Schwefel, MTBC, DEHP, Irganox 1010 und Irgafos 168; β = Massenkonzentration, n = Anzahl Messpunkte, b = y-Achsenabschnitt, m = Steigung, SD = Standardabweichung, $s(y)$ = Reststandardabweichung, $s(x_0)$ = Verfahrensstandardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, x_N = Nachweisgrenze, x_B = Bestimmungsgrenze

Die sich aus der Regression ergebenden Kenngrößen der Validierung befinden sich in Abbildung 19. Da sich bei der Kalibriergeraden von Irgafos 168 oxid der y-Achsenabschnitt signifikant vom Erwartungswert Null unterschied, war eine Mehrpunktkalibrierung erforderlich. Die y-Achsenabschnitte von DHBP, BHT, Schwefel, MTBC, DEHP und Irganox 1010 waren nicht signifikant verschieden vom Erwartungswert Null, weshalb eine Mehrpunktkalibrierung nicht notwendig war [Tabelle A - 22]. Die Konzentrationen der Kalibrierlösung sollten aber im Bereich der zu erwartenden Konzentration liegen.

4.3.1.2 Präzision

Für die Überprüfung der System- und Methodenpräzision wurden Lösungen mit einer Konzentration von 100 µg/l entsprechend Kapitel 4.1.2 vermessen. Die Ergebnisse sind Tabelle 37 zu entnehmen. Sie entsprechen den Anforderungen, da die VKs 10 % bzw. 15 % nicht überschreiten.

Tabelle 37 Präzision HPLC mit Wasser als Medium

Parameter	Sollwert	DHBP	BHT	Schwefel	MTBC	DEHP	Irganox 1010	Irgafos 168 oxid
VK Systempräzision [%]	≤ 10	3,16	3,60	6,19	3,70	2,85	3,67	3,22
VK Methodenpräzision [%]	≤ 15	4,99	6,99	7,00	5,58	5,82	5,69	7,42

4.3.1.3 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit sind Lösungen nach Kapitel 4.1.4 mit einer Konzentration von 500 µg/l hergestellt worden. Die Wiederfindungsraten befanden sich zwischen 97,0 und 111,2 % (siehe Tabelle 38). Demnach konnten die Ergebnisse der Methode entsprechend der Anforderung nach Kromidas und Jenke als richtig bezeichnet werden.

Tabelle 38 Daten der Richtigkeit für HPLC-UV mit Wasser als Medium; Wdf₅₀₀ = Wiederfindungsrate bei 500 ppb, VK_{M4} = vierfacher VK der Methode

	Wdf ₅₀₀ [%]	VK _{M4} [%]
DHBP	100,3	21,3
BHT	101,3	18,8
Schwefel	104,6	12,6
MTBC	101,3	19,4
DEHP	97,0	13,9
Irganox 1010	111,2	16,1
Irgafos 168 oxid	99,4	29,7

4.3.1.4 Selektivität

Beim Vergleich der Chromatogramme der Leerprobe und der Analytlösung konnte sowohl für die sechs Stoffe, gelöst in Wasser/Isopropanol, als auch für Irgafos 168 oxid, gelöst in Isopropanol, gezeigt werden, dass es nicht zur Störung der Signale in der Probe durch Systempeaks kommt. Die Auflösung R der kritischen Peakpaare (Bisphenol/DHBP, Tinuvin P/DTBP, Schwefel/MTBC, Topanol/Chimasorb, Irganox 1010/Irganox 1330, Irganox 1330/Irganox 565 und Irganox 565/Irgafos 168 oxid) ist in Tabelle 39 aufgeführt. In allen Fäl-

len ist $R \geq 1,5$, was den Anforderungen entspricht. Eine vollständige Auflistung der Ergebnisse befindet sich im Anhang (Tabelle A - 14).

Tabelle 39 Auflösung R für die HPLC-UV Methode (Wasser); Tin P = Tinuvin P, S = Schwefel, Top = Topanol, Chim = Chimasorb, Irg 1010 = Irganox 1010, Irg 1330 = Irganox 1330, Irg 565 = Irganox 565, Irg168ox = Irgafos 168 oxid

Peakpaare	BPA/DHBP	TinP/DTBP	S/MTBC	Top/Chim
Auflösung R	1,82	1,68	1,64	1,71

Peakpaare	Irg1010/Irg 1330	Irg 1330/Irg 565	Irg 565/Irg168ox
Auflösung R	2,47	2,08	2,94

4.3.1.5 Robustheit

Die Analysenlösung kann nach 24 Stunden als robust bezeichnet werden, da sich Startwerte ($n = 5$) und Messwerte nach 24 Stunden ($n = 5$) laut F- und t-Test nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die vollständigen Ergebnisse sind dem Anhang (Tabelle A - 15) zu entnehmen.

Zusätzlich wurde anhand zweier verschiedener Säulenchargen überprüft, ob eine Trennung aller 26 Substanzen unabhängig vom Herstellungsansatz des Säulenmaterials gegeben ist. Dies konnte durch den visuellen Vergleich beider Chromatogramme bestätigt werden.

4.3.1.6 Validierungsergebnisse des Kontrastmittels

Aufgrund der Tatsache, dass eine Analyse der ersten sechs eluierenden Stoffe (Phenol, Bisphenol A, DHBP, DHMBP, DHDMP und Eusolex) mit dieser HPLC-UV Methode nicht möglich ist, konnte DHBP nicht validiert werden. Es wurden somit BHT, Schwefel, MTBC, DEHP und Irganox 1010 überprüft.

Die Untersuchung der Linearität im Bereich von der Bestimmungsgrenze der Stoffe bis 1 mg/l ergab einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakflächen. Da sich bei den Kalibriergeraden von BHT, Schwefel und DEHP die y-Achsenabschnitte signifikant vom Erwartungswert Null unterschieden, war eine Mehrpunktkalibrierung erforderlich.

Die y-Achsenabschitte der Kalibriergeraden von MTBC und Irganox 1010 waren nicht signifikant vom Erwartungswert Null verschieden, was eine Mehrpunktkalibrierung nicht notwendig machte. Die Bestimmungsgrenze variiert zwischen 47 µg/l und 186 µg/l, die Nachweisgrenzen zwischen 28 µg/l und 54 µg/l. Für die Systempräzision konnten VKs zwischen 2,35 und 5,03 % bestimmt werden, für die Methodenpräzision 5,77 % bis 8,38 %. Diese Ergebnisse entsprechen den Forderungen nach Kapitel 4.1.2. 16 der 20 Peakpaare hatten eine Auflösung von $R \geq 1,5$. Beim gleichzeitigen Vorkommen von Tinuvin P und DTBP, Schwefel und MTBC, Topanol und Chimasorb sowie Irganox 565 und Irgafos 168 ist eine Optimierung der Auflösung notwendig, da für diese Nachbarpeaks $R < 1,5$ ist. Die Richtigkeit wurde durch Wiederfindungsraten zwischen 97,7 % und 111,3 % bestätigt. Die verwendete Lösung ist auch nach 24 Stunden robust. Ausführliche Daten befinden sich im Anhang (Tabelle A - 16 bis Tabelle A - 19, Tabelle A - 26, Abbildung A - 3).

4.3.2 Validierung der UPLC-UV-MS Methode

4.3.2.1 Allgemeines

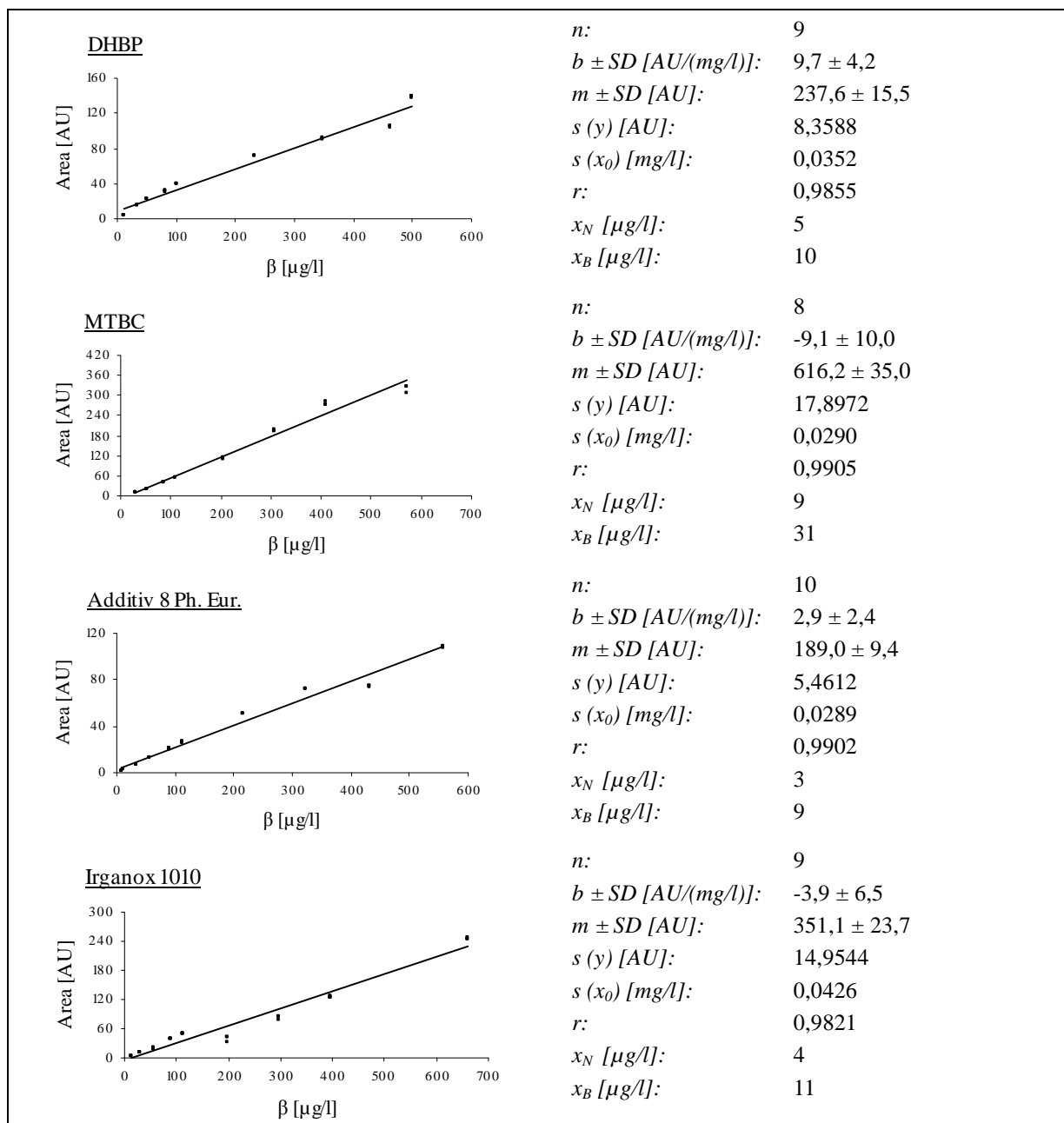
Die Validierung der UPLC-UV-Methode erfolgte im Rahmen der Methodenentwicklung mit Isopropanol als Lösemittel. Tabelle 40 ist zu entnehmen, welche Stoffe über welches Detektionsverfahren validiert worden sind. Im Rahmen der Extraktions- und Migrationsstudie ist stichprobenartig die Linearität des Kalibrationsbereiches für das Lösemittel Wasser:Isopropanol /1:1) überprüft worden.

Tabelle 40 Substanzen, für die eine Validierung der UPLC-UV-MS Methode erfolgte, sortiert nach Detektionsverfahren

UV-Detektion	APCI-MS Positiv Modus	APCI-MS Negativ Modus
Tinuvin P ($\lambda = 212$ nm)	Irganox 1010	DHBP
Schwefel ($\lambda = 222$ nm)		Additiv 8 Ph. Eur. MTBC

4.3.2.2 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität des Kalibrationsbereiches wurden sieben bis zehn (3 µg/l bis 660 µg/l) verschiedene Konzentrationen der zu validierenden Substanzen vermessen (n = 3) und die Kalibriergerade durch Regression aus den Daten errechnet.



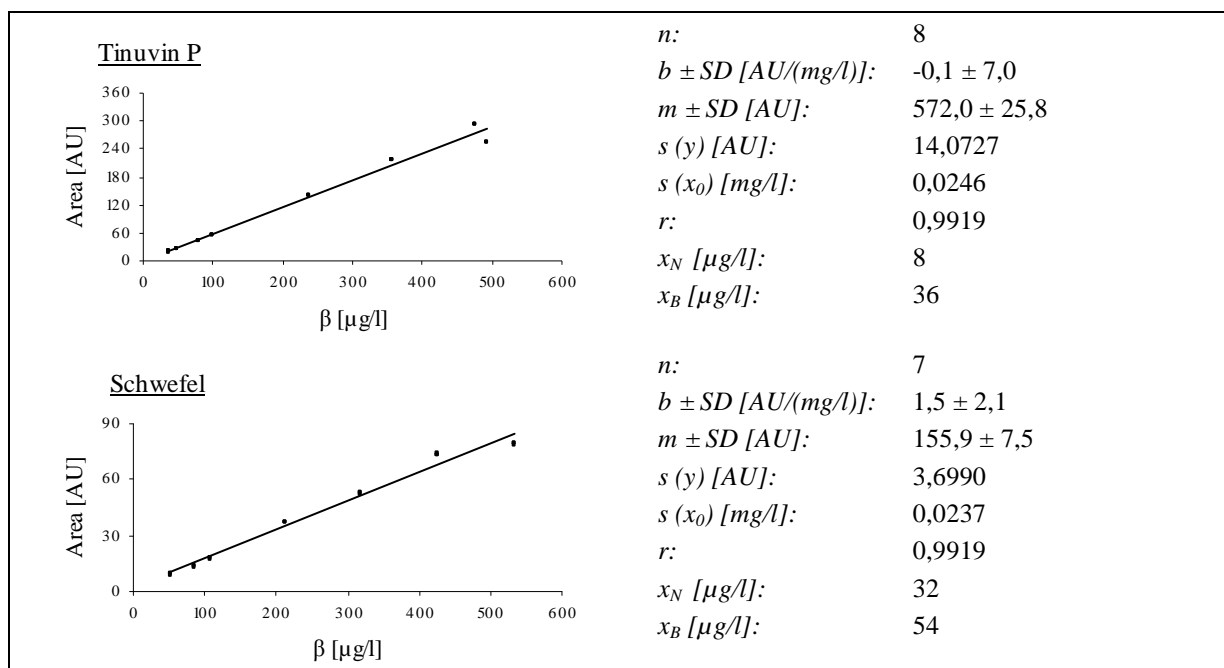


Abbildung 20 Kalibriergeraden (Isopropanol) für DHBP, MTBC, Additiv 8 Ph. Eur., Irganox 1010, Tinuvin P und Schwefel; β = Massenkonzentration, n = Anzahl Messpunkte, b = y-Achsenabschnitt, m = Steigung, SD = Standardabweichung, $s(y)$ = Reststandardabweichung, $s(x_0)$ = Verfahrensstandardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, x_N = Nachweisgrenze, x_B = Bestimmungsgrenze

Die Kenngrößen, die sich aus der Regression ergaben, befinden sich in Abbildung 20. Außerdem sind dieser Bestimmungs- und Nachweisgrenzen der einzelnen Stoffe zu entnehmen. Da sich bei der Kalibriergeraden von DHBP der y-Achsenabschnitt signifikant vom Erwartungswert Null unterschied, war eine Mehrpunktkalibrierung erforderlich. Die y-Achsenabschnitte von MTBC, Additiv 8 Ph. Eur., Irganox 1010, Tinuvin P und Schwefel waren nicht signifikant verschieden vom Erwartungswert Null, weshalb eine Mehrpunktkalibrierung nicht notwendig war [Tabelle A - 23]. Die Konzentrationen der Kalibrierlösung sollten aber im Bereich der zu erwartenden Konzentration liegen.

4.3.2.3 Präzision

Für die Überprüfung der System- und Methodenpräzision wurden Lösungen mit einer Konzentration von 100 µg/l entsprechend Kapitel 4.1.2 vermessen. Die Ergebnisse sind Tabelle 41 zu entnehmen. Sie entsprechen den Anforderungen, da die VKs kleiner als 10 % bzw. 15 % sind.

Tabelle 41 Präzision UPLC Methode mit Isopropanol als Medium

Parameter	Sollwert	Schwefel	DHBP	Add. 8 Ph. Eur.
VK Systempräzision [%]	≤10	2,62	1,36	2,68
VK Methodenpräzision [%]	≤15	4,56	4,38	5,77

Parameter	Sollwert	Tinuvin P	MTBC	Irganox 1010
VK Systempräzision [%]	≤10	0,85	2,21	4,34
VK Methodenpräzision [%]	≤15	2,02	12,68	7,76

4.3.2.4 Richtigkeit und Selektivität

Im Rahmen der Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden Proben in einer Konzentration von 500 µg/l gemäß Kapitel 4.1.4 hergestellt. Berücksichtigt wurden coeluiierende Stoffe, um zu überprüfen, ob deren gleichzeitige Ionisation die Richtigkeit der Ergebnisse beeinflusst. Dabei handelt es sich um folgende Peakpaare:

- MTBC und Additiv 8 Ph. Eur.
- Additiv 3 Ph. Eur. und Irgafos 168
- B-BHA und DTBP
- Chimasorb 81 und Tinuvin 329
- DEHP, Additiv 19 Ph. Eur. und Additiv 21 Ph. Eur.
- Additiv 13 Ph. Eur. und Tinuvin 327
- DHDMBP und DTBHB

Tabelle 42 Daten der Richtigkeit für UPLC-UV-MS mit Isopropanol als Medium; Wdf₅₀₀ = Wiederfindungsrate bei 500 µg/l

	Wdf ₅₀₀ [%]
MTBC	97,8
Additiv 8 Ph. Eur.	99,8
Additiv 3 Ph. Eur.	99,9
Irgafos 168	97,0
B-BHA	101,4

	Wdf ₅₀₀ [%]
DTBP	100,6
Chimasorb 81	98,5
Tinuvin 329	96,6
DEHP	101,0
Additiv 19 Ph. Eur	102,2
Additiv 21 Ph. Eur	92,5
Additiv 13 Ph. Eur	85,0
Tinuvin 327	98,8
DHDMBP	101,0
DTBHB	112,7

Da nicht jeder der aufgeführten Stoffe vollständig validiert worden ist, existiert nicht in jedem Fall der vierfache VK der Methode. Aus diesem Grund wurde die Richtigkeit ausschließlich nach Jenke bestimmt. Da sich die Wiederfindungsraten laut Tabelle 42 zwischen 85,0 % und 112,7 % bewegen, entsprechen die Ergebnisse den Anforderungen nach Kapitel 4.1.4.

Durch diese Überprüfung wurde zusätzlich gezeigt, dass die Methode für die gewählten Stoffe selektiv ist. Trotz Coelution können die Analyten aufgrund ihres charakteristischen Massenspektrums störungsfrei bestimmt werden.

4.3.2.5 Robustheit

Die Analysenlösung kann auch nach 24 Stunden als robust bezeichnet werden, da sich Startwerte ($n = 5$) und Messwerte nach 24 Stunden ($n = 5$) nach F- und t-Test nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Zusätzlich wurde anhand zweier verschiedener Säulenchargen überprüft, ob die Analyse der 35 Substanzen unabhängig vom Herstellungsansatz des Säulenmaterials möglich ist. Dies konnte anhand eines visuellen Vergleichs der Chromatogramme zweier unterschiedlicher Säulenchargen belegt werden.

4.4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Validierung der analytischen Methoden erfolgte anhand ausgewählter Stoffe, die ein breites Spektrum an chemischen und physikalischen Eigenschaften besitzen. Dabei wurden die Kriterien der Spezifikation für alle Methoden erfüllt, mit Ausnahme der Selektivitätsüberprüfung. Für *Methylcyclohexan/3-Pentanol* und das Peakpaar *Tetradecan/t-Amylphenol*, gelöst in Hexan ist die Auflösung $R < 1,5$. Bei gleichzeitigem Vorkommen dieser Stoffe in einer Probe sollte die Methode bezüglich der Basislinientrennung optimiert werden.

Es ist möglich, alle nicht genotoxischen Substanzen bis zu einer Konzentration von 33 $\mu\text{g/l}$ zu identifizieren. Eine Quantifizierung in diesem Konzentrationsbereich ist allerdings nicht für jede Substanz möglich. Für *Schwefel* und *Tinuvin P* wurden Bestimmungsgrenzen von 36 und 54 $\mu\text{g/l}$ erreicht. Ergibt sich im Rahmen der Extraktionsstudien der Verdacht, dass die Stoffe später als Migrationsstoffe auch im Arzneimittel zu finden sein könnten, sollte die Methode entsprechend angepasst werden um die erforderliche Bestimmungsgrenze von 33 $\mu\text{g/l}$ zu erhalten. Für die Substanzen, bei denen ein genotoxisches Potential nicht ausgeschlossen werden kann, wurde eine Bestimmungsgrenze von 10 $\mu\text{g/l}$ angestrebt. Diese wurde für *Ethylbenzen*, *o-Xylen*, *m-Xylen* und *DEHP* mittels gaschromatographischer Analyse erreicht. *2-Ethyl-1-hexanol* kann nur bis zu einer Konzentration von 12 $\mu\text{g/l}$ quantifiziert werden, wobei eine Identifizierung bis 4 $\mu\text{g/l}$ möglich ist. Bei Verdacht auf 2-Ethyl-1-hexanol als Migrationsstoff muss die Methode entsprechend angepasst werden.

5 EXTRAKTIONSTUDIE

5.1 ALLGEMEINES

Im Rahmen der Extraktions- und Migrationsstudien wurden unterschiedliche Kunststoffe untersucht (siehe Tabelle 43).

Tabelle 43 Untersuchte Kunststoffe und ihre relevanten Daten; S_m = massenspezifische Oberfläche, A_o = Oberfläche

Thermoplaste	Form	S_m [m²/g]	A_o [cm²]
Polyethylen; 3 Chargen (PE)			
<i>PE 1</i>	Granulat	0,19	
<i>PE 2</i>	Granulat	0,22	
<i>PE 3</i>	Granulat	0,66	
Polycarbonat (PC)	Granulat	0,45	
Polypropylen (PP)	Luerdeckel		35,76
Cycloolefinpolymer; 2 Chargen (COP)			
<i>COP A</i>	Granulat	0,38	
<i>COP B</i>	Granulat	0,25	
Cycloolefincopolymer (COC)	Granulat	0,37	
Elastomere	Form	S_m [m²/g]	A_o [cm²]
Chlorierter Butylkautschuk A, silikonisiert	Dichtungsring		21,71
Chlorierter Butylkautschuk B, silikonisiert	Verschlusskappe		4,90
Chlorierter Butylkautschuk C	Kolbenstopfen		37,10
Chlorierter Butylkautschuk D	Stopfen		10,21
Bromierter Butylkautschuk E	Kolbenstopfen		28,38
Bromierter Butylkautschuk F	Stopfen		10,21
Bromierter Butylkautschuk gecoatet F _c	Stopfen		3,98
Polyisoprenkautschuk G	Verschlusskappe		15,74

Während Polypropylen nur in Form eines Luerdeckels zu beziehen war, wurden die übrigen Thermoplaste als Granulate geliefert und analysiert. Bei Polyethylen kamen drei, bei Cycloolefinpolymer zwei verschiedene Chargen zum Einsatz. Es sollte untersucht werden, ob es zwischen einzelnen Herstellungsansätzen eines Materials Unterschiede hinsichtlich des Extraktionsprofils gibt. Alle Elastomere wurden in der Form extrahiert, in der sie später im Rahmen der Migrationsstudie eingesetzt wurden. Der chlorierte Butylkautschuk B und der Polyisoprenkautschuk G finden sowohl als Verschlusskappe als auch als Kolbenstopfen Verwendung, während der Extraktionsstudie wurden jedoch nur die Verschlusskappen extrahiert. Sie sind kleiner und müssen nicht zerschnitten werden, was undefinierte Schnittkanten ausschließt. In Abbildung 21 sind exemplarische Sprengzeichnungen der Glaskartusche und der Kunststoffkartusche A aufgeführt.

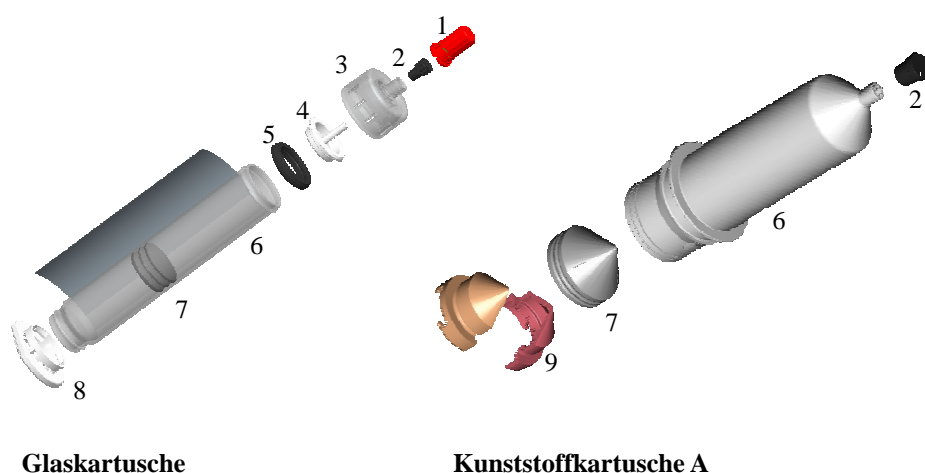


Abbildung 21 Sprengzeichnungen der Glas- und Kunststoffkartusche A: 1 = Schraubkappe, 2 = Verschlusskappe, 3 = PC-Kappe, 4 = Luerdeckel, 5 = Dichtungsring, 6 = Zylinder, 7 = Kolbenstopfen, 8 = Flansch, 9 = Kolben

5.2 ENTWICKLUNG DER EXTRAKTIONSMETHODEN

Wie in Kapitel 2.3 bereits dargelegt wurde, ist sowohl entsprechend der EMEA- als auch FDA-Richtlinie die Durchführung von Extraktionsstudien vorgeschrieben und essentiell für die Zulassung neuer Arzneimittel in Europa und den USA. Hinweise über die Art der Durchführung sind jedoch unzureichend. Zusätzliche Anregungen über Extraktionsverfahren sind dem europäischen Arzneibuch, der PQRI Empfehlung [25] oder dem ASTM (American So-

ciety for Testing and Materials) Standard D 7210-06 [89] zu entnehmen (siehe Kapitel 2.3). Mit diesen Informationen sollte eine Extraktionsmethode unter Verwendung verschiedener Extraktionsmedien entwickelt werden.

Das Verhältnis von zu extrahierendem Material zu Extraktionsmittel wurde für alle Formlinge auf $0,5 \text{ cm}^2/\text{ml}$, nach USP <381> *Elastomeric closures for injections* [90] und Ph. Eur. 3.2.9 *Rubber closures* festgelegt. Dies entspricht einer Oberfläche von 50 cm^2 bei Verwendung von 100 ml Extraktionsmedium. Von allen Kunststoffgranulaten wurden jeweils 2,0 g mit 100 ml extrahiert. Auf Basis der USP <381> würden Einwaagen zwischen 7 – 100 mg resultieren. Mit Hilfe von Herstellerangaben wurde errechnet, dass selbst bei vollständiger Extraktion der Kunststoffadditive aus dem Granulat die extrahierte Menge unter der erzielten Nachweisgrenze der analytischen Methoden liegen würde. Aus diesem Grund wurde bei den Granulaten nach dem europäischen Arzneibuch (Kapitel 3.1.3 des Ph. Eur.) verfahren und damit 2,0 g extrahiert. Auf ein Zermahlen des Extraktionsgutes, wie es in der Vergangenheit oft durchgeführt wurde [79, 89], ist verzichtet worden. Die so vergrößerte Oberfläche würde zu einer erhöhten Extraktionsausbeute führen. Ziel der Arbeit war es jedoch, Bedingungen zu schaffen, die als realitätsnah bezeichnet werden können.

5.2.1 Auswahl der Extraktionsmittel

In den existierenden Rechtsvorschriften wird empfohlen ein Extraktionsmittel zu verwenden, das dem Arzneimittel ähnliche Extraktionseigenschaften aufweist. Hierbei könnte das Arzneimittel selbst oder ein Placebo zum Einsatz kommen. Da es üblich ist, etablierte Kunststoffe für verschiedene Verpackungssysteme zu verwenden, die unterschiedliche Arzneimittel enthalten könnten, scheint es sinnvoller Extraktionsprofile durch die Nutzung vom Füllgut unabhängiger Extraktionsmittel zu erstellen. Zusätzlich wird die Extraktion mit stärkeren Extraktionsmitteln empfohlen, um so ein möglichst vollständiges Profil zu erhalten, welches als Worst Case (= ungünstigster Fall) diskutiert werden kann [23].

In der PQRI Empfehlung wird die Verwendung von Dichlormethan, Isopropanol und Hexan angeraten. Handelt es sich beim Arzneimittel um ein wässriges Produkt, so soll die Extraktion zusätzlich mit Wasser, wasserbasierenden Medien oder wässrigen Pufferlösungen durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Extraktionsmedien Wasser, Isopropanol und Hexan verwendet, um einen möglichst großen Polaritätsbereich abzudecken. Das so erhaltene, umfangreiche Extraktionsprofil stellt den Worst Case für alle untersuchten Materialien dar und kann später Grundlage für verschiedenste Migrationsstudien sein.

Da in dieser Arbeit Migrationsstudien mit wässrigen Medien durchgeführt wurden, wurde dem wässrigen Extraktionsprofil aller Kunststoffe die größte Bedeutung beigemessen.

5.2.2 Entwicklung der Extraktionsverfahren für organische Extraktionsmittel

In der Literatur wurden bereits verschiedene Extraktionsmethoden beschrieben und kamen bei der Erstellung von Extraktionsprofilen zum Einsatz. Hierzu zählen die Soxhlet-Extraktion [25, 80 - 82], die Verwendung von Ultraschall [25, 82 - 84] oder Mikrowellen [85 - 87] sowie die Extraktion unter Rückfluss [25, 68]. In der Vergangenheit wurden die Materialien für die Erstellung von Extraktionsprofilen sogar aufgelöst [88]. Diese Art der Probenvorbereitung scheint realitätsfremd. Sie liefert mit Sicherheit sehr umfangreiche Angaben zur Zusammensetzung des Kunststoffes. Dieses Verfahren steht jedoch nicht im Zusammenhang mit zu erwartenden Migrationsprofilen und übersteigt den Anspruch an Extraktionsprofile. Des Weiteren existiert ein ASTM Standard D 7210 – 06, dem Informationen über die Extraktion von Additiven aus Polyolefinen zu entnehmen sind [89]. Für die Erstellung eines Extraktionsprofils soll das zu extrahierende Material gemahlen werden. Anschließend erfolgt die Extraktion durch Kochen unter Rückfluss, Soxhletextraktion, Ultraschall, Mikrowellen oder ASE (Accelerated Solvent Extraction) für 60 bzw. 90 min, je nach Methode und Material.

Seitens des PQRI werden die Soxhlet-Extraktion, Kochen unter Rückfluss und die Extraktion unter Verwendung von Ultraschall empfohlen, da diese Techniken in der Industrie sehr verbreitet und in der Literatur bereits häufig beschrieben wurden. Beim Vergleich dieser drei Extraktionsverfahren zeigte sich, dass die Ultraschallextraktion ein weniger umfangreiches Extraktionsprofil ergab, weshalb das PQRI die Soxhlet-Extraktion und das Kochen unter Rückfluss favorisiert. Aufgrund des vorhandenen Equipments, der einfachen Durchführbarkeit, des geringen Zeitaufwands und der daraus resultierenden guten Routinetauglichkeit wurden die Extraktionsversuche durch Kochen unter Rückfluss durchgeführt. Diese Methode wird auch von der USP und dem Europäischen Arzneibuch empfohlen [53,90].

Die Entwicklung des Extraktionsverfahrens wurde anhand vier exemplarischer Kunststoffadditive (Irganox 1010, Tinuvin 327, Schwefel, DHBP) durchgeführt, welche in einer Konzentration von 1 mg/l in Isopropanol gelöst vorlagen. Für $n = 5$ wurden je 100 ml dieser Standardlösung in einem 250 ml Rundkolben unter Anschluss eines Dimrothkühlers im Heizpilz auf drei verschiedene Arten gekocht:

Versuch 1: 60 min Kochen unter Rückfluss

Abkühlen auf Raumtemperatur

Umfüllen in einen 100 ml Maßkolben und Auffüllen auf 100 ml mit Isopropanol

Versuch 2: 60 min Kochen unter Rückfluss

Abkühlen auf Raumtemperatur

Spülen des Rückflusskühlers mit 30 ml Isopropanol

Einrotieren des Extraktes auf circa 90 ml

Umfüllen in einen 100 ml Maßkolben und Auffüllen auf 100 ml mit Isopropanol

Versuch 3: 60 min Kochen unter Rückfluss

Abkühlen auf Raumtemperatur

Spülen des Rückflusskühlers mit 30 ml Isopropanol

Umfüllen in einen 200 ml Maßkolben und Auffüllen auf 200 ml mit Isopropanol

Die so erhaltenen Lösungen wurden mittels HPLC-UV quantifiziert und mit einer nicht gekochten Lösung gleicher Konzentration verglichen. Für die graphische Darstellung (siehe Abbildung 22) wurden die Wiederfindungsraten berechnet, wobei die nicht gekochte Lösung den Referenzwert mit 100 % darstellt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über F- und t-Test.

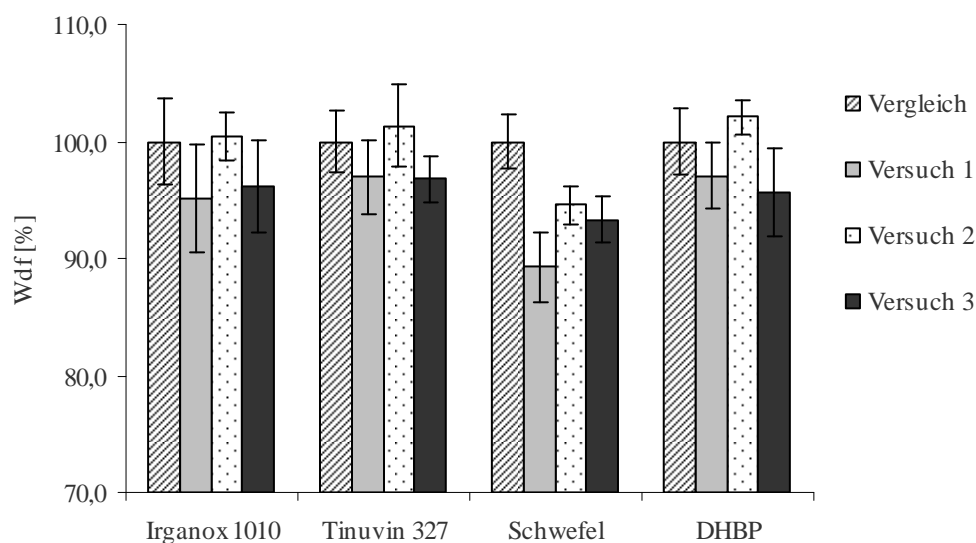


Abbildung 22 Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsverfahren mit einer unbehandelten Probe, n = 5

Beim Vergleich der Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Extrakten der Versuche eins bis drei und dem Referenzwert für Irganox 1010, Tinuvin 327 und DHBP. Das Kochen von Schwefel lieferte in allen drei Extraktionsversuchen eine signifikant schlechtere Wiederfindungsrate, wobei sich die Versuche eins bis drei für dieses Kunststoffadditiv untereinander nicht signifikant unterschieden. Eine Erklärung für die geringere Wiederfindungsrate nach 60 minütigem Kochen könnte eine Adsorption des Schwefels an die Gefäßwand sein.

Das Extraktionsverfahren der Wahl stellte Versuch drei dar. Vorteil dieses Verfahrens ist das Vorhandensein von genügend Extraktionsmittel, um während der Extraktionsstudie das Extraktionsgut ausreichend spülen zu können. Des Weiteren kann so der eventuelle Verlust an flüchtigen Extraktivstoffen im Vergleich zu Versuch zwei minimiert werden, da das Einrotieren des Extraktes entfällt. Außerdem beträgt die Wiederfindung für Schwefel nach dieser Art der Extraktion 93,3 %, was den Ansprüchen an die Richtigkeit einer Methode über die Bestimmung der Wiederfindungsrate entspricht (siehe Kapitel 4.1.4). Schließlich ist der Zeitaufwand geringer verglichen mit Versuch zwei, was für den routinemäßigen Einsatz in der Industrie von großer Bedeutung ist.

Die durch dieses Verfahren gewonnenen Isopropanol-Extrakte können direkt mittels GC-MS, HPLC-UV und UPLC-UV-MS untersucht werden. Nur die Hexan-Extrakte für die flüssig-

romatographischen Methoden müssen weiterverarbeitet werden, da sich Hexan als Lösungsmittel nicht eignet. Aus diesem Grund wurden 10 ml des Hexan-Extraktes zur Trockne eingedunstet und mit 10 ml Isopropanol aufgenommen. Die Isopropanollösung konnte nun mittels HPLC-UV und UPLC-UV-MS untersucht werden.

5.2.3 Bestimmung der Extraktionsdauer für die Extraktion mit organischen Extraktionsmitteln

Im Folgenden soll die Ermittlung der optimalen Extraktionsdauer näher beschrieben werden.

Zur Bestimmung des Gehalts an phenolischen und nicht-phenolischen Antioxidantien sowie Amiden und Stearaten in Polyolefinen laut europäischem Arzneibuch wird das Material für 90 min mit Toluol unter Rückfluss gekocht. Des Weiteren gibt der ASTM Standard D 7210-06 [89] Hinweise zur Extraktion von Antioxidantien und Gleitmitteln aus Polyolefinen. Handelt es sich beim zu extrahierenden Material um PP oder LLDPE, dann wird für die Extraktion durch Kochen unter Rückfluss eine Extraktionszeit von 90 min empfohlen. Soll LDPE oder HDPE auf Extraktivstoffe untersucht werden, wird eine Extraktionszeit von 60 min angegeben. Diese beiden vorgeschlagenen Extraktionszeiten wurden unter Verwendung des zuvor festgelegten Extraktionsverfahrens (siehe Kapitel 5.2.2) miteinander verglichen. Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Extraktionsdauer von 30 min ausreicht, um ein repräsentatives Extraktionsprofil zu erhalten.

Für diese Versuche wurde exemplarisch der bromierte Butylkautschuk F ($n = 5$) extrahiert, bei dem bekannt ist, dass BHT und Schwefel potentielle Extraktivstoffe darstellen. Diese Stopfen wurden mit einem Oberflächen/Volumenverhältnis von $0,5 \text{ cm}^2/\text{ml}$ in 100 ml Hexan extrahiert und anschließend durch die HPLC-UV analysiert. Hexan wurde als Extraktionsmittel gewählt, da es eine hohe Extraktionskraft besitzt und so das umfangreichste Extraktionsprofil liefert. Die drei erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 23 zu sehen.

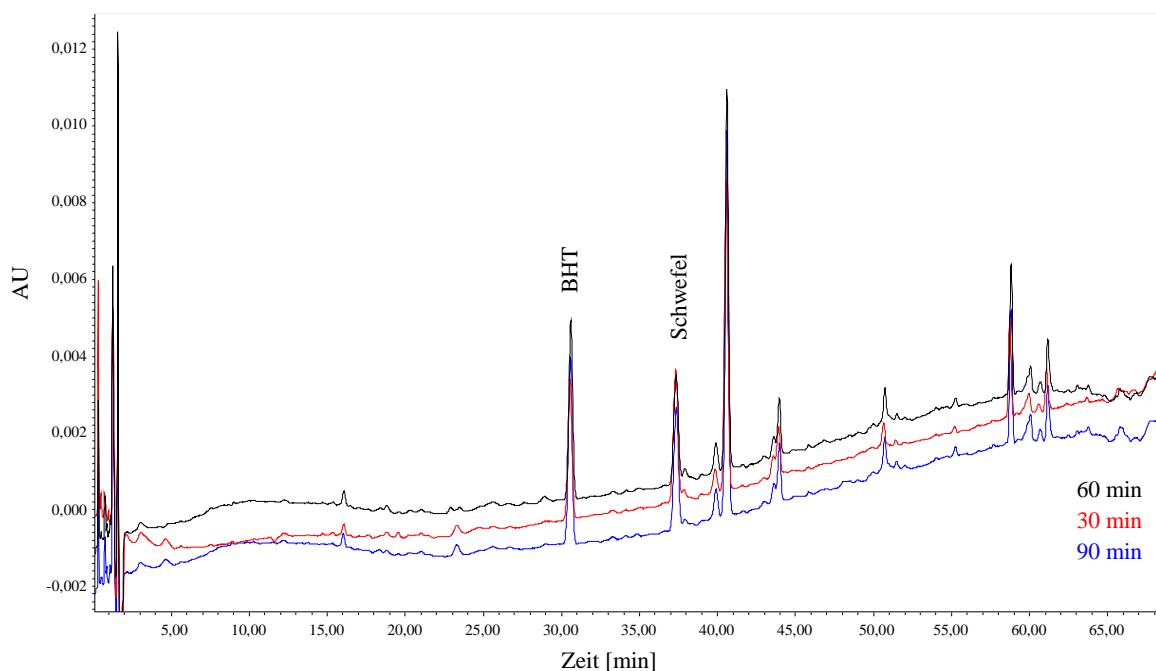


Abbildung 23 Vergleich der HPLC-UV Chromatogramme nach 30, 60 und 90 minütiger Extraktion des bromierten Butylkautschuks F

Aus Abbildung 23 geht hervor, dass die Extraktionsdauer keinen Einfluss auf die qualitative Zusammensetzung des Extraktionsprofils hat, welches mit der HPLC-UV bei 220 nm aufgenommen wurde. Für eine quantitative Einschätzung sind die Flächen für BHT und Schwefel, welche über externe Standards identifiziert werden konnten, nach 30, 60 und 90 min Extraktion miteinander verglichen worden. Wie zu erwarten war, erhöhen sich mit zunehmender Extraktionszeit die Peakflächen der extrahierten Kunststoffadditive. Für eine bessere Beurteilung der Eignung der Extraktionsdauer wurden die Variationskoeffizienten für BHT und Schwefel für die unterschiedlichen Zeiten miteinander verglichen. Durch Verlängerung der Extraktion verringern sich sowohl für BHT als auch für Schwefel die VKs von $VK_{\text{BHT}} = 2,9 \%$ und $VK_{\text{Schwefel}} = 4,5 \%$ für 30 min über $VK_{\text{BHT}} = 2,1 \%$ und $VK_{\text{Schwefel}} = 2,0 \%$ nach 60 min auf $VK_{\text{BHT}} = 0,5 \%$ und $VK_{\text{Schwefel}} = 0,5 \%$ nach 90 minütiger Extraktion.

Um für die Routineanwendung einen guten Kompromiss zwischen Präzision der Methode und Zeitaufwand zu wählen, soll die 60 minütige Extraktion etabliert werden.

5.2.4 Extraktionsmethode mit Wasser als Extraktionsmedium

Während die Entwicklung der Extraktionsmethode für organische Extraktionsmedien auf Empfehlungen des PQRI und Hinweisen aus unterschiedlichster Literatur basiert, wurde für die Extraktion mittels Wasser ein gängiges Verfahren der Arzneibücher [53] für die Überprüfung des Aussehens der Lösung, der Azidität oder auf reduzierende Substanzen verwendet. Hierfür wird das zu untersuchende Kunststoffmaterial bei 121 °C autoklaviert und der Extrakt anschließend analysiert. Diese Methode wurde für die wässrige Extraktion in dieser Arbeit übernommen.

Um eine gute Vergleichbarkeit mit den organischen Extrakten zu gewährleisten, wurde nach einer 40 minütigen Aufheizphase 60 min bei 121 °C sterilisiert. Je nach Analyseverfahren wurden die Extrakte unterschiedlich weiter bearbeitet. Für die Analyse mittels HPLC-UV, UPLC-UV-MS und GC-MS wurde jeder Extrakt nach dem Abkühlen dekantiert und der Extraktionsrückstand zweimal mit je 30 ml Isopropanol gespült. Die Spüllösung wurde mit dem wässrigen Extrakt in einem 200 ml Maßkolben vereinigt und mit Isopropanol aufgefüllt. Somit enthielt der Extrakt das gleiche Verhältnis an Wasser zu Isopropanol wie die Kalibrierlösungen für die externe Kalibrierung zur Untersuchung der wässrigen Extrakte. Dies bot zusätzlich den Vorteil, dass Extraktivstoffe, die sich im heißen Extrakt noch in Lösung befanden, jedoch durch den Abkühlprozess wieder ausfielen, durch den Zusatz des organischen Lösungsmittels wieder in Lösung gebracht werden konnten.

Für die Analyse der wässrigen Extrakte mittels HS-GC-FID wurde der Extrakt nach dem Abkühlen dekantiert und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Vor jeder Analyse wurden 9,5 ml Extrakt in ein mit 4 g Natriumchlorid gefülltes Probengläschen pipettiert und es wurden 0,5 ml Aceton addiert. Somit enthielt der Extrakt die gleiche Menge an Aceton wie die Kalibrierlösungen.

5.2.5 Geräte, Chemikalien und Materialien

Rückflussapparatur: Dimrothkühler mit Wasserkühlung, 250 ml Runkolben und Heizpils (Isopad, Tyco Thermal controls)

Autoklav: HST 5 · 5 · 5 SL, Zirbus technology (Software: Zirbus Visualisierung HST 5x5x5)

Rotationsverdampfer: Büchi Vacuum Controller V-850, Büchi Rotavapor R-215, Büchi Heating Bath B-491

Extrahiertes Material: Bromobutylkautschuk Formling F, amerikanischer Gummierhersteller

Des Weiteren kamen die im Kapitel 3.2.4 beschriebenen Chemikalien und Geräte zum Einsatz.

5.3 EXTRAKTIONSPROFILE

Im Rahmen der Extraktionsstudie wurden für jedes Material je zwei Proben mit Wasser, Isopropanol und Hexan extrahiert und mit Hilfe der entwickelten Methoden zweifach bestimmt. Anschließend wurden für jedes Extraktionsmittel die Profile beider Proben verglichen. Nach einem quantitativen Vergleich der bekannten Extraktivstoffe wurde das Extraktionsprofil mit den höheren Konzentrationen diskutiert. Bei der Auswertung der Extraktionsprofile wurde auf die Identifizierung und Quantifizierung der Extraktivstoffe fokussiert, die Bestandteil der Methodenentwicklung waren. Da eine Quantifizierung von t-Butanol mittels HS-GC-FID aus den in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Gründen schwierig war, erfolgte die Analyse dieses potentiellen Extraktivstoffes im wässrigen Extrakt anhand der HS-GC-MS. Zusätzlich gefundene Extraktivstoffe wurden als Unbekannte aufgeführt. Wenn es möglich war, wurden Strukturvorschläge angestellt. Dabei wurden nur Peaks berücksichtigt, die sich von denen der Leerprobe unterscheiden haben. Diese wurde für jede Extraktionsmethode auf gleiche Weise bearbeitet wie die Proben.

5.3.1 Thermoplaste – Ergebnisse und Diskussion

5.3.1.1 Cycloolefincopolymer (COC)

Im *wässrigen Extrakt* des COC Granulates konnten mittels keiner der analytischen Methoden Peaks in den Chromatogrammen detektiert werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass keine leicht flüchtigen und flüchtigen Substanzen sowie nicht flüchtigen Stoffe, die mittels der entwickelten Methoden erfasst werden könnten, mit Hilfe von Wasser extrahiert wurden.

Im *Isopropanol-Extrakt* dieses Materials wurden mittels der analytischen Methoden mehrere Unbekannte gefunden, wobei eine Identifizierung nicht möglich war. Eine Ausnahme stellt der Scan Modus der GC-MS Methode dar. Dort wurden Peaks detektiert, welche nach Abgleich der Chromatogramme mit der Literaturdatenbank auf die in Tabelle 44 vorgeschlagenen Stoffe deuten. Hierbei könnte es sich um Restlösemittel der Polymerherstellung handeln.

Während die GC-MS Methode im SIM-Modus keine Extraktivstoffe im *Hexan-Extrakt* zeigte, wurden mittels Scan Modus zwei Stoffe detektiert, wobei eines der Signale Decahydronaphthalin, ein potentiell Restlösemittel der Polymerherstellung, vermuten ließ. Im HPLC-UV-Chromatogramm wurde Irganox 1010 identifiziert und quantifiziert. Durch die UPLC-UV-MS Methode wurde dieses Antioxidans als Extraktivstoff bestätigt. Zusätzlich wurde bei einer Retentionszeit von 6,27 min ein Peak im UV-Chromatogramm detektiert, dessen Massenspektrum im Negativ-Modus ein Abbauprodukt von Irganox 1010 vermuten ließ. Durch die Hexanextraktion könnte es zur Abspaltung einer t-Butyl-Gruppe gekommen sein. Die Summenformel wurde unter Verwendung von Folsäure für die Bestimmung der exakten Masse mit Hilfe des Programmes „Elemental Composition“ der Software Masslynx bestätigt. Durch beide flüssigchromatographischen Methoden wurden außerdem Signale detektiert, deren Identität ungeklärt blieb.

Tabelle 44 Extraktionsprofil des COC-Granulates; EM = Extraktionsmittel, P = Wahrscheinlichkeit, 1-5 = Anzahl der unbekannt Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten

EM	Methode	Extraktivstoffe	COC
Wasser	HS-GC-MS	-	
	HS-GC-FID	-	
	GC-MS	-	
	HPLC-UV	-	
	UPLC-UV-MS	-	
Isopropanol	GC-MS (SIM)	Unbekannte	5
	GC-MS (Scan)	2-Methyl-2-butanol P = 72 %	+
		2-Methyl-2-pentanol P = 83 %	+
		4-Methyl-2-pentanol P = 83 %	+
		2-Methyl-3-pentanol P = 72 %	+
	HPLC-UV	-	
UPLC-UV-MS	Unbekannte (UV: $\lambda = 357$ nm)	1	
Hexan	GC-MS (SIM)	-	
	GC-MS (Scan)	Decahydronaphthalin P = 98 %	+
		Unbekannte	1
	HPLC-UV	Irganox 1010	3,299 \pm 0,023 mg/
		Unbekannte	3
	UPLC-UV-MS	Irganox 1010	+
		Abbauprodukt Irganox 1010 (UV: $\lambda = 220$ nm; MS: 1119,6587 m/z)	+
Unbekannte (MS)		4	

5.3.1.2 Cycloolefinpolymer (COP)

Mit Hilfe zweier verschiedener COP-Chargen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Konzentration an Kunststoffadditiven im Polymer auf das Extraktionsprofil hat. Laut Angaben des Herstellers wurde als Antioxidans Irganox 1010 verwendet, wobei die Konzentration dieses Additivs in der Charge B 2 % höher war als in Charge A.

Ein qualitativer Unterschied zwischen beiden Chargen konnte mittels der eingesetzten analytischen Methoden nicht festgestellt werden. Eine Ausnahme stellten nur zwei zusätzliche Peaks im HPLC-UV-Chromatogramm des Hexan-Extraktes für Charge B dar, die jedoch nicht

identifiziert werden konnten. Eine Übersicht der Extraktionsprofile ist der Tabelle 45 zu entnehmen.

Im *wässrigen Extrakt* wurde in den Extrakten beider Herstellungsansätze t-Butanol identifiziert und quantifiziert. Dieser tertiäre Alkohol wird zur Synthese von t-Butylphenolen, wie BHT eingesetzt, kann jedoch auch Abbauprodukt von Irganox 1010 oder des Radikalstarters Di-tert-Butylperoxid sein. Zusätzliche Unbekannte im HS-GC-FID Chromatogramm wurden nicht identifiziert.

Das mit *Isopropanol* erhaltene Extraktionsprofil ist qualitativ identisch mit dem des COC-Granulates.

Durch *Hexan* wurde aus beiden Chargen Irganox 1010 extrahiert, wobei die Konzentration dieses Extraktivstoffes in Charge A höher ist als in Charge B, obwohl die eingesetzte Konzentration im Polymer laut Hersteller in Charge B größer sein sollte. Unter Berücksichtigung der spezifischen Oberflächen ($S_{m\ COP\ A} > S_{m\ COP\ B}$) ließ sich schlussfolgern, dass die Ausgangskonzentration im Kunststoff bei dem vorhandenen Unterschied von 2 % keinen Einfluss auf das Extraktionsprofil hat, sondern die spezifische Oberfläche eine bedeutendere Rolle spielt. Eine weitere Begründung für dieses Ergebnis könnte eine inhomogene Verteilung des Zusatzstoffes im Polymer sein. Irganox 1010 konnte mittels UPLC-UV-MS als Extraktivstoff bestätigt werden. Des Weiteren lässt, wie beim COC-Granulat, das Massenspektrum mit einem Molpeak von 1119,6587 m/z ein Abbauprodukt dieses Antioxidans vermuten. Weitere Signale, detektiert mittels der entwickelten Methoden wurden nicht identifiziert.

Tabelle 45 Extraktionsprofil der Chargen A und B des COP-Granulates; EM = Extraktionsmittel, P = Wahrscheinlichkeit, 1-6 = Anzahl der unbekannt Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	COP Charge A	COP Charge B	
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	0,011 ± 0,000 mg/l	0,010 ± 0,000 mg/l	
	HS-GC-FID	Unbekannte	1	1	
	HPLC-UV		-	-	
	UPLC-UV-MS		-	-	
Isopropanol	GC-MS (SIM)	Unbekannte	5	5	
	GC-MS (Scan)	2-Methyl-2-butanol	P = 72 %	+	+
		2-Methyl-2-pentanol	P = 83 %	+	+
		4-Methyl-2-pentanol	P = 83 %	+	+
		2-Methyl-3-pentanol	P = 72 %	+	+
	HPLC-UV		-	-	
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	1	1	
Hexan	GC-MS (SIM)		-	-	
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	2	2	
	HPLC-UV	Irganox 1010	4,834 ± 0,004 mg/l	3,794 ± 0,014 mg/l	
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	4	6	
		Irganox 1010	+	+	
		Abbauprodukt Irganox 1010 (1119,6587 m/z)	+	+	
		Unbekannte	4	4	

5.3.1.3 Polyethylen (PE)

Für die Extraktionsstudie standen drei verschiedene Chargen Polyethylen des gleichen Herstellers zur Verfügung (siehe Tabelle 46). Das Extraktionsprofil, welches durch Extraktion mittels Wasser, Isopropanol und Hexan erhalten wurde, unterscheidet sich für die drei Herstellungsansätze qualitativ kaum.

Durch die Analyse des *wässrigen Extraktes* mit der HS-GC-FID Methode wurde t-Butanol als Extraktivstoff detektiert (Quantifizierung über HS-GC-MS). Des Weiteren wurde 2-Ethyl-1-hexanol bestimmt. Diese Substanz ist ein Abbauprodukt von DEHP. Im Extrakt der Charge C wurde dieser Weichmacher im HPLC-UV-Chromatogramm detektiert. Die Quelle war mit

großer Wahrscheinlichkeit jedoch die HPLC-Anlage selbst, da DEHP ein weit verbreiteter Weichmacher in Kunststoffen ist, also auch aus Kunststoffkapillaren oder -schläuchen der Anlage migriert sein könnte. Würde es sich tatsächlich um einen Extraktivstoff des PE-Granulates handeln, so hätte zum einen DEHP in allen Chargen gefunden werden und zum anderen ein DEHP-Peak im GC-MS-Chromatogramm detektiert werden müssen, da die Nachweisgrenze für diesen Stoff und diese Methode geringer ist als die der HPLC-UV-Methode. Zusätzlich konnten im HPLC-UV-Chromatogramm in den Chargen B und C die gleiche Unbekannte bei $t_R = 6,85$ min und in Charge C eine weitere Unbekannte gefunden werden. 2-Ethyl-1-hexanol wurde als Extraktivstoff in allen Chargen mittels HS-GC-MS bestätigt. Die Gründe für das Vorkommen dieses Alkohols im Polyethylenextrakt sind jedoch unklar, da der Einsatz von Weichmachern in diesen Polymeren unüblich ist (siehe Kapitel 2.1.5).

Im *Isopropanol-Extrakt* aller PE-Chargen konnten mittels GC-MS verschiedene Kohlenwasserstoffe identifiziert und quantifiziert werden. Sie stellen Abbauprodukte des Polymers dar. Die Konzentrationen dieser Extraktivstoffe unterscheiden sich für die verschiedenen Herstellungsansätze kaum. Des Weiteren konnte im HPLC-UV-Chromatogramm Irgafos 168 oxid identifiziert und quantifiziert werden und als Extraktivstoff auch mittels UPLC-UV-MS bestätigt werden konnte. Die Konzentrationen dieses Extraktivstoffes waren in allen drei Herstellungsansätzen vergleichbar. Außerdem konnte in allen drei PE-Chargen das Gleitmittel Stearinsäure vermutet werden. Eine quantitative Auswertung ist jedoch nicht möglich, da dieser Stoff auch in jeder Leerprobe und immer in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden war. Grund hierfür könnte eine Verschleppung aus vorherigen Proben sein. Um diesen Extraktivstoff zu quantifizieren, könnte eine Derivatisierung mit anschließender Analyse per GC-MS durchgeführt werden. Zusätzliche Signale wurden mit allen analytischen Methoden detektiert, eine Identifizierung konnte nicht stattfinden. Im Scan Modus der GC-MS Methode wurden für vier Signale nach Abgleich mit der Literaturdatenbank Strukturvorschläge gemacht, die der Tabelle 46 zu entnehmen sind.

Durch die *Hexan-Extraktion* wurden zahlreiche Kohlenwasserstoffe als auch Irgafos 168 oxid identifiziert und quantifiziert. Während sich die Konzentrationen an Irgafos 168 oxid der Herstellungsansätze nach Isopropanol-Extraktion kaum voneinander unterschieden, war nach Behandlung mit Hexan ein deutlicher Unterschied zwischen A, B und C zuerkennen. Eine

Erklärung könnte sein, dass Hexan zur Quellung des Granulates führte, was optisch erkennbar war. Durch die Lockerung der Polymerstruktur wurde eine erhöhte Extraktionsausbeute erreicht. Somit hatte die eingesetzte Additivkonzentration bei der Herstellung des Granulates einen großen Einfluss auf das Extraktionsprofil. Schlussfolgerung ist, dass in Charge C die höchste Konzentration an Irgafos 168 eingesetzt wurde und somit durch die Probenvorbereitung mehr Irgafos 168 oxid entstehen konnte. Demzufolge ist die Konzentration dieses Antioxidans in Charge A am geringsten. Irgafos 168 oxid wurde auch mittels UPLC-UV-MS detektiert. Zusätzlich wurden in allen Chromatogrammen Signale detektiert, deren Identifizierung ausblieb. Einige dieser Peaks im GC-MS Chromatogramm deuten aufgrund charakteristischer Massenfragmente ($m/z = 43, 57, 71, 82, 99, \dots$) auf weitere Kohlenwasserstoffe hin.

Tabelle 46 Extraktionsprofile der Polyethylenchargen A, B und C; EM = Extraktionsmittel, 1-20 = Anzahl der unbekannt Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	PE Charge A	PE Charge B	PE Charge C
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	0,012 ± 0,000 mg/l	0,010 ± 0,000 mg/l	0,014 ± 0,000 mg/l
		2-Ethyl-1-hexanol	+	+	+
	HS-GC-FID	2-Ethyl-1-hexanol	0,040 ± 0,002 mg/l	0,103 ± 0,000 mg/l	0,080 ± 0,000 mg/l
	GC-MS		-	-	-
	HPLC-UV	DEHP	-	-	0,106 ± 0,002 mg/l
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	-	1	2
Isopropanol	GC-MS (SIM)	Dodecan	3,339 ± 0,042 mg/l	3,659 ± 0,022 mg/l	3,524 ± 0,034 mg/l
		Tetradecan	8,902 ± 0,094 mg/l	9,081 ± 0,005 mg/l	9,061 ± 0,130 mg/l
		Hexadecan	6,463 ± 0,041 mg/l	6,378 ± 0,034 mg/l	6,372 ± 0,094 mg/l
		Octadecan	4,106 ± 0,012 mg/l	4,019 ± 0,015 mg/l	4,005 ± 0,048 mg/l
		Eicosan	3,840 ± 0,148 mg/l	3,783 ± 0,135 mg/l	3,779 ± 0,148 mg/l
		Docosan	6,674 ± 0,049 mg/l	4,747 ± 0,019 mg/l	4,785 ± 0,009 mg/l
		Tetracosane	3,106 ± 0,019 mg/l	2,673 ± 0,012 mg/l	2,609 ± 0,041 mg/l
		Unbekannte	20	20	20
	GC-MS (Scan)	2-Methyl-2-butanol P = 72 %	+	+	+
		2-Methyl-2-pentanol P = 83 %	+	+	+
		4-Methyl-2-pentanol P = 83 %	+	+	+
		2-Methyl-3-pentanol P = 72 %	+	+	+

EM	Methode	Extraktivstoffe	PE Charge A	PE Charge B	PE Charge C
Isopropanol	HPLC-UV	Irgafos 168 oxid	0,657 ± 0,006 mg/l	0,653 ± 0,004 mg/l	0,649 ± 0,002 mg/l
		Unbekannte	1	-	-
	UPLC-UV-MS	Irgafos 168 oxid	+	+	+
		Stearinsäure	+	+	+
		Unbekannte	1	1	1
Hexan	GC-MS (SIM)	Decan	1,807 ± 0,007 mg/l	2,608 ± 0,066 mg/l	1,865 ± 0,035 mg/l
		Dodecan	7,127 ± 0,013 mg/l	8,056 ± 0,118 mg/l	7,689 ± 0,078 mg/l
		Tetradecan	16,555 ± 0,036 mg/l	17,286 ± 0,272 mg/l	17,153 ± 0,088 mg/l
		Hexadecan	24,943 ± 0,010 mg/l	25,239 ± 0,455 mg/l	25,233 ± 0,029 mg/l
		Octadecan	8,146 ± 0,019 mg/l	8,208 ± 0,189 mg/l	8,188 ± 0,088 mg/l
		Eicosan	11,633 ± 0,015 mg/l	11,655 ± 0,280 mg/l	11,680 ± 0,183 mg/l
		Docosan	10,454 ± 0,003 mg/l	10,579 ± 0,235 mg/l	10,554 ± 0,232 mg/l
		Tetracosane	5,488 ± 0,029 mg/l	5,708 ± 0,003 mg/l	6,038 ± 0,074 mg/l
		Hexacosane	19,408 ± 0,251 mg/l	18,137 ± 0,613 mg/l	17,262 ± 0,602 mg/l
		Unbekannte	10	10	10
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	10	10	10
	HPLC-UV	Irgafos 168 oxid	7,159 ± 0,116 mg/l	6,135 ± 0,006 mg/l	4,558 ± 0,004 mg/l
	UPLC-UV-MS	Irgafos 168 oxid	+	+	+
		Unbekannte	1	3	1

5.3.1.4 Polycarbonat (PC)

Das Extraktionsprofil von Polycarbonat befindet sich in Tabelle 47.

Neben einer Unbekannten wurde t-Butanol im *wässrigen Extrakt* des PC-Granulates detektiert.

Die Extraktion mittels *Isopropanol* lieferte zahlreiche Signale in allen Chromatogrammen, die jedoch nicht identifiziert werden konnten.

Da es sich bei Polycarbonat durch die Carbonatestergruppen um ein polares Polymer handelt, wurden durch *Hexan* nur wenige Stoffe extrahiert. Beide Signale im UPLC-UV Chromatogramm wurden nicht identifiziert.

Tabelle 47 Extraktionsprofil PC; EM = Extraktionsmittel, 1-15 = Anzahl der unbekannt Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	PC	
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	0,009 ± 0,000 mg/	
	HS-GC-FID	-		
	GC-MS	-		
	HPLC-UV	Unbekannte		1
	UPLC-UV-MS	-		
Isopropanol	GC-MS	Unbekannte	1	
	HPLC-UV	Unbekannte	15	
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	4	
Hexan	GC-MS	-	2	
	HPLC-UV	-		
	UPLC-UV-MS	Unbekannte		

5.3.1.5 Polypropylen (PP)

Da für die Extraktionsversuche kein PP-Granulat zur Verfügung stand, musste der Luerdeckel der Glaskartusche extrahiert werden. Hierfür wurde der Formling halbiert. Da es sich hierbei um ein eher sprödes Material handelt, konnte die Schnittkante nicht genau definiert werden, weshalb die so entstandene neue Oberfläche nicht reproduzierbar war. Diese Schnittkante wurde bei der Berechnung der Oberfläche für die Extraktion nicht berücksichtigt, da sie die erforderlichen Worst Case Bedingungen nur fördern. Das erhaltene Extraktionsprofil ist der Tabelle 48 zu entnehmen.

Die Extraktion mit *Wasser* zeigte t-Butanol als Extraktivstoff. Zusätzlich konnte eine unbekannte Substanz mittels HS-GC-FID detektiert werden. Im HPLC-UV-Chromatogramm war neben einer Unbekannten ein Peak zu finden, dessen Retentionszeit auf DEHP hindeutet. Da DEHP jedoch nicht in der GC-MS Methode detektiert wurde und sein Abbauprodukt 2-Ethyl-1-hexanol nicht in der HS-GC-FID Methode sichtbar war, schien die Quelle für diesen Weichmacher die HPLC-Anlage selbst zu sein.

Im SIM- und Scan-Modus der GC-MS Methode wurden durch Extraktion des Materials mit *Isopropanol* Signale detektiert, deren Massenfragmente ($m/z = 43, 57, 71, 82, 99, \dots$) auf gesättigte Kohlenwasserstoffe hindeuteten. Sie ließen Abbauprodukte des Polymers vermuten. Außerdem wurde Irganox 1010 extrahiert und mittels HPLC-UV quantifiziert. Die Anwesenheit dieses Additivs wurde durch die UPLV-UV-MS Analyse bestätigt. Zusätzlich wurde das Gleitmittel Stearinsäure und dessen Abbauprodukt Palmitinsäure identifiziert. Eine Quantifizierung wurde aus den in Kapitel 5.3.1.3 beschriebenen Gründen nicht durchgeführt.

Auch im *Hexan-Extrakt* wurde Irganox 1010 detektiert. Außerdem wurde, neben einem unbekanntem Signal, das Abbauprodukt dieses Zusatzstoffes mittels UPLC-UV-MS (Irganox 1010 – t-Butyl-Rest) bestimmt.

Tabelle 48 Extraktionsprofil von PP; EM = Extraktionsmittel, 1-8 = Anzahl der unbekanntem Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	PP
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	$0,017 \pm 0,000$ mg/
	HS-GC-FID	Unbekannte	1
	GC-MS	-	
	HPLC-UV	Unbekannte	1
	UPLC-UV-MS	DEHP	$0,301 \pm 0,023$ mg/
Isopropanol	GC-MS (SIM)	Unbekannte	30
	HPLC-UV	Irganox 1010	$0,712 \pm 0,004$ mg/
		Unbekannte	1
	UPLC-UV-MS	Irganox 1010	+
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	1
		Palmitinsäure	+
	Stearinsäure	+	
Hexan	GC-MS	-	
	HPLC-UV	Irganox 1010	$9,016 \pm 0,070$ mg/
		Unbekannte	8
	UPLC-UV-MS	Abbauprodukt Irganox 1010 (1119,6587 m/z)	+
	Unbekannte	7	

5.3.2 Elastomere – Ergebnisse und Diskussion

5.3.2.1 Chlorierte Butylkautschuke

Im Rahmen der Extraktionsstudie wurden vier verschiedene chlorierte Butylkautschuke untersucht. Drei Materialien (chlorierter Butylkautschuk A, B und D) sind vom gleichen Hersteller. Eine Übersicht der Extraktionsprofile befindet sich in Tabelle 49 und Tabelle 50.

Im *wässrigen Extrakt* der Formlinge B, C und D wurde mittels HS-GC-MS t-Butanol als Extraktivstoff detektiert. Weitere Restlösemittel wurden aus den Gummimaterialien A und B extrahiert. Hierbei handelt es sich um die Benzolderivate Ethylbenzen, o-Xylen und m-Xylen. Zusätzlich wurde aus allen vier Materialien BHT extrahiert, wobei die aus Formling C extrahierte Menge mehr als zehnmal so groß ist, wie die aus den anderen Elastomeren. Grund hierfür könnte die vergrößerte Oberfläche sein, die mit dem Extraktionsmittel in Berührung kam, da Material C aufgrund seiner Größe halbiert werden musste. Dadurch entstand eine nicht definierte Schnittkante, die in der Berechnung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses nicht berücksichtigt wurde. Gleiches gilt für die Extraktion mit Isopropanol und Hexan. Ein weiterer Grund könnte auch eine durch den zweiten Hersteller festgelegte höhere Ausgangskonzentration an BHT im Polymer sein. In den Gummis A und B wurde mittels der UPLC-UV-MS Methode Palmitinsäure detektiert. Eine Quantifizierung wurde aus den in Kapitel 5.3.1.3 beschriebenen Gründen nicht durchgeführt.

Da es sich bei A und B um silikonisierte Formlinge handelt, wurden im *Isopropanol-Extrakt* bei der GC-MS Analyse die Silikonölderivate OMCTS und DMCPS gefunden. Zusätzlich wurde in allen vier Materialien BHT extrahiert. Dieses Antioxidans wurde für alle vier Formlinge mittels HPLC-UV und UPLC-UV-MS bestätigt. Auch bei Isopropanol als Extraktionsmittel war die extrahierte Menge aus Formling C eindeutig höher als die der anderen.

Mit Hilfe des SIM- und Scan-Modus der GC-MS Methode wurden in allen Formlingen zahlreiche Unbekannte gefunden, deren Massenfragmente auf Abbauprodukte des Polymers hindeuten. Bei den untersuchten Polymeren handelte es sich um Butylkautschuke, deren Hauptmonomer Isobutylen darstellt.

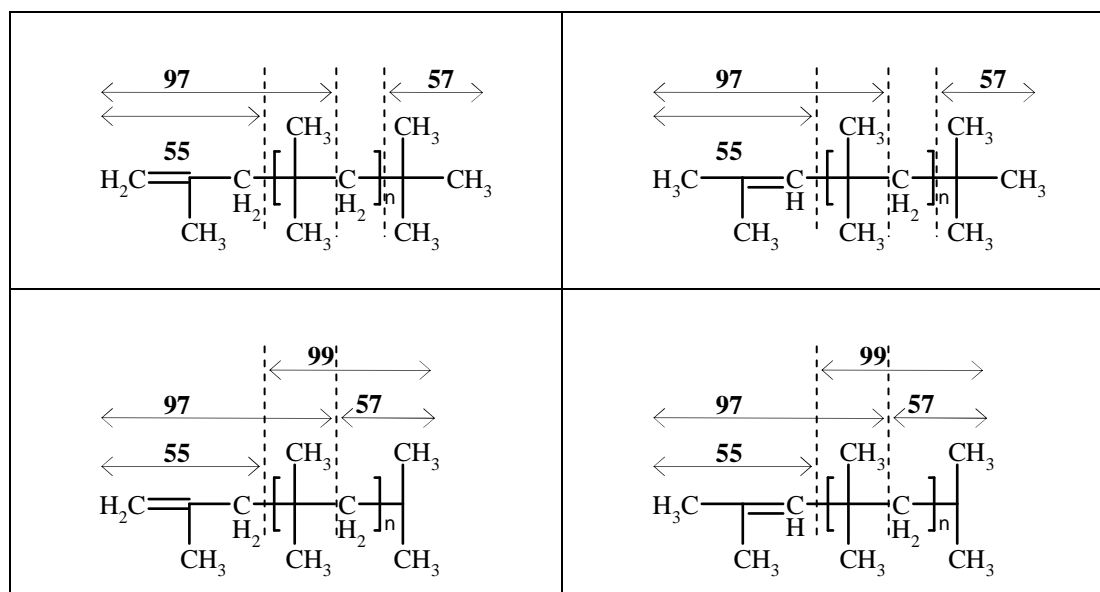


Abbildung 24 Abbau des Butylkautschuk nach Sawaguchi [91]

SAWAGUCHI [91] konnte über zwei verschiedene Abbaumechanismen dieses Polymer vier verschiedene Oligomertypen feststellen, die als Abbauprodukte in Frage kommen. Dabei handelt es sich zum einen um Oligomere mit einer t-Butyl-Endgruppe, und zum anderen um solche mit einer Isopropyl-Endgruppe (siehe Abbildung 24). Charakteristische Massenfragmente dieser Oligomere sind 55, 57, 97 und 99. Mittels UPLC-UV-MS wurden Palmitinsäure und Stearinsäure extrahiert. Im UPLC-MS-Chromatogramm wurde für Formling C DBATD als Extraktivstoff bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein Vernetzungsmittel für die Vulkanisation von Elastomeren. Die Quantifizierung erfolgte über die externe Kalibriergerade des Nachbarpeaks DHBP.

Durch die *Hexanextraktion* wurden für die Materialien A und B Silikonölderivate als Extraktivstoffe gefunden. Auch hier wurde mittels GC-MS, HPLC-UV und UPLC-UV-MS BHT detektiert, wobei die Quantifizierung im GC-MS Chromatogramm erfolgte. Die Konzentration des Antioxidans im Extrakt des Formlings C ist wieder eindeutig am höchsten. Die durch SAWAGUCHI diskutierten Abbauprodukte des Butylkautschuks wurden auch im Hexanextrakt sowohl im SIM, als auch im Scan Modus, für alle vier Elastomere bestätigt. Zusätzlich wurden für die Formlinge A und B die Restlösemittel Ethylbenzen, m-Xylen und o-Xylen identifiziert. In allen vier Formlingen konnten die Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure detektiert werden, in Formling C zusätzlich Myristinsäure. Eine Quantifizierung blieb aus den in Kapitel 5.3.1.3 aufgeführten Gründen aus.

In allen Extrakten wurden des Weiteren zahlreiche Unbekannte detektiert.

Tabelle 49 Extraktionsprofile der chlorierten Butylkautschuke A und B; EM = Extraktionsmittel, 1-45 = Anzahl der unbekanntenen Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling A	Formling B
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	-	0,027 ± 0,000
	HS-GC-FID	Unbekannte	5	2
		Ethylbenzen	0,070 ± 0,000 mg/l	0,006 ± 0,000 mg/l
		m-Xylen	0,248 ± 0,003 mg/l	0,031 ± 0,001 mg/l
		o-Xylen	0,108 ± 0,001 mg/l	0,011 ± 0,001 mg/l
	GC-MS	BHT	0,006 ± 0,000 mg/l	0,002 ± 0,000 mg/l
		Unbekannte	1	1
	HPLC-UV	Unbekannte	7	7
UPLC-UV-MS	Palmitinsäure	+	+	
Isopropanol	GC-MS (SIM)	BHT	2,451 ± 0,018 mg/l	1,267 ± 0,008 mg/l
		OMCTS	0,481 ± 0,004 mg/l	0,331 ± 0,000 mg/l
		DMCPS	0,211 ± 0,001 mg/l	0,174 ± 0,000 mg/l
		Unbekannte	14	12
	GC-MS (Scan)	davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	10	11
		Unbekannte	6	4
	HPLC-UV	davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	6	2
		Unbekannte	45	25
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	10	6
		Palmitinsäure	+	+
Stearinsäure		+	+	
Hexan	GC-MS (SIM)	HMCTS	1,238 ± 0,033 mg/l	0,739 ± 0,095 mg/l
		OMCTS	2,538 ± 0,099 mg/l	2,804 ± 0,048 mg/l
		DMCPS	0,640 ± 0,019 mg/l	0,568 ± 0,007 mg/l
		BHT	16,836 ± 0,546 mg/l	7,954 ± 0,155 mg/l
		Unbekannte	18	16
	GC-MS (Scan)	davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	11	13
		Ethylbenzen	+	+
		m-Xylen	+	+
		o-Xylen	+	+
		Unbekannte	11	15
davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	4	10		

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling A	Formling B
Hexan	HPLC-UV	Unbekannte	28	39
	UPLC-UV-MS	Palmitinsäure	+	+
		Stearinsäure	+	+
		Myristinsäure	-	+
		Unbekannte	19	22

Tabelle 50 Extraktionsprofile der chlorierten Butylkautschuke C und D; EM = Extraktionsmittel, 1-29 = Anzahl der unbekanntenen Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling C	Formling D
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	0,017 ± 0,000 mg/l	0,010 ± 0,000 mg/l
	HS-GC-FID	Unbekannte	1	1
	GC-MS	BHT	0,081 ± 0,001 mg/l	0,004 ± 0,000 mg/l
	HPLC-UV	Unbekannte	4	2
	UPLC-UV-MS	Myristinsäure	+	-
		Unbekannte	-	2
Isopropanol	GC-MS (SIM)	Unbekannte	14	20
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	11	16
		BHT	20,678 ± 0,261 mg/l	2,232 ± 0,060 mg/l
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	2	7
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	2	6
	HPLC-UV	Unbekannte	5	3
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	5	4
		DBATD	3,474 ± 1,064 mg/l	-
		Palmitinsäure	+	+
		Stearinsäure	+	+
Hexan	GC-MS (SIM)	BHT	269,696 ± 12,163 mg/l	29,789 ± 0,074 mg/l
		Unbekannte	10	29
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	7	20
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	10	12
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	6	11
	HPLC-UV	Unbekannte	1	5
	UPLC-UV-MS	Palmitinsäure	+	-
		Stearinsäure	+	+
Unbekannte		6	6	

5.3.2.2 Bromierte Butylkautschuke

Bei den untersuchten bromierten Butylkautschuk-Materialien handelt es sich um Formlinge zweier Hersteller. Der Einfluss des PTFE-Coatings (Formling F_c) wurde erst im Rahmen der Migrationsstudie betrachtet.

Die Extraktionsprofile sind Tabelle 51 zu entnehmen. Während im *wässrigen Extrakt* des Elastomeren F ausschließlich t-Butanol identifiziert wurde, wurde im Elastomer E BHT bestimmt. Außerdem fanden sich für Material E im UPLC-MS Chromatogramm Signale, die auf Palmitin- und Stearinsäure hindeuteten.

Im *Isopropanol-Extrakt* beider Materialien wurde BHT im GC-MS Chromatogramm identifiziert und quantifiziert. Dieses Antioxidans wurde mit Hilfe der HPLC-UV und UPLC-UV-MS als Extraktivstoff bestätigt. Zusätzlich wurden in den GC-MS Chromatogrammen zahlreiche Signale detektiert, von denen einige als Abbauprodukte des Polymers nach SAWAGUCHI [91] vermutet werden konnten. Außerdem wurde Schwefel aus beiden Materialien extrahiert. Im Isopropanol-Extrakt des Formling E wurde als weiteres Antioxidans Irganox 1076 gefunden. In Material E schienen Fettsäuren als Gleitmittel zum Einsatz zu kommen und fanden sich im Isopropanol-Extrakt wieder.

Durch Extraktion mittels *Hexan* wurden die gleichen Kunststoffadditive gefunden wie im Isopropanol-Extrakt, wobei die Konzentrationen im Vergleich sichtbar erhöht sind.

Tabelle 51 Extraktionsprofile der bromierten Butylkautschuke E und F; EM = Extraktionsmittel, 1-35 = Anzahl der unbekannt Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling E	Formling F
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	-	0,012 ± 0,000 mg/l
	HS-GC-FID	Unbekannte	-	10
	GC-MS	BHT	0,002 ± 0,000 mg/l	-
		Unbekannte	4	-
	HPLC-UV	Unbekannte	5	3
	UPLC-UV-MS	Palmitinsäure	+	-
		Stearinsäure	+	-
		Unbekannte	-	1

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling E	Formling F
Isopropanol	GC-MS (SIM)	BHT	0,341 ± 0,001 mg/l	0,278 ± 0,001 mg/l
		Unbekannte	8	11
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	2	8
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	8	9
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	4	9
	HPLC-UV	Schwefel	0,149 ± 0,003 mg/l	0,345 ± 0,005 mg/l
		Irganox 1076	0,741 ± 0,006 mg/l	-
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	8	4
		Palmitinsäure	7	9
		Stearinsäure	+	-
Hexan	GC-MS (SIM)	BHT	1,117 ± 0,008 mg/l	4,06 ± 0,048 mg/l
		Unbekannte	10	35
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	4	24
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	10	9
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 55, 57, 97, 99	6	9
	HPLC-UV	Schwefel	6,595 ± 0,250 mg/l	2,130 ± 0,042 mg/l
		Irganox 1076	9,599 ± 0,622 mg/l	-
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	25	11
		Palmitinsäure	+	-
		Stearinsäure	+	+
		Unbekannte	21	14

5.3.2.3 Polyisoprenkautschuk

Durch *wässrige Extraktion* des Polyisoprens wurde mittels HS-GC-MS t-Butanol als Extraktivstoff detektiert. Außerdem wurde BHT bestimmt (siehe Tabelle 52).

Im *Isopropanol-Extrakt* wurden hohe Mengen an BHT im GC-MS Chromatogramm identifiziert und quantifiziert. Dessen Anwesenheit im Extrakt konnte durch beide flüssigchromatographische Methoden bestätigt werden. Im Scan-Modus der GC-MS wurden zusätzliche unbekannte Peaks detektiert, wobei die Massenfragmente meist auf Abbauprodukte des Polyisoprenkautschuks hinweisen [92, 93]. Hierbei handelte es sich um typische Massenfragmente

von Sesquiterpenen und Monoterpenen wie Dipenten und Isopren. Zusätzlich konnte im Scan-Modus Diphenylether mit einer 87 %igen Wahrscheinlichkeit strukturell beschrieben werden. Durch die HPLC-UV Analyse wurden MTBC und Irganox 1076 als Extraktivstoff identifiziert und quantifiziert. Das Vorkommen dieser Kunststoffadditive konnte durch die UPLC-UV-MS und für MTBC zusätzlich durch die GC-MS bestätigt werden.

Durch die *Hexan-Extraktion* konnten die gleichen Kunststoffadditive wie im Isopropanol-Extrakt identifiziert werden, die extrahierten Mengen waren jedoch sichtbar größer. Im Scan-Modus der GC-MS wurden zusätzlich unbekannte Peaks gefunden, deren Massenfragmente hauptsächlich Abbauprodukten des Polyisoprens zugeordnet werden können. Auch Diphenylether konnte mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % als Extraktivstoff im Hexan strukturell beschrieben werden. In allen Chromatogrammen wurden Signale detektiert, die mit der zur Verfügung stehenden Technik nicht identifiziert werden konnten.

Tabelle 52 Extraktionsprofil des Polyisoprenkautschuks (Formling G); EM = Extraktionsmittel, 1-53 = Anzahl der unbekannt Peaks, + = Extraktivstoff ist enthalten, - = es wurde nichts detektiert

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling G
Wasser	HS-GC-MS	t-Butanol	0,100 ± 0,016 mg/l
	HS-GC-FID	Unbekannte	3
	GC-MS	BHT	0,006 ± 0,000 mg/l
		Unbekannte	2
	HPLC-UV	Unbekannte	8
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	1
Isopropanol	GC-MS (SIM)	BHT	64,237 ± 1,560 mg/l
		MTBC	+
		Unbekannte	31
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	14
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 69, 107, 119, 159	11
		Diphenylether P = 87 %	+
	HPLC-UV	BHT	+
		MTBC	73,796 ± 0,053 mg/l
		Irganox 1076	39,053 ± 0,018 mg/l
	UPLC-UV-MS	Unbekannte	27
		BHT	+
		MTBC	+
		Irganox 1076	+

EM	Methode	Extraktivstoffe	Formling G
Iso	UPLC-UV-MS	Unbekannte	12
Hexan	GC-MS (SIM)	BHT	117,254 ± 5,387 mg/l
		MTBC	+
	GC-MS (Scan)	Unbekannte	8
		Unbekannte	14
		davon Abbauprodukte des Elastomers mit den Massenfragmenten 69, 107, 119, 159	11
	HPLC-UV	Diphenylether P = 90 %	+
		BHT	+
		MTBC	165,937 ± 1,869 mg/l
	UPLC-UV-MS	Irganox 1076	169,641 ± 0,551 mg/l
		Unbekannte	53
BHT			
MTBC			
Irganox 1076			
		Unbekannte	7

5.3.3 Geräte und Chemikalien

Es kamen für die Geräte und Chemikalien aus den Kapiteln 3.2.4 3.3.4 und 5.2.5 zum Einsatz.

5.4 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden für die Extraktionsmittel Wasser, Isopropanol und Hexan Extraktionsmethoden entwickelt, mit denen es möglich war, umfangreiche Extraktionsprofile der verschiedenen Materialien zu erzeugen. Diese Extrakte wurden mit den in Kapitel 3 beschriebenen chromatographischen Methoden analysiert.

Es zeigte sich, dass *Irganox 1010* ein häufig verwendetes Antioxidans in **Thermoplasten** ist. In Polyethylenen wurde *Irgafos 168* verwendet. Beim Vergleich unterschiedlicher Herstellungsansätze wurde festgestellt, dass die eingesetzte Konzentration an Kunststoffadditiven scheinbar keinen Einfluss auf die extrahierten Mengen im wässrigen- und Isopropanol-Extrakt hat. Lediglich die extrahierten Mengen in Hexan spiegeln die Ausgangskonzentrationen im Polymer wider. Hexan führte zur Quellung der apolaren Polymere, was die Extraktionsaus-

beute erhöhte. Diese Theorie basierte auf den Extraktionsergebnissen der COP Chargen und wurde auf die Extraktionsprofile der Polyethylenchargen übertragen. Polare Polymere (z.B. Polycarbonat) sind hingegen beständig gegenüber Hexan und liefern ein weniger umfangreiches Extraktionsprofil für das apolare Extraktionsmittel.

In den Extrakten der **Elastomere** konnte für jedes Material *BHT* als verwendetes Antioxidans festgestellt werden. Zudem wurden viele der unbekanntten Signale in den Chromatogrammen der GC-MS als Abbauprodukte der Polymere vermutet. Des Weiteren konnten mittels der analytischen Methoden materialabhängig *t-Butanol*, *Ethylbenzen*, *m-Xylen*, *o-Xylen*, *Silikonölderivate*, zahlreiche *gesättigte Kohlenwasserstoffe*, *Schwefel*, *DBATD*, *Irganox 1010* und *MTBC* identifiziert und quantifiziert werden. Zusätzlich wurden Stearin-, Palmitin- und Myristinsäure identifiziert. Eine Quantifizierung wurde jedoch nicht durchgeführt, weil bei der Fettsäureanalytik auch ubiquitäre Mengen erfasst werden. Da deren Vorkommen in den Leerproben nicht reproduzierbar ist, war eine Peakflächensubtraktion unmöglich.

Mit Hilfe der entwickelten Screening- und Extraktionsmethoden konnten umfangreiche Extraktionsprofile für alle Materialien erstellt werden, die für die Materialauswahl für Primärpackmittel und Migrationsstudien eine sehr gute Grundlage darstellen.

6 MIGRATIONSSTUDIE

6.1 ALLGEMEINES

Während der Migrationsstudie sind acht Behältnisse untersucht worden. In Tabelle 53 befindet sich eine Auflistung dieser und deren produktberührenden Bestandteile. Die Bezeichnung der Kunststoffe und Elastomere entspricht der aus der Extraktionsstudie. Während der Migrationsstudie sollte gezeigt werden, dass sich im Arzneimittel keine Stoffe befinden, die aus den Kunststoffen stammen und toxikologisch bedenklich sein könnten. Die Analyse erfolgte mittels der zuvor entwickelten Methoden aus Kapitel 3.

Tabelle 53 Auflistung der während der Migrationsstudie untersuchten Behältnisse mit ihren produktberührenden Bestandteilen

Kunststoffkartusche A	Kunststoffkartusche B	Kunststoffkartusche C
COP (Zylinder) Polyisoprenkautschuk G (Verschlusskappe, Kolbenstopfen)	COP (Zylinder) chlorierter Butylkautschuk B (Verschlusskappe, Kolbenstopfen)	COP (Zylinder) chlorierter Butylkautschuk C (Kolbenstopfen)
Kunststoffkartusche D	Glaskartusche	Vial A
COP (Zylinder) bromierter Butylkautschuk E (Kolbenstopfen)	Glasart I (Zylinder) chlorierter Butylkautschuk B (Verschlusskappe, Kolbenstopfen) chlorierter Butylkautschuk A (Dichtungsring) PC (PC-Kappe) PP (Luerdeckel)	Glasart I (10 ml Vial) chlorierter Butylkautschuk C (Stopfen)
Vial B	Vial C	
Glasart I (10 ml Vial) bromierte Butylkautschuk F (Stopfen)	Glasart I (3 ml Vial) bromierter Butylkautschuk F _c gecoatet (Stopfen)	

Für die Auswertung der erhaltenen Migrationsprofile wurden die in Kapitel 5.3 vorgestellten Extraktionsprofile zu Hilfe genommen. Da es sich beim untersuchten Füllgut der Behältnisse um Wasser bzw. um ein wasserbasiertes Kontrastmittel handelte, spielte hier das Extraktionsprofil, erhalten durch wässrige Extraktion, eine besonders große Rolle. Die gefundenen

Migrationsstoffe wurden anschließend anhand von Literaturhinweisen und den in Kapitel 2.3 diskutierten Grenzwerte toxikologisch eingeschätzt.

6.2 BEFÜLLUNG, STERILISATION UND EINLAGERUNG

Bei den eingesetzten Materialien handelte es sich um solche, die bereits auf dem Markt etabliert sind. Alle Behältnisse wurden von Hand zusammengebaut und befüllt. Die Befüllung erfolgte mit Wasser und einem Kontrastmittel. Während die Vials mit einer Eppendorff-Pipette befüllt wurden, wurden die Kartuschen über die Kartuschenspitze mittels Dispensette befüllt. Die Füllvolumina orientierten sich an denen der Marktprodukte bzw. am maximalen Füllvolumen. Sie sind der Tabelle 54 zu entnehmen.

Tabelle 54 Füllvolumina der untersuchten Behältnisse

Kunststoffkartusche A	Kunststoffkartusche B	Kunststoffkartusche C	Kunststoffkartusche D
150 ml	40 ml	100 ml	40 ml
Glaskartusche	Vial A	Vial B	Vial C
100 ml	10 ml	10 ml	3 ml

Pro Analysezeitpunkt wurden für jede Kartusche fünf Stück befüllt, für jedes 10 ml Vial zehn Stück und für das 3 ml Vial 20 Stück. Somit war eine ausreichende Probenanzahl für die Analysen vorhanden.

Nach der Befüllung wurden die Behältnisse 20 min unter Heißwasserberieselung sterilisiert. Die Aufheizzeit betrug für die mit Wasser befüllten Behältnisse 30 min, für die mit Kontrastmittel befüllten 52 min. Nach der Autoklavierung erfolgte die Startuntersuchung der Proben mittels entwickelter Methoden. Die restlichen Behältnisse wurden nach der Sterilisation unter ACC-Bedingungen (ACCelerated condition = 40 °C, 75 % RH) eingelagert. Nach drei und sechs Monaten wurden die jeweiligen Proben ausgelagert und zeitnah untersucht. Vor der Analyse wurden die Behältnisse für eine gleichmäßige Durchmischung und das Ablösen eventuell migrierter Stoffe von der Gefäßwand für 15 min bei 700 U/min auf einen Schüttler gestellt.

Aus Kapazitätsgründen erfolgte die Analyse mittels UPLC-UV-MS nur nach der Sterilisation und achtmonatiger Lagerung. Gleiches galt für die Quantifizierung von t-Butanol mittels HS-GC-MS. Konnte in den Proben nach drei Monaten mittels HS-GC-FID ein Signal t-Butanol zugeordnet werden, welches größer ist als der Systempeak im Blank, so wurde von einer Migration dieses Alkohols ausgegangen. In den folgenden Tabellen ist dies durch ein „+“ symbolisiert.

Alle Behältnisse wurden vor dem Befüllen, nach dem Befüllen, nach Sterilisation und nach Auslagerung gewogen. So sollte überprüft werden, ob die manuell zusammengebauten Behältnisse eine ausreichende Dichtigkeit aufweisen. Eine eventuelle Gewichtsabnahme sollte in die Berechnung der Migrationsprofile einbezogen werden.

Zu jedem Analysezeitpunkt sind pro Behältnistyp zwei Proben zweifach bestimmt worden. Da sich die Migrationsprofile zweier Proben für einige bekannte und unbekannte Stoffe quantitativ signifikant voneinander unterscheiden haben, sind in den Tabellen dieses Kapitels jeweils die Behältnisse mit den höheren Migrationswerten als Worst Case aufgeführt. Eine Ausnahme stellt die HS-GC-FID Analyse der Glasvials dar. Während die 10 ml Vials aufgrund des geringen Volumens nur einfach bestimmt worden sind, wurden für die Analyse der 3 ml Vials der Inhalt von jeweils sieben Vials vereinigt und doppelt bestimmt. Durch das Umgehen eines zusätzlichen Verdünnungsschrittes sollte so die Quantifizierung vereinfacht werden. Eine Übersicht über Anzahl der zu analysierenden Proben pro Methode gibt Tabelle 55.

Tabelle 55 Überblick über die Probenanzahl, welche analysiert wurde; K = Kartusche, GV = Glasvial, DB = Doppelbestimmung, EB = Einzelbestimmung

Behältnisse	HS-GC-FID (Start/3M/6M)	GC-MS (Start/3M/6M)	HPLC-UV (Start/3M/6M)	HS-GC-MS (Start/6M)	UPLC-UV-MS (Start/8M)
K	Je 2 K per DB	Je 2 K per DB	Je 2 K per DB	Je 2 K per DB	Je 2 K per DB
GV 10 ml	Je 2 GV per EB	Je 2 GV per DB	Je 2 GV per DB	Je 2 GV per EB	Je 2 GV per DB
GV 3 ml	DB aus 7 GV	Je 2 GV per DB	Je 2 GV per DB	DB aus 7 GV	Je 2 GV per DB

6.3 MIGRATIONSPROFILE

In den Tabellen dieses Kapitels befinden sich die Migrationsprofile aller Behältnisse, befüllt mit Wasser bzw. Kontrastmittel. Die gefundenen Migrationsstoffe sind sortiert nach Analyseverfahren. Für bekannte Migrationsstoffe sind die errechneten Konzentrationen nach Sterilisation sowie nach drei und sechs bzw. acht Monaten Lagerungen ebenfalls den Tabellen zu entnehmen. Für unbekannte Signale wurde ein Konzentrationsbereich angegeben, der sich unter Zuhilfenahme externer Standards aus der Validierung ergab, die den kleinsten bzw. größten Response der jeweiligen Methode repräsentieren. Eine Quantifizierung erfolgte nur, wenn die Flächen der zu betrachtenden Signale oberhalb des jeweiligen LOQ lagen. Die externen Standards, über deren externe Kalibrierung eine Quantifizierung erfolgte, befinden sich in Tabelle 56. Eine Quantifizierung unbekannter Signale mittels UPLC-UV-MS im Kontrastmittel konnte anhand der verwendeten Standards nicht durchgeführt werden, da diese Matrix eine quantitative Analyse im Spurenbereich nicht möglich machte.

Es werden nur die Konzentrationen aufgeführt, welche oberhalb des zulässigen Wertes für genotoxische Stoffe von 1,5 µg/d liegen, bezogen auf die Annahme, dass das jeweilige Füllvolumen der Behältnisse der maximalen Einmalgabe entspricht. Alle Konzentrationen und Konzentrationsbereiche beziehen auf das entsprechende Füllvolumen der Behältnisse.

Zusätzlich wird in jeder Tabelle der Gesamtmigrationsgrenzwert, berechnet nach der Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG, und die Gesamtmigrationswerte zu jedem Analysezeitpunkt aufgeführt. Eine Auswertung dieser Zahlen, sowie eine abschließende toxikologische Betrachtung der Migrationsprofile erfolgt am Ende dieses Kapitels.

Tabelle 56 Übersicht über die externen Standards zur Berechnung des Konzentrationsbereiches unbekannter Signale

Methoden	HS-GC-FID	GC-MS	HPLC-UV	
<i>Füllgut</i>	<i>Wasser & UV 300</i>	<i>Wasser & UV 300</i>	<i>Wasser</i>	<i>UV 300</i>
Kleiner Response	2-Ethyl-1-hexanol	DEHP	Irganox 1010	Irganox 1010
Großer Response	Ethylbenzen	OMCTS	MTBC	Schwefel

Methoden	UPLC-UV-MS		
<i>Füllgut</i>	<i>Wasser</i>		
<u>Detektion</u>	<u>MS pos</u>	<u>MS neg</u>	<u>UV</u>
Kleiner Response	TpTP	Tinuvin 326	BHT
Großer Response	ODPA	DHBP	Tinuvin P

6.3.1 Wasser als Füllgut - Ergebnisse

6.3.1.1 Kunststoffkartuschen

Es wurden vier verschiedene Kunststoffkartuschen, gefüllt mit Wasser, während der Migrationsstudie untersucht. Die Zylinder aller Kartuschen bestanden aus COP, die eingesetzten Elastomere unterschieden sich jedoch (siehe Kapitel 6.1).

Bei der Auswertung des Migrationsprofils der **Kunststoffkartusche A** (Füllvolumen 150 ml) konnten t-Butanol und BHT als migrierte Substanzen festgestellt werden. Während die Konzentration an t-Butanol nach sechsmonatiger Lagerung geringer war als nach der Sterilisation, was durch Adsorption an die Behälterwand erklärt werden könnte, unterschieden sich die Konzentrationen an migriertem BHT nach Sterilisation und nach drei Monaten nicht und liegen zudem unterhalb des TTC ($c < 1,5 \mu\text{g}$). Auch nach sechs Monaten ist keine signifikante Konzentrationszunahme zu verzeichnen.

Außerdem wurden zu jedem Analysezeitpunkt Signale detektiert, welche nicht identifiziert werden konnten. Die Konzentrationsbereiche befinden sich in Tabelle 57 und bewegen sich für leicht flüchtige und flüchtige Stoffe fast ausschließlich unterhalb des TTC ($c = 1,5 \mu\text{g}$).

Die Konzentrationsbereiche der Unbekannten in den Chromatogrammen der flüssigchromatographischen Methoden liegen, bis auf eine Ausnahme, oberhalb des durch die PQRI empfohlenen QT ($c = 5\mu\text{g}$). Der GMGW der Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG beträgt für die Kunststoffkartusche A mit einem Füllvolumen von 150 ml 9 mg. Die Summe der Konzentrationen der migrierten Stoffe liegt zu jedem Zeitpunkt weit unterhalb dieses Grenzwertes.

Eine vollständige Übersicht des Migrationsprofils der Kunststoffkartusche A befindet sich in Tabelle 57.

Tabelle 57 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche A, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 35,48 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 39,97 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 40,27 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 43,66 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 44,88 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	$38,55 \pm 1,49$ + 7 < LOQ < LOQ < LOQ < LOQ 2,25 – 4,80	n.b. + 3 (< LOQ) – 3,75 (< LOQ) – 2,40 (< LOQ) – 2,25 (< LOQ) – 3,90 14,85 – 29,40	$19,05 \pm 4,64$ + 3 0,011 – 5,25 < LOQ < LOQ 1,80 – 5,55 21,45 – 36,75
GC-MS (SIM) GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB c < LOQ [Anzahl] -	< 1,5 - -	< 1,5 - -	$1,80 \pm 0,15$ 4 -
HPLC-UV UPLC-UV-MS	UB 2,42 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 3,41 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 4,48 min (UV) [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 0,42 min (pos. 813,851) [$\mu\text{g}/\text{K}$]	- - < LOQ -	30,45 – 81,00 18,75 – 48,60 n.b. n.b.	37,95 – 93,15 - < LOQ 195,60 – 1201,65
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 9 mg)		0,041	0,172	1,363

Die Untersuchung der **Kunststoffkartusche B** (Füllvolumen 40 ml) lieferten t-Butanol und BHT als Migrationsstoffe. Wie bei Kunststoffkartusche A war eine Abnahme der Konzentrationen zu beobachten.

on an t-Butanol nach sechs Monaten zu erkennen. Während sich die Ergebnisse für BHT zwischen den ersten beiden Messpunkten nicht wesentlich unterschieden, war nach sechsmonatiger Lagerung eine erhöhte Menge zu verzeichnen.

Die Analyse mittels der entwickelten Methoden lieferten zu jedem Zeitpunkt Signale, deren Identität nicht geklärt wurde. Mit Ausnahme von zwei Unbekannten (tR = 18,58 min und 19,14 min) lagen die Konzentrationsbereiche für leicht flüchtige und flüchtige Substanzen unterhalb des QT. Dieser wurde jedoch von drei Unbekannten in den Chromatogrammen der flüssigchromatographischen Methoden überschritten. Der GMGW von 2,4 mg wurde zu keinem Zeitpunkt überschritten. Eine ausführliche Darstellung des Migrationsprofils der Kunststoffkartusche B befindet sich in Tabelle 58.

Tabelle 58 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche B, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 18,58 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 19,14 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 43,85 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 44,88 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 45,89 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	$5,64 \pm 0,52$ + - - - - < LOQ < LOQ	n.b. + 5 1,72 – 38,8 - < 1,5 0,92 – 2,52 < LOQ	$3,32 \pm 0,16$ + 1 - 3,32 – 6,00 - 0,4 - 1,36 1,52 – 3,12
GC-MS (SIM) GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$] -	< 1,5 -	< 1,5 -	$6,12 \pm 0,96$ -
HPLC-UV UPLC-UV-MS	BHT UB c < LOQ [Anzahl] UB 2,42 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 3,23 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 4,48 min (UV) [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 0,42 min (pos. 813,851) [$\mu\text{g}/\text{K}$]	- - - - < LOQ $9,36 - 52,00$	+ 3 $7,28 - 19,32$ $10,88 - 29,32$ n.b. n.b.	+ 2 $10,16 - 25,00$ $12,56 - 30,96$ < LOQ $38,72 - 236,16$
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 2,4 mg)		0,069	0,091	0,312

In Tabelle 59 sind die Ergebnisse der **Kunststoffkartusche C** (Füllvolumen 100 ml) der Migrationsstudie abgebildet. Während nach der Sterilisation t-Butanol quantifiziert wurde ($c < 1,5 \mu\text{g}$), die Migration auch nach drei Monaten Einlagerung festgestellt wurde, konnte dieser Alkohol nach sechs Monaten weder mittels Massenspektrum noch Flammenionisationsdetektor detektiert werden. Über die gesamte Lagerzeit war eine Zunahme der Migration von BHT zu erkennen.

Weitere Signale wurden per gas- und flüssigchromatographischer Methoden detektiert, jedoch nicht identifiziert. Die Summe der Konzentrationen an migrierten Substanzen ist zu jedem Zeitpunkt kleiner als der GMGW von 6 mg.

Tabelle 59 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche C, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$] t-Butanol UB $c < \text{LOQ}$ [Anzahl]	< 1,5 + -	n.b. + -	- - 4
GC-MS (SIM) GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$] -	< 1,5 -	$2,00 \pm 0,10$ -	$5,30 \pm 0,00$ -
HPLC-UV UPLC-UV-MS	UB $c < \text{LOQ}$ [Anzahl] UB 3,18 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 4,48 min (UV) [$\mu\text{g}/\text{K}$]	($< \text{LOQ}$) – 10,7 < LOQ	8,30 – 20,50 n.b.	1 - < LOQ
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 6 mg)		0,012	0,023	0,005

Bei Betrachtung des Migrationsprofils der **Kunststoffkartusche D** (Füllvolumen 40 ml, Tabelle 60) ist zu erkennen, dass die migrierte Menge an t-Butanol nach sechs Monaten leicht zugenahm. Zusätzlich konnte nach Sterilisation und drei Monaten Lagerung BHT identifiziert, jedoch nicht quantifiziert werden, da die migrierte Menge unterhalb des LOQ lag. Nach sechs Monaten wurde kein BHT detektiert.

Mithilfe der analytischen Methoden wurden Signale detektiert, die nicht identifiziert werden konnten. Drei dieser Stoffe hatten Konzentrationsbereiche oberhalb des empfohlenen QT. Der GMW lag zu jedem Zeitpunkt unterhalb des GMGW von 2,4 mg.

Tabelle 60 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche D, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$]	< 1,5	n.b.	< 1,5
HS-GC-FID	t-Butanol	+	+	+
	UB c < LOQ [Anzahl]	2	6	2
	UB 29,66 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	-	< 1,5	-
	UB 37,87 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	-	< 1,5	-
GC-MS (SIM)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$]	<LOQ	<LOQ	-
GC-MS (Scan)	-	-	-	-
HPLC-UV	UB c < LOQ [Anzahl]	-	2	2
	UB 3,22 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	-	3,92 – 9,96	6,48 – 15,80
	UB 10,69 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	-	<LOQ	1,56 – 3,60
UPLC-UV-MS	UB 4,48 min (UV) [$\mu\text{g}/\text{K}$]	2,80 – 37,56	n.b.	09,56 – 125,80
	UB 0,42 min (pos. 813,851) [$\mu\text{g}/\text{K}$]	-	n.b.	28,96 - 294,96
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 2,4 mg)		0,038	0,011	0,441

6.3.1.2 Glaskartusche

Bei der **Glaskartusche** (Füllvolumen 100 ml) handelt es sich um das Behältnis, bei dem die meisten unterschiedlichen Kunststoffe eingesetzt werden. Neben Glas, als Zylindermaterial, werden Polypropylen, Polycarbonat und zwei verschiedene Gummimaterialien als Primärpackmittel verwendet.

Auch bei dieser Kartusche konnte die Migration von t-Butanol festgestellt werden. Die Konzentration nahm in Abhängigkeit von der Lagerungszeit leicht zu. Zusätzlich wurde, wie zuvor bei allen Kunststoffkartuschen, BHT identifiziert, die migrierte Menge ist jedoch für eine

Quantifizierung zu gering. Mittels HS-GC-FID konnten zudem drei Benzol-Derivate identifiziert werden, deren Konzentrationen während der Lagerung abnahmen. Bei diesen Derivaten handelte es sich um die Restlösemittel Ethylbenzen, m-Xylen und o-Xylen.

Zusätzlich migrierte Unbekannte wurden mit allen analytischen Methoden detektiert. Die Konzentrationsbereiche der leicht flüchtigen und flüchtigen Stoffe lagen, bis auf zwei Ausnahmen (HS-GC-FID, $t_R = 19,39$ min und $19,57$ min), unterhalb des QT. Der GMGW von 6 mg wurde zu keinem Zeitpunkt der Migrationsstudie überschritten.

Eine ausführliche Darstellung des Migrationsprofils der Glaskartusche befindet sich in Tabelle 61.

Tabelle 61 Migrationsprofil der Glaskartusche, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 16,91 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 19,14 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 19,39 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 19,57 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 22,03 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] Ethylbenzen [$\mu\text{g}/\text{K}$] m-Xylen [$\mu\text{g}/\text{K}$] o-Xylen [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 42,54 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	$3,10 \pm 0,40$ + 1 $2,20 - 4,70$ - $5,90 - 12,40$ - $1,60 - 3,40$ $27,30 \pm 0,20$ $62,70 \pm 0,60$ $23,30 \pm 0,30$ -	n.b. + 5 - - $2,80 - 7,20$ - - $17,90 \pm 1,40$ $61,20 \pm 4,50$ $21,90 \pm 1,60$ $(< \text{LOQ}) - 2,00$	$4,00 \pm 0,20$ + - $0,90 - 3,30$ $(< \text{LOQ}) - 2,40$ $1,00 - 3,40$ $2,10 - 5,20$ <LOQ $11,50 \pm 0,20$ $46,00 \pm 0,80$ $19,80 \pm 0,00$ $(< \text{LOQ}) - 2,90$
GC-MS GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$] -	<LOQ -	<LOQ -	<LOQ -
HPLC-UV	UB c < LOQ [Anzahl] UB 11,63 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 12,29 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] (Doppelpeak)	1 $(< \text{LOQ}) - 12,60$ $23,10 - 74,50$	2 $6,40 - 15,30$ $22,40 - 59,90$	- $10,00 - 24,20$ $34,80 - 85,10$

Method	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
UPLC-UV-MS	UB 4,46 min (UV) [µg/K] UB 3,44 min (UV) [µg/K] UB 0,42 min (pos. 813,851) [µg/K]	<LOQ 26,10 – 94,80 -	n.b. n.b. n.b.	66,70 – 220,20 24,10 – 87,90 603,60 – 929,80
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 6 mg)		0,319	0,185	1,443

6.3.1.3 Glasvials

Es wurden drei Glasvials untersucht, die sich im Stopfenmaterial unterscheiden, wobei Vial B und C aus dem gleichen Elastomer bestehen, der Stopfen des Vials C jedoch zusätzlich mit einer PTFE-Schicht (PolyTetraFluorEthylen) überzogen ist.

Auch aus dem Stopfenmaterial des **Glasvials A** (Füllvolumen 10 ml) migrierte t-Butanol, wobei die Konzentrationen nach Sterilisation und sechsmonatiger Lagerung unterhalb des TTC ($c < 1,5$ mg) lagen. Auch BHT konnte nach der Sterilisation als Migrationsstoff identifiziert werden, die Konzentration lag jedoch unterhalb des LOQ. Nach drei und sechs Monaten war BHT nicht mehr detektierbar.

Zusätzliche Signale wurden detektiert, jedoch nicht identifiziert. Die Konzentrationsbereiche lagen unterhalb des TTC, bis auf eine Ausnahme. Die mittels UPLC-UV-MS detektierte Unbekannte bei $t_R = 0,41$ min wies einen Konzentrationsbereich oberhalb des QT auf. Der GMGW von 0,6 mg wurde zu keinem Zeitpunkt der Migrationsstudie überschritten.

Das vollständige Migrationsprofil des Glasvials A befindet sich in Tabelle 62.

Migrationsstudie

Tabelle 62 Migrationsprofil Glasvial A, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, V = Vial UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{V}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 20,00 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5 + - -	n.b. + 5 -	< 1,5 + 2 < 1,5
GC-MS GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g}/\text{V}$] -	<LOQ -	- -	- -
HPLC-UV UPLC-UV-MS	UB c < LOQ [Anzahl] UB 0,42 min (pos. 813,851) [$\mu\text{g}/\text{V}$]	- -	2 n.b.	- 20,17 – 124,88
GMW_{max.} [mg/Glasvial] (GMGW = 0,6 mg)		0,000	0,000	0,125

Auch in **Glasvial B** (Füllvolumen 10 ml) wurde t-Butanol sowohl nach der Sterilisation, als auch nach drei und sechs Monaten mit einer Konzentration von $c < 1,5 \mu\text{g}$ detektiert. Zusätzlich wurden zu jedem Analysezeitpunkt unbekannte Signale gefunden, deren Konzentrationsbereiche jedoch unter dem TTC von $c = 1,5 \mu\text{g}/\text{d}$ lagen, bzw. eine Quantifizierung aufgrund eines Signal-Rausch-Verhältnisses $S/R < 10$ ausblieb. Eine Ausnahme stellte die Unbekannte bei $t_R = 0,42 \text{ min}$ im UPLC-UV-MS dar, der GMGW von 0,6 mg wird jedoch zu keinem Zeitpunkt überschritten. Eine Übersicht über das vollständige Migrationsprofil gibt Tabelle 63.

Tabelle 63 Migrationsprofil Glasvial B, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, V = Vial, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	n.b.	< 1,5
HS-GC-FID	t-Butanol	+	+	+
	UB c < LOQ [Anzahl]	-	-	3
	UB 20,00 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	-	< 1,5
	UB 25,96 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< 1,5	< LOQ
	UB 33,39 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< LOQ	< 1,5	< LOQ
	UB 37,29 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< LOQ	< 1,5
	UB 39,08 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< 1,5	< LOQ
	UB 39,64 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< LOQ	< 1,5
	UB 42,53 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< LOQ	< 1,5
	UB 44,14 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	< 1,5	< 1,5
	UB 46,09 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< LOQ	< 1,5
GC-MS	-	-	-	-
GC-MS (Scan)	-	-	-	-
HPLC-UV	-	-	-	-
UPLC-UV-MS	UB 0,42 min (pos. 813,851) [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	-	4,44 – 26,16
GMW_{max.} [mg/Glasvial] (GMGW = 0,6 mg)		0,000	0,000	0,030

Das Migrationsprofil des **Glasvials C** (Füllvolumen 3 ml) wies vor allem unbekannte Signale auf, deren Konzentrationsbereiche den Grenzwert von TTC < 1,5 μg nicht überschritten bzw. unterhalb des LOQ lagen. Mittels UPLC-MS wurde ein unbekannter Migrationsstoff mit einem Konzentrationsbereich größer als der empfohlene QT quantifiziert. Zu keinem Zeitpunkt der Migrationsstudie ist der GMGW von 0,6 mg erreicht worden. In Tabelle 64 befindet sich ein Überblick über das erhaltene Migrationsprofil des Glasvials C.

Migrationsstudie

Tabelle 64 Migrationsprofil Glasvial C, befüllt mit Wasser; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, V = Vial, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	n.b.	< 1,5
HS-GC-FID	t-Butanol	-	-	+
	UB c < LOQ [Anzahl]	1	6	4
	UB 20,28 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< 1,5	< 1,5
	UB 39,10 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< LOQ	< 1,5	< 1,5
	UB 44,35 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	< 1,5	< 1,5
GC-MS	BHT [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< LOQ	-	-
GC-MS (Scan)	-	-	-	-
HPLC-UV	-	-	-	-
UPLC-UV-MS	UB 0,42 min (pos. 813,851) [$\mu\text{g}/\text{V}$]	6,81 – 42,22	n.b.	5,98 – 37,04
GMW_{max.} [mg/Glasvial] (GMGW = 0,18 mg)		0,080	0,000	0,050

6.3.1.4 Toxikologische Beurteilung der mit Wasser befüllten Gefäße

Für eine toxikologische Beurteilung der Migrationsprofile der Behältnisse wurde für jeden Migrationsstoff ausschließlich die maximale migrierte Konzentration bewertet. Für Stoffe, bei denen die Konzentration in Abhängigkeit von der Lagerungszeit zunahm, war dies der Wert nach sechs bzw. acht Monaten, für Stoffe, deren Konzentration zeitabhängig abnahm, war dies der Wert nach Sterilisation. Für einen Vergleich mit Grenzwerten aus der Literatur wurde vorausgesetzt, dass es sich bei dem eingesetzten Füllvolumen um die maximale Einmalgabe handelt. Eine ausführliche Darstellung der zu beurteilenden Konzentrationen befindet sich in Tabelle 65.

Tabelle 65 Zusammenfassung der Migrationsprofile aller Behältnisse (Beh.) befüllt mit Wasser; t-But = tert-Butanol, EB = Ethylbenzen, m-Xyl = m-Xylen, o-Xyl = o-Xylen, UB = Unbekannte, KK = Kunststoffkartusche, GK = Glaskartusche, GV = Glasvial, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

	KK A	KK B	KK C	KK D	GK	GVA	GVB	GVC
t-But [µg/Beh.]	38,55 ± 1,49	5,64 ± 0,52	< 1,5	< 1,5	4,00 ± 0, 20	< 1,5	< 1,5	< 1,5
BHT [µg/ Beh.]	1,80 ± 0,15	6,12 ± 0,96	5,3 ± 0,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ
EB [µg/ Beh.]	-	-	-	-	27,30 ± 0,20	-	-	-
m-Xyl [µg/ Beh.]	-	-	-	-	62,70 ± 0, 60	-	-	-
o-Xyl [µg/ Beh.]	-	-	-	-	23,30 ± 0, 30	-	-	-
Anzahl UB	22	18	7	17	18	11	13	12
GMGW [mg/ Beh.]	9	2,4	6	2,4	6	0,6	0,6	0,18
GMW [mg/ Beh.]	1,531	0,386	0,088	0,453	1,521	0,129	0,040	0,047

Wie dieser Tabelle zu entnehmen, war in allen Behältnissen t-Butanol als Migrationsstoff gefunden worden. In fünf von acht Behältnissen lag die Konzentration unterhalb des TTC, also $c < 1,5 \mu\text{g}$. Die LD_{50} (mittlere Letale Dosis = Dosis, bei der 50 % der beobachteten Population sterben) für die orale Aufnahme in Ratten beträgt 3,5 g/kg, bei einer kontinuierlichen Aufnahme über das Trinkwasser über 90 Tage [94]. Die LD_{50} für Mäuse bei intraperitonealer Injektion beträgt 0,441 g/kg. Bei Betrachtung der Konzentrationen, die pro Patient bei einmaliger Applikation aufgenommen werden, ist zu erkennen, dass selbst im Falle der Kunststoffkartusche A mit einer $c_{\text{t-Butanol}} = 38,55 \pm 1,49 \mu\text{g}$ die Exposition viel geringer ist, als die LD_{50} dieser Substanz. Aus diesem Grund wurde t-Butanol in dieser Konzentration als toxikologisch unbedenklich eingeschätzt.

Des Weiteren konnte in allen Behältnissen, außer dem Glasvial B, BHT als Migrationsstoff detektiert werden, wobei eine Quantifizierung nur bei den Kunststoffkartuschen A-C möglich war. In allen anderen Fällen lag die Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze, ist also kleiner als 3 µg. Die LD_{50} für die orale Aufnahme in Ratten liegt für BHT bei 0,890 g/kg [95]. Zusätzlich befindet sich dieses Antioxidans mit einer maximalen Konzentration von 3 mg/kg

im Anhang III/B der Kunststoffrichtlinie. Dies bedeutet, dass BHT in diese Richtlinie aufgenommen werden soll, eine abschließende Beurteilung jedoch noch aussteht. Laut OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) wird BHT nicht als genotoxisch eingestuft, eine Genotoxizität kann jedoch nicht ausgeschlossen werden [96]. Aus diesem Grund empfiehlt die OECD einen Grenzwert von 100 mg/kg. Die Konzentrationen an migriertem BHT lag für alle untersuchten Behältnisse zu jedem Analysezeitpunkt unterhalb dieses Wertes, weshalb nach OECD kein toxikologisches Risiko vorliegt.

In der Glaskartusche wurden zusätzlich drei Benzol-Derivate gefunden. Bei diesen Derivaten handelt es sich um Ethylbenzen, m-Xylen und o-Xylen, wobei Ethylbenzen nach IARC als 2b-Stoff gruppiert wird, eine Kanzerogenität somit möglich sein kann. Beide Xylene werden in Gruppe 3 eingestuft, wonach eine kanzerogene Wirkung nach momentaner Datenlage nicht ausgeschlossen werden kann. Bei diesen Benzolderivaten handelt es sich um Restlösemittel, welche auch in der entsprechenden *ICH-Richtlinie Q3C Verunreinigungen: Richtlinie für Restlösemittel* [45] aufgeführt werden. Sie werden der Klasse zwei zugeordnet, in der sich Restlösemittel befinden, für die, aufgrund ihrer Toxizität, ein Grenzwert errechnet wurde. Demnach darf der PDE (Permitted Daily Exposure) an Xylen nicht höher als 21,7 mg/d sein. Unter dem Begriff Xylen wird in diesem Fall die Summe aus 60 % m-Xylen (PDE = 13,02 mg/d), 14 % p-Xylen (PDE = 3,04 mg/d), 9 % o-Xylen (PDE = 1,95 mg/d) und 17 % Ethylbenzen (PDE = 3,69 mg/d) zusammengefasst. Der Tabelle 61 ist zu entnehmen, dass zu jedem Analysezeitpunkt die Konzentration der Benzolderivate unter dem vorgeschriebenen Grenzwert lag. Da für diese Substanzen, für die ein genotoxisches Potential nicht ausgeschlossen werden kann, offizielle Grenzwerte existieren, findet die *EMEA-Richtlinie zu Grenzwerten von genotoxischen Verunreinigungen* [48] keine Anwendung.

Neben den bekannten Migrationsstoffen wurden in jedem Behältnis zusätzliche Unbekannte gefunden, deren Konzentrationsbereiche den durch das PQRI empfohlenen $QT = 5 \mu\text{g/d}$ überstiegen. wonach diese Handlungsempfehlung eine Identifizierung der Unbekannten vorsieht. In den momentan geltenden pharmazeutischen Richtlinien wird jedoch keine Lösung über den Umgang mit solchen Unbekannten vorgeschlagen. Ist aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten eine Identifizierung nicht möglich, kann gemäß der FDA auf geltende Vorschriften im Lebensmittelbereich zurückgegriffen werden [23].

Um die Konzentrationsbereiche dieser Stoffe toxikologisch einschätzen zu können, wurde Bezug auf die Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG genommen. Dort wurde ein Gesamtmigrationsgrenzwert (GMGW) von 60 mg/kg Lebensmittel festgelegt, der nicht überschritten werden darf. Alle GMGW der jeweiligen Behältnisse sind ebenfalls in Tabelle 65 aufgeführt. Zusätzlich kann der Gesamtmigrationswert (GMW) für jedes Behältnis dieser Tabelle entnommen werden. Dieser fasst die Konzentrationen aller migrierten Stoffe zusammen. Konnten Migrationsstoffe wegen ihrer geringen Peakfläche nicht quantifiziert werden, so wurde mit dem LOQ des Standards gerechnet, welcher den kleineren Response für die entsprechende Methode hatte. Beim Vergleich dieser Grenzwerte mit den Gesamtmigrationswerten ergab sich kein toxikologisches Risiko bei oraler Anwendung.

Da es für die parenterale Applikation bis heute keine Referenzwerte gibt, kann sich nur auf diesen Grenzwert bezogen werden.

6.3.2 Kontrastmittel als Füllgut - Ergebnisse

6.3.2.1 Kunststoffkartuschen

In Tabelle 66 ist das Migrationsprofil der **Kunststoffkartusche A**, befüllt mit Kontrastmittel, abgebildet. Bereits nach der Sterilisation wurde t-Butanol detektiert, die Konzentration lag im mittleren ppb-Bereich und sank nach achtmonatiger Lagerung auf fast 50 % des Wertes nach Sterilisation. Auch BHT wurde bereits nach der Sterilisation identifiziert. Die Konzentration nach dreimonatiger Lagerung veränderte sich kaum. Nach sechs Monaten sank diese auf ca. 50 % des Startwertes nach Sterilisation.

Die mithilfe der entwickelten Methoden quantifizierten unbekanntem Signale wiesen Konzentrationsbereiche oberhalb des TTC ($c = 1,5 \mu\text{g}$) bzw. QT ($c = 5 \mu\text{g}$) auf.

Eine Unbekannte bei $t_R = 5,70 \text{ min}$ wurde im *UPLC-UV*-Chromatogramm ($\lambda = 220 \text{ nm}$) sichtbar, eine Quantifizierung konnte jedoch nicht vorgenommen werden, da aufgrund von Matrixeffekten eine Aufnahme von externen Kalibriergeraden im Konzentrationsbereich von 10 bis 1000 $\mu\text{g/l}$ nicht möglich war. Der GMW war zu keinem Zeitpunkt der Migrationsstudie größer als der GMGW von 9 mg.

Tabelle 66 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche A befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. q. = nicht quantifizierbar, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g/K}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 19,41 min [$\mu\text{g/K}$] UB 46,12 min [$\mu\text{g/K}$]	$41,85 \pm 2,40$ + 1 - -	n.b. + 1 1,50 – 16,80 5,10 – 60,75	$22,20 \pm 0,75$ + 3 < LOQ 0,60 – 32,70
GC-MS (SIM) GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g/K}$] UB c < LOQ [Anzahl] UB 6,90 min [$\mu\text{g/K}$] UB 8,20 min [$\mu\text{g/K}$] UB 9,80 min [$\mu\text{g/K}$] UB 17,80 min [$\mu\text{g/K}$] -	$11,25 \pm 0,00$ 7 11,55 – 50,55 < 1,5 14,25 – 61,80 < LOQ -	$10,20 \pm 0,15$ 7 9,30 – 40,65 < LOQ 12,00 – 52,20 - -	$5,10 \pm 0,15$ 5 7,80 – 34,20 < LOQ 10,65 – 46,35 < 1,5 -
HPLC-UV UPLC-UV-MS	- UB 5,70 min (UV) [$\mu\text{g/K}$]	- n.q.	- n.b.	- -
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 9 mg)		0,188	0,202	0,200

Das Migrationsprofil der **Kunststoffkartusche B** ist in Tabelle 67 abgebildet. Nach Sterilisation der Kartuschen konnten t-Butanol, Ethylbenzen, m-Xylen, o-Xylen und BHT identifiziert werden. Die Konzentrationen dieser Migrationsstoffe nahmen in Abhängigkeit von der Zeit ab. Für Ethylbenzen und o-Xylen waren die Konzentrationen nach sechs Monaten Lagerung nicht mehr quantifizierbar.

Die Unbekannten, welche durch die gaschromatographischen Methoden quantifiziert wurden, weisen, bis auf eine Ausnahme (HS-GC-FID, $t_R = 19,13$ min), Konzentrationsbereiche unterhalb des TTC bzw. des QT auf. Mittels flüssigchromatographischer Methoden wurden keine Migrationsstoffe detektiert. Der GMGW von 2,4 mg wurde zu keinem Analysezeitpunkt überschritten.

Tabelle 67 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche B befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 19,13 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] Ethylbenzen [$\mu\text{g}/\text{K}$] m-Xylen [$\mu\text{g}/\text{K}$] o-Xylen [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 46,12 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	5,16 \pm 0,96 + - - < 1,5 < 1,5 < 1,5 -	n.b. + 1 - < 1,5 < 1,5 < 1,5 0,36 – 4,16	3,88 \pm 0,68 + 2 < LOQ – 8,32 < LOQ < 1,5 < LOQ < LOQ
GC-MS (SIM)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB c < LOQ [Anzahl] UB 6,90 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] M: 57, 59, 69, 89, 41, 43 UB 9,50 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 9,80 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] M: 69, 111, 43, 59, 55, UB 13,17 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] M: 165, 57, 180, 43, 137 UB 16,80 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] M: 219, 41, 191, 234 UB 17,80 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 22,67 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	14,44 \pm 0,24 4 1,08 – 4,92 < 1,5 0,76 – 3,56 < 1,5 < LOQ < 1,5 < 1,5	12,24 \pm 0,36 3 0,52 – 2,52 < 1,5 0,72 – 3,32 < 1,5 < 1,5 - < 1,5	3,52 \pm 0,04 4 0,48 – 2,32 < 1,5 0,56 – 2,68 < 1,5 < LOQ < LOQ
GC-MS (Scan)	UB 11,90 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] M: 149, 121, 164 UB 14,37 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] M: 153, 196, 57, 43, 111	+ + +	- - +	- - +
HPLC-UV UPLC-UV-MS	- -	- -	- -	- -
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 2,4 mg)		0,032	0,029	0,035

Das Migrationsprofil der **Kunststoffkartusche C** befindet sich in Tabelle 68. Ausschließlich BHT konnte als bekannter Migrationsstoff identifiziert werden. Die höchste Konzentration wurde nach dreimonatiger Lagerung festgestellt. Nach weiteren drei Monaten Lagerung lag die Konzentration unterhalb des LOQ.

Die mittels analytischer Methoden detektierten Unbekannten wiesen Konzentrationsbereiche unterhalb des LOQ auf. Nur für ein Signal (GC-MS, $t_R = 14,80$ min) wurde der QT überschritten. Mittels flüssigchromatographischer Analysemethoden konnten keine Migrationsstoffe festgestellt werden. Der GMGW von 6 mg wurde zu keinem Zeitpunkt der Migrationsstudie überschritten.

Tabelle 68 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche C befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	-	-	n.b.	-
HS-GC-FID	-	-	-	-
GC-MS	BHT [$\mu\text{g/K}$]	< 1,5	$1,80 \pm 0,10$	< LOQ
	UB c < LOQ [Anzahl]	2	2	2
	UB 14,80 min [$\mu\text{g/K}$] M: 71, 43, 56, 111	3,60 – 16,20	0,4 – 2,20	2,10 – 9,70
GC-MS (Scan)	UB 17,80 min [$\mu\text{g/K}$]	< 1,5	-	-
	-	-	-	-
HPLC-UV	-	-	-	-
UPLC-UV-MS	-	-	-	-
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 6 mg)		0,019	0,005	0,011

Tabelle 69 bildet das Migrationsprofil der **Kunststoffkartusche D** ab. Nach Sterilisation konnten geringe Konzentrationen an BHT in der Kartusche gefunden werden. nach drei- und sechsmonatiger Lagerung lagen die Konzentrationen unterhalb des LOQ.

Die Konzentrationsbereiche der Signale mit ungeklärter Identität überschritten den QT nicht. Mittels flüssigchromatographischer Methoden wurden keine Migrationsstoffe detektiert. Zu keinem Zeitpunkt der Studie wurde der GMGW von 2,4 mg überschritten.

Tabelle 69 Migrationsprofil der Kunststoffkartusche D befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	-	-	n.b.	-
HS-GC-FID	-	-	-	-
GC-MS (SIM)	BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$]	< 1,5	< LOQ	< LOQ
	UB 13,20 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	UB 13,30 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	< 1,5	0,40 – 1,92	0,44 – 2,08
	M: 68, 111, 41, 95, 149,			
	UB 13,50 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	0,32 – 1,60	0,44 – 2,20	0,48 – 2,36
	M: 68, 111, 41, 95, 149,			
	UB 17,80 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	< 1,5	-	< LOQ
GC-MS (Scan)	-	-	-	-
HPLC-UV	-	-	-	-
UPLC-UV-MS	-	-	-	-
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 2,4 mg)		0,004	0,005	0,005

6.3.2.2 Glaskartusche

Das Migrationsprofil der **Glaskartusche** befindet sich in Tabelle 70. Während die Konzentration an t-Butanol nach der Sterilisation in der Kartusche $2,20 \pm 0,20 \mu\text{g}$ beträgt, wurde dieser Migrationsstoff nach sechsmonatiger Lagerung nicht detektiert. Die Analyse mittels HS-GC-FID ließ t-Butanol nach sechs Monaten zwar vermuten, der Verdacht wurde jedoch durch die Massenspektrometrie nicht bestätigt. Des Weiteren wurden die Benzolderivate Ethylbenzen, m-Xylen und o-Xylen nach der Sterilisation detektiert. Während nach dreimonatiger Lagerung der Kartuschen die Konzentrationen der Benzolderivate zunahmen, kam es nach weiteren drei Monaten wieder zur Konzentrationsabnahme, wobei die Konzentration signifikant höher war als nach der Sterilisation. Die Migration der Benzolderivate wurde durch den Scan-Modus der GC-MS bestätigt. Außerdem konnten zu diesem Zeitpunkt die Silikonölderivate HMCTS und OMCTS identifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte für

HMCTS. Die Konzentration für OMCTS wurde durch Verwendung einer alten Kalibriergeraden abgeschätzt.

Die Konzentrationsbereiche der quantifizierten unbekanntem Signale überschritten den QT zum Teil erheblich, der GMGW von 6 mg wurde jedoch für jeden Zeitpunkt eingehalten.

Tabelle 70 Migrationsprofil der Glaskartusche befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, K = Kartusche, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{K}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 15,70 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 16,74 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 19,84 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 22,96 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] Ethylbenzen [$\mu\text{g}/\text{K}$] m-Xylen [$\mu\text{g}/\text{K}$] o-Xylen [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 43,56 min [$\mu\text{g}/\text{K}$]	2,20 \pm 0,20 + - - - - 6,50 \pm 0,30 21,40 \pm 1,50 8,20 \pm 0,60 -	n.b. + 1 1,20 - 13,50 1,80 - 20,90 <LOQ - 8,20 1,10 - 13,50 36,80 \pm 1,30 129,20 \pm 5,30 50,80 \pm 2,30 1,40 - 16,20	- + 2 - <LOQ - 27,00 <LOQ - 9,20 <LOQ - 15,50 20,50 \pm 1,70 112,7 \pm 7,30 43,00 \pm 1,50 1,40 - 16,20
GC-MS (SIM) GC-MS (Scan)	HMCTS [$\mu\text{g}/\text{K}$] OMCTS [$\mu\text{g}/\text{K}$] BHT [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB c < LOQ [Anzahl] UB 15,10 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 17,80 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] EB, mX, oX UB 14,37 min M: 153, 196, 57, 43, 111	4,50 \pm 2,40 3,00 \pm 1,60 1,80 \pm 0,2 3 <LOQ - 1,9 < 1,5 + +	- - 1,84 \pm 0,5 4 <LOQ - + +	- - < 1,5 7 - <LOQ + +
HPLC-UV UPLC-UV-MS	UB 10,95 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] UB 11,65 min [$\mu\text{g}/\text{K}$] -	2,40 - 19,00 6,40 - 53,60 -	5,10 - 46,70 18,80 - 163,80 -	9,40 - 76,10 29,40 - 238,70 -
GMW_{max.} [mg/Kartusche] (GMGW = 6 mg)		0,126	0,513	0,582

6.3.2.3 Glasvials

In Tabelle 71 ist das Migrationsprofil des Glasvials A abgebildet. Nach der Sterilisation des Vials konnte ausschließlich BHT identifiziert und quantifiziert werden. Die Maximalkonzentration dieses Migrationsstoffes war nach drei Monaten Lagerung erreicht. Nach weiteren drei Monaten war eine Abnahme der Konzentration zu verzeichnen. Alle weiteren migrierten Stoffe konnten nicht identifiziert werden. Mittels flüssigchromatographischer Methoden wurden keine Migrationsstoffe detektiert. Der GMGW von 0,6 mg wurde für jeden Zeitpunkt der Studie eingehalten.

Tabelle 71 Migrationsprofil des Glasvials A befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, V = Vial, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS HS-GC-FID	t-Butanol [$\mu\text{g}/\text{V}$] t-Butanol UB c < LOQ [Anzahl] UB 22,97 min [$\mu\text{g}/\text{V}$] UB 46,78 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	- - 1 - -	n.b. - 1 < 1,5 -	< 1,5 - 1 < LOQ 0,15 – 3,92
GC-MS GC-MS (Scan)	BHT [$\mu\text{g}/\text{V}$] UB c < LOQ [Anzahl] UB 13,20 min [$\mu\text{g}/\text{V}$] M: 165, 57, 180, 43, 137 UB 14,37 min [$\mu\text{g}/\text{V}$] M: 153, 196, 57, 43, 111	< 1,5 3 < 1,5 +	< 1,5 4 < LOQ +	< 1,5 6 < 1,5 +
HPLC-UV UPLC-UV-MS	- -	- -	- -	- -
GMW_{max.} [mg/Glasvial] (GMGW = 0,6 mg)		0,002	0,003	0,006

Tabelle 72 gibt einen Überblick über das Migrationsprofil des **Glasvials B**. Mittels *GC-MS* konnte BHT als Migrationsstoff identifiziert werden. Die Konzentration ist zu allen Analysezeitpunkten kleiner als der TTC. Weitere Signale, die mittels gaschromatographischer Metho-

den detektiert wurden, konnten nicht identifiziert werden. Die Konzentrationsbereiche überschritten den TTC bzw. QT nicht. Mittels flüssigchromatographischer Methoden wurden keine Migrationsstoffe detektiert. Zu keinem Analysezeitpunkt wurde der GMGW von 0,6 mg überschritten.

Tabelle 72 Migrationsprofil des Vials B befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, V = Vial, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	t-Butanol	-	n.b.	-
HS-GC-FID	t-Butanol	-	-	-
	UB c < LOQ [Anzahl]	4	10	9
	UB 33,84 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	0,14 – 1,59	< 1,5
	UB 44,62 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	0,22 – 2,57	0,03 – 1,96
GC-MS (SIM)	BHT [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	< 1,5	< 1,5
	UB c < LOQ [Anzahl]	4	6	5
	UB 9,80 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< LOQ	< 1,5	< 1,5
	UB 13,00 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	< 1,5	< 1,5
	M = 97, 57, 43, 69, 79, 107			
HPLC-UV	-	-	-	-
UPLC-UV-MS	-	-	-	-
GMW_{max.} [mg/Glasvial] (GMGW = 0,6 mg)		0,005	0,013	0,012

Tabelle 73 zeigt das Migrationsprofil des **Glasvials C**. Durch die *GC-MS* Analyse wurde nach drei- und sechsmonatiger Lagerung BHT identifiziert. Während die Konzentration nach drei Monaten unterhalb des LOQ lag, konnte BHT nach sechs Monaten quantifiziert werden. Die Konzentration lag unterhalb des TTC. Alle unbekanntes Signale der gaschromatographischen Methoden zeigten Konzentrationsbereiche unterhalb des TTC bzw. konnten nicht quantifiziert werden. Mittels HPLC und UPLC wurden keine Migrationsstoffe detektiert. Auch für Glasvial C wurde der GMGW von 0,18 mg nicht erreicht.

Tabelle 73 Migrationsprofil des Vials C befüllt mit Kontrastmittel; + = identifiziert, aber nicht quantifiziert, < LOQ = identifiziert, aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, V = Vial, UB = Unbekannte, n. b. = nicht bestimmt, GMGW = Gesamtmigrationsgrenzwert, GMW = Gesamtmigrationswert

Methoden	Migrationsstoffe	Nach Sterilisation	Nach 3 Monaten	Nach 6 bzw. 8 Monaten
HS-GC-MS	t-Butanol	-	n.b.	-
HS-GC-FID	t-Butanol	-	-	-
	UB c < LOQ [Anzahl]	1	2	4
	UB 16,12 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	< LOQ	< LOQ
	UB 22,97 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< 1,5	< LOQ
	UB 34,54 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< 1,5	< LOQ
	UB 44,63 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< LOQ	< 1,5	< 1,5
	UB 45,72 min [$\mu\text{g}/\text{V}$]	< 1,5	-	-
GC-MS	BHT [$\mu\text{g}/\text{V}$]	-	< LOQ	< 1,5
	UB c < LOQ [Anzahl]	2	6	5
	UB 14,80 min [$\mu\text{g}/\text{V}$] M = 71, 43, 111, 159, 173, 243	0,897 – 3,855	< 1,5	< 1,5
HPLC-UV	-	-	-	-
UPLC-UV-MS	-	-	-	-
GMW_{max.} [mg/Glasvial] (GMGW = 0,18 mg)		0,005	0,002	0,003

6.3.2.4 Toxikologische Beurteilung der mit Kontrastmittel befüllten Gefäße

Für eine toxikologische Beurteilung der Migrationsprofile der Behältnisse wurde für jeden Migrationsstoff ausschließlich die maximale migrierte Konzentration bewertet. Für einen Vergleich mit Grenzwerten aus der Literatur wurde vorausgesetzt, dass es sich bei dem eingesetzten Füllvolumen um die maximale Einmalgabe handelt. Eine ausführliche Darstellung der zu beurteilenden Konzentrationen befindet sich in Tabelle 74.

Tabelle 74 Zusammenfassung der Migrationsprofile aller Behältnisse (Beh.) befüllt mit Kontrastmittel; t-But = tert-Butanol, EB = Ethylbenzen, m-Xyl = m-Xylen, o-Xyl = o-Xylen, UB = Unbekannte, KK = Kunststoffkartusche, GK = Glaskartusche, GV = Glasvial, GMGW = Gesamt migrationsgrenzwert, GMW = Gesamt migrationswert

	KK A	KK B	KK C	KK D	GK	GVA	GV B	GV C
t-But [µg/Beh.]	41,85 ± 2,40	5,16 ± 0,96	-	-	2,20 ± 0,20	< 1,5	-	-
BHT [µg/Beh.]	11,25 ± 0,00	14,44 ± 0,24	1,80 ± 0,10	< 1,5	1,84 ± 0,50	< 1,5	< 1,5	< 1,5
EB [µg/Beh.]	-	< 1,5	-	-	36,80 ± 1,30	-	-	-
m-Xyl [µg/Beh.]	-	< 1,5	-	-	129,20 ± 5,30	-	-	-
o-Xyl [µg/Beh.]	-	< 1,5	-	-	50,80 ± 2,30	-	-	-
HMCTS [µg/Beh.]	-	-	-	-	3,00 ± 1,60	-	-	-
OMCTS [µg/Beh.]	-	-	-	-	4,50 ± 2,40	-	-	-
Anzahl UB	18	19	4	4	18	11	22	16
GMGW [mg/Beh.]	9	2,4	6	2,4	6	0,6	0,6	0,18
GMW [mg/Beh.]	0,202	0,035	0,019	0,012	0,582	0,006	0,002	0,009

Wie dieser Tabelle zu entnehmen, ist in allen Behältnissen BHT als Migrationsstoff gefunden worden. Die Maximalkonzentrationen sind gefäßabhängig sehr unterschiedlich. So liegt die Konzentration bei vier von acht Behältnissen unterhalb des TTC, also $c < 1,5 \mu\text{g/d}$. Wie bereits in Kapitel 6.3.1.4 beschrieben, kann ein genotoxisches Potential für BHT nicht ausgeschlossen werden, weshalb die OECD einen Grenzwert von 100 mg/kg für als maximale tägliche Aufnahme festlegt [96]. Dieser Wert wurde für kein Behältnis zu keinem Analysezeitpunkt erreicht, ein toxikologisches Risiko, ausgehend von BHT als Migrationsstoff, lag somit nicht vor.

Zusätzlich wurden in den Kunststoffkartuschen A und B, der Glaskartusche und dem Glasvial A t-Butanol detektiert. Gemäß den Ausführungen in Kapitel 6.3.1.4 kann die Konzentration an t-Butanol in allen Behältnissen nach dem Vergleich mit der LD_{50} bei oraler

Aufnahme bzw. intraperitonealer Injektion als toxikologisch unbedenklich eingeschätzt werden.

Auch in das Kontrastmittel migrierten die drei Benzol-Derivate Ethylbenzen (IARC Gruppe 2b), m-Xylen und o-Xylen (IARC Gruppe 3) aus der Glaskartusche. Ein Vergleich der maximalen Konzentrationen in der Glaskartusche (siehe Tabelle 74) mit den Grenzwerten (PDE-Werte) der *ICH-Richtlinie Q3C Verunreinigungen: Richtlinie für Restlösemittel* [45] zeigte kein toxikologisches Risiko für m-Xylen (PDE = 13,02 mg/d), o-Xylen (PDE = 1,95 mg/d) und Ethylbenzen (PDE = 3,69 mg/d). Für jedes dieser Benzol-Derivate wurde der vorgeschriebene PDE nicht überschritten.

Außerdem migrierten Silikonölderivate (OMCTS, HMCTS) in das Kontrastmittel aus der Glaskartusche. OMCTS wird nicht als genotoxisch eingestuft, Tests zur Kanzerogenität liegen nicht vor. In Konzentrationen $c \geq 100$ mg/l wurde im Tierversuch eine fertilitätsmindernde Wirkung festgestellt [97]. Mit $4,50 \pm 2,40$ µg/100 ml wird dieser Wert jedoch nicht erreicht. Für HMCTS liegen keine Angaben zur toxikologischen Einschätzung vor [98]. Eine Einstufung als genotoxische Substanz ist bis heute nicht erfolgt, weshalb eine Orientierung der migrierten Konzentration am QT erfolgte. Dieser wurde während der Studie nicht erreicht, weshalb nach heutigem Wissensstand kein toxikologisches Risiko besteht.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Migrationsprofile war festzustellen, dass zahlreiche unbekannte Migrationsstoffe detektiert wurden. Die errechneten Konzentrationsbereiche für diese Stoffe lagen meist unterhalb des LOQ oder waren kleiner als der TTC oder der durch das PQRI empfohlene QT. In einigen Fällen wurde letzterer jedoch überschritten, weshalb eine Identifizierung notwendig wird, was jedoch durch die zur Verfügung stehenden technischen Voraussetzungen nicht möglich war. Wie bereits in Kapitel 6.3.1.4 diskutiert, kann für eine toxikologische Beurteilung unbekannter Migrationsstoffe auf geltende Vorschriften im Lebensmittelbereich zurückgegriffen werden. In Tabelle 74 sind für jedes Behältnis die Gesamtmigrationsgrenzwerte (60 mg/kg Lebensmittel) aufgeführt. Zusätzlich kann der Gesamtmigrationswert für jedes Behältnis dieser Tabelle entnommen werden. Dieser fasst die Konzentrationen aller migrierten Stoffe zusammen. Konnten Migrationsstoffe wegen ihrer geringen Peakflächen nicht quantifiziert werden, so wurde mit dem LOQ des Standards gerechnet, welcher den kleineren Response für die entsprechende Methode hat.

Beim Vergleich dieser Grenzwerte mit den Gesamtmigrationswerten ergibt sich kein toxikologisches Risiko bei oraler Anwendung.

Da es für die parenterale Applikation zum momentanen Zeitpunkt keine Referenzwerte gibt, kann sich nur auf diesen Grenzwert bezogen werden.

6.3.3 Diskussion und Zusammenfassung

Es erfolgt eine unterteilende Betrachtung in bekannte und unbekannte Migrationsstoffe sowie den Einfluss des PTFE-Coatings.

6.3.3.1 Betrachtung der bekannten Migrationsstoffe

t-Butanol

Aus allen in dieser Arbeit untersuchten Behältnissen migrierte t-Butanol während der Sterilisation. Dieser tertiäre Alkohol wird zur Synthese von t-Butylphenolen, wie BHT eingesetzt, kann jedoch auch Abbauprodukt von Irganox 1010 oder des Radikalstarters Di-tert-butylperoxid sein. Während die Konzentration an t-Butanol in den Kunststoffkartuschen A, B und C, sowie im Glasvial B zeitabhängig abnahm, war für die Kunststoffkartusche D, die Glaskartusche und die Glasvials A und C eine zeitabhängige Zunahme der t-Butanol-Konzentration zu verzeichnen. Diese Konzentrationsänderungen standen weder im Zusammenhang mit Füllvolumina oder Materialeinsatz noch schien die Höhe der Ausgangskonzentration (nach Sterilisation) Einfluss auf die Konzentrationsänderungen zu haben. Eine Abnahme der Konzentration kann durch Adsorption an die Gefäßwand oder Abbau des Alkohols erklärt werden. Eine Konzentrationszunahme kann durch zeitabhängige Migration aus den Kunststoffteilen begründet werden. Eine einheitliche Aussage zum Migrationsverhalten von t-Butanol ließ sich auf Grundlage dieser Daten nicht treffen. Gleiches galt für die mit Kontrastmittel gefüllten Behältnisse. Während die Konzentrationen an t-Butanol in den Kunststoffkartuschen A und B, sowie der Glaskartusche zeitabhängig abnahmen, konnte in Glasvial A erst nach sechs Monaten Lagerung ein Signal detektiert werden. In allen anderen Behältnissen wurde der tertiäre Alkohol nicht gefunden. Beim Vergleich der mit Wasser gefüllten Behältnisse mit denen, welche mit Kontrastmittel gefüllt waren, war festzustellen, dass beide

Flüssigkeiten ein ähnliches Extraktionsverhalten für t-Butanol während der Sterilisation aufweisen. Dies wurde besonders deutlich bei den Kunststoffkartuschen A und B sowie bei der Glaskartusche. Die migrierten Konzentrationen bewegten sich in gleichen Größenordnungen. In den Kunststoffkartuschen C und D, sowie in den Glasvials B und C konnte, im Gegensatz zu den mit Wasser befüllten Behältnissen, kein t-Butanol gefunden werden. Die in Wasser gefundenen Konzentrationen waren jedoch sehr gering, so dass eine mögliche Erklärung für das Fehlen im Kontrastmittel eine zu hohe Nachweisgrenze von t-Butanol im Kontrastmittel ist. Es wäre also möglich, dass auch in diese Behältnisse t-Butanol migrierte, jedoch nicht detektiert werden konnte. Da die HS-GC-MS Methode zur Bestimmung von t-Butanol nicht validiert wurde, kann diese Aussage nur vermutet werden.

BHT

BHT, ein weit verbreitetes Antioxidans in Elastomeren, wurde in allen Behältnissen, außer im Glasvial B, detektiert. In den Kunststoffkartuschen A, B und C konnte eine zeitabhängige Konzentrationszunahme beobachtet werden. Eine Quantifizierung des Migrationsstoffes in Kunststoffkartusche D, Glaskartusche und Glasvial A und C wurde aufgrund des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses nicht durchgeführt. Die migrierten BHT-Konzentrationen in den mit Kontrastmittel gefüllten Behältnissen waren signifikant höher. Für alle Kartuschen konnte eine zeitabhängige Konzentrationsabnahme beobachtet werden. Als Grund hierfür wurde die Adsorption an die Gefäßwand bzw. der Abbau des Antioxidans angenommen. Bei hohen Ausgangskonzentrationen (nach Sterilisation) schienen diese Faktoren die zeitabhängige Migration zu überwiegen. Nur bei Glasvial B und C wurde eine Konzentrationszunahme nach sechsmonatiger Lagerung beobachtet, wobei die Ausgangskonzentration (nach Sterilisation) sehr gering war bzw. BHT nach Sterilisation nicht detektiert worden ist.

Benzolderivate

In der Glaskartusche konnten nach Sterilisation und Lagerung die Benzolderivate Ethylbenzen, m-Xylen und o-Xylen gemessen werden, deren Konzentrationen während der Lagerung abnahmen. Als Grund können Adsorption an die Gefäßwand oder der Abbau dieser Benzole diskutiert werden. Diese Restlösemittel aus der Gummierstellung wurden auch in der mit Kontrastmittel gefüllten Kunststoffkartusche B und der Glaskartusche gefunden. Die Ausgangskonzentrationen (nach Sterilisation) waren jedoch signifikant kleiner und erreichten

nach dreimonatiger Lagerung ihr Maximum, welches das Maximum der mit Wasser gefüllten Glaskartuschen nach Sterilisation signifikant überstieg. Das Kontrastmittel wies für diese Benzolderivate ein größeres zeitabhängiges Extraktionspotential auf. Erst nach weiteren drei Monaten überwiegte Adsorption und Abbau die Migration aus dem Behältnis.

Silikonölderivate

Während in den mit Wasser gefüllten Glaskartuschen keine Silikonölderivate gefunden werden konnten, wurden in den mit Kontrastmittel gefüllten Glaskartuschen HMCTS und OMCTS detektiert. Diese Stoffe wurden jedoch ausschließlich nach der Sterilisation gefunden, nach drei- und sechsmonatiger Lagerung erfolgte mit großer Wahrscheinlichkeit eine Adsorption an die Gefäßwand.

Toxikologische Bewertung

Nach Einschätzung von Toxikologen können die migrierten Konzentrationen von t-Butanol, BHT, Ethylbenzen, m-Xylen und o-Xylen sowie der Silikonölderivate als toxikologisch unbedenklich eingestuft werden.

6.3.3.2 Betrachtung der unbekanntenen Migrationsstoffe

Die Migrationsprofile der einzelnen Behältnisse zeigten neben bekannten Migrationsstoffen eine Vielzahl von Unbekannten. Vor allem unter Zuhilfenahme der HS-GC-FID wurden sowohl in Wasser als auch im Kontrastmittel zahlreiche unbekannte Stoffe detektiert. Mit diesem Analyseverfahren werden leicht flüchtige Substanzen bestimmt. Bei den in dieser Arbeit detektierten Signalen könnte es sich also um Restlösemittel [99] der Polymerherstellung handeln, oder um Restmonomere [100] und Abbauprodukte mit niedrigem Siedepunkt des Polymermaterials oder der eingesetzten Kunststoffadditive.

Bei den mittels LC-UV detektierten Migrationsstoffen handelte es sich solche, die durch ihre chromophore Struktur UV-aktiv sind. Dies könnten Abbauprodukte phenolischer Kunststoffadditive, aber auch langkettige Kohlenwasserstoffe der Polymere mit konjugierten Doppelbindungen sein. Im Kontrastmittel wurden mittels LC-UV keine unbekanntenen Migrationsstoffe detektiert, was ursächlich an der Matrix lag, welche zur Überladung der Säule führte und aus diesem Grund Migrationsstoffe im Spuren- und Ultraspurenbereich überlagert wurden.

Dies spiegelte sich auch in den hohen Nachweisgrenzen der validierten Beispielsubstanzen wider.

Die entwickelte UPLC-UV-MS Methode stellte sich nicht als gewinnbringendes Tool für die Erstellung der Migrationsprofile dar.

Da für parenterale Administration derzeit keine Grenzwerte zur Verfügung stehen, können die Gesamtmigrationsgrenzwerte aus dem Lebensmittelbereich laut FDA [23] zu Rate gezogen werden. Unter Berücksichtigung des Gesamtmigrationsgrenzwertes der Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG konnte die Gesamtkonzentration an unbekanntem Migrationsstoffen bei oraler Applikation für jedes Behältnis als toxikologisch unbedenklich eingestuft werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Unbekannten um Stoffe mit genotoxischem oder kanzerogenem Potential handelt. Aus diesem Grund wäre bei Anstrengung einer Zulassung als Primärpackmittel eine Identifizierung dieser Signale notwendig.

6.3.3.3 Betrachtung des Einflusses des PTFE-Coatings

Bei PTFE handelt es sich um ein nahezu unverzweigtes, linear aufgebautes, teilkristallines Polymer aus Fluor und Kohlenstoff. Durch die sehr starke Fluor-Kohlenstoffbindung von 504 kJ/mol weist es eine sehr hohe chemische Beständigkeit auf. Ziel eines solchen Überzuges soll eine Verringerung der Migration von Kunststoffbestandteilen in das Arzneimittel sein [30]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Einfluss anhand eines Kolbenstopfens (Kunststoffkartusche C) und eines Vialstopfens (Glasvial C) untersucht. Da es nicht möglich war identische Materialien in identischer Größe gecoatet und nicht gecoatet zu beziehen, mussten Migrationsprofile unterschiedlicher Elastomere verschiedener Größen, die unterschiedliche Füllvolumina mit sich zogen, verglichen werden. Der Vergleich sollte lediglich Tendenzen aufzeigen und sich ausschließlich auf die hier untersuchten Materialien beziehen.

Während die Kunststoffteile der Kunststoffkartuschen (KK) A, B und D nicht überzogen waren, war der Kolbenstopfen der Kunststoffkartusche C mit einem PTFE-Coating an der produktberührenden Fläche versehen. Beim Vergleich der Migrationsprofile war sowohl ein qualitativer als auch quantitativer Unterschied zwischen den Kartuschen ohne PTFE-Coating und der mit PTFE-Coating zu verzeichnen. Während aus KKA 22, aus KKB 20 und aus KKD 19

Stoffe migrierten, konnten in KKC nur 9 Migrationsstoffe gefunden werden. Zusätzlich war der Gesamtmigrationswert der KKC viel geringer als der der anderen Kunststoffkartuschen. Dies spricht für eine besondere Eignung des Stopfenmaterials C (chlorierter Butylkautschuk C) als Primärpackmittel hinsichtlich des Migrationsprofils und der damit verbundenen toxikologischen Unbedenklichkeit. Diese Aussage wurde durch die mit Kontrastmittel befüllten Behältnisse bekräftigt. Eine Ausnahme stellte KKD dar. Die Migrationsprofile der KKC und KKD (COP Zylinder, bromierter Butylkautschuk-Stopfen) unterschieden sich hinsichtlich Anzahl an unbekanntem Substanzen nicht, die migrierte Konzentration an BHT als auch der GMW der KKD waren sogar geringer.

Neben Stopfenmaterial C wurde ein weiterer chlorierter Butylkautschuk untersucht (Stopfen B). Beide Materialien unterschieden sich laut „potentieller Extraktivstoffliste“ der Hersteller im Wesentlichen durch den Zusatz unterschiedlicher Vulkanisationshilfsstoffe. Während Stopfenmaterial C DBATD zugesetzt wurde, kam bei Material B Schwefel zum Einsatz. Sowohl die Anzahl der Migrationsstoffe als auch die Höhe des Gesamtmigrationswertes waren für Stopfen B eindeutig höher als für Stopfen C (in Wasser und Kontrastmittel). Da sich beide Materialien sehr ähneln, konnte geschlossen werden, dass das PTFE-Coating die Migration von Kunststoffbestandteilen mindert.

Des Weiteren wurden die gecoatete (Glasvial C) und nicht gecoatete Variante (Glasvial B) des bromierten Butylkautschuks F (gecoateter Stopfen F_c) vergleichend untersucht.

Die Migrationsprofile von Vial B und C unterschieden sich hinsichtlich der migrierten Unbekannten qualitativ und quantitativ, wobei sich im Vial C mit gecoatetem Stopfen weniger Unbekannte wieder fanden. Auch die Konzentrationen an migriertem t-Butanol war hier geringer als in Vial B. Jedoch war es schwierig eine Aussage über den Einfluss des PTFE-Überzuges zu machen, da sich auch Füllvolumina und produktberührende Oberfläche des Stopfenmaterials wesentlich unterschieden. Dessen ungeachtet konnte festgestellt werden, dass bei Füllvolumina von kleiner gleich 10 ml die Konzentrationen an Migrationsstoffen sehr gering waren und in den meisten Fällen unterhalb des TTC lagen, weshalb ein toxikologisches Risiko ausgeschlossen werden konnte. Somit stellt ein PTFE-Film bei kleinen Füllvolumina keinen relevanten Zusatznutzen dar. Diese Aussage wurde durch die Untersuchungen der mit Kontrastmittel befüllten Vials unterstrichen.

6.3.4 Material, Geräte und Chemikalien

Die verwendeten Behältnisse und deren Zusammensetzungen sind Tabelle 53 zu entnehmen.

Für die Erstellung der Migrationsprofile kamen für die in den Kapiteln 3.2.4 und 3.3.4 beschriebenen Geräte und Chemikalien zum Einsatz.

7 KORRELATION ZWISCHEN EXTRAKTIONS- UND MIGRATIONSPROFILEN

Es ist unverzichtbar, die Verbindung zwischen Extraktivstoffen und Migrationsstoffen zu ermitteln, um die Wechselwirkungen zwischen Verpackungsmaterial und Füllgut verstehen, interpretieren, beurteilen, quantifizieren und kontrollieren zu können [39]. JENKE erarbeitete eine Klassifizierung der Verlinkung von Extraktiv- und Migrationsstoff (siehe Tabelle 75). Als *Level 1* bezeichnet er eine bestehende Ähnlichkeit zwischen beiden Stoffen, die für den Fachmann auf den ersten Blick erkenntlich ist. So ist zwischen dem Extraktivstoff DEHP und dem Migrationsstoff MEHP (*Mono-2-EthylHexylPhthalat*) eine strukturelle Verwandtschaft erkennbar. Bei genauerer Betrachtung kann diese Beziehung durch eine Hydrolysereaktion praktikabel beschrieben werden (*Level 2*). Ist es möglich, den chemischen Zusammenhang von Extraktiv- und Migrationsstoff vollständig darzustellen, dann entspricht die Verlinkung *Level 3*. Im erwähnten Beispiel ist dies durch die Kenntnis über die hydrolytische Abspaltung von 2-Ethyl-1-hexanol und dem dadurch entstehenden MEHP möglich. Kann dieser Zusammenhang auch mathematisch quantifiziert werden, so ist es eine Verlinkung des *Levels 4*.

Tabelle 75 Verlinkung von Extraktivstoffen (E) und Migrationsstoffen (M) nach Jenke [39]

Level der Verlinkung	Beschreibung
1	Strukturelle Ähnlichkeit zwischen E und M
2	Zusammenhang zwischen E und M kann durch einen Reaktionsvorschlag beschrieben werden
3	Vollständige Beschreibung des chemischen Zusammenhangs ist möglich
4	Mathematischer Quantifizierung zwischen E und M ist möglich

Beim Migrationsstoff *t-Butanol* handelt es sich um eine mögliche Verlinkung Level 3 zum Extraktivstoff BHT oder Irganox 1010. Es handelt sich hierbei um ein mögliches Abbauprodukt, verursacht durch Hydrolyse. *BHT*, *m-Xylen*, *o-Xylen*, *Ethylbenzen* und die *Silikonölderivate* migrierten aus dem Behältnis und wurden zuvor mit Hilfe verschiedener Extraktionsmedien extrahiert. Es handelt sich also um passive Migrationsstoffe (siehe Kapitel 2.2.2) mit einer Verlinkung des Levels 4. Demnach sollte ein quantitativer Zusammenhang zwischen

Extraktivstoff und Migrationsstoff laut JENKE zu finden sein. Da jedoch im Rahmen der Migrationsstudie andere Formlinge zum Einsatz kamen als bei der Extraktionsstudie ist eine quantitative Verlinkung schwierig aufzuzeigen. Denn der Formungsprozess der Rohmasse spielt eine entscheidende Rolle. Während die Verschlusskappen mittels Spritzgießen hergestellt wurden, wurden die Kolbenstopfen durch das Pressverfahren geformt. Beim Spritzguss wird die Rohmasse, meist in Form eines Granulates, durch den Extruder geleitet und dort unter Temperatureinwirkung verflüssigt und gut durchmischt. Anschließend wird die Masse in die entsprechende Form geleitet in der bei substratspezifischen Temperaturen die Vulkanisation und Formung erfolgt. Vorteil dieser Methode ist eine gleichmäßige Temperaturverteilung in der Rohmasse und eine sehr gute Durchmischung und dadurch gleichmäßige Verteilung der Kunststoffadditive. Außerdem ist dieser Prozess sehr zeitsparend.

Beim Pressen wird ein Elastomer-Rohling unter Einwirkung hoher Temperaturen und Druck (< 50 bar) in eine vorgefertigte Form gepresst, in der die Vulkanisation erfolgt. Nachteil dieses Herstellungsverfahrens ist eine schlechtere Durchmischung und ungleichmäßige Temperaturverteilung beim Formen. Dies fördert eine ungleichmäßige Verteilung der Kunststoffadditive und Anreicherung an der Gummioberfläche. Um einen quantitativen Vergleich zwischen Extraktions- und Migrationsprofil vornehmen zu können, müssen die gleichen Formlinge extrahiert werden, die später auch Bestandteil der Migrationsstudie sind. Die Verwendung des gleichen Materials allein lässt dies jedoch nicht zu. Die Auswirkungen des Formungsprozesses auf das Extraktionsprofil veranschaulicht Tabelle 76. Trotz der größeren extrahierten Oberfläche der Verschlusskappen sind die extrahierten Konzentrationen der Benzolderivate erheblich kleiner.

Tabelle 76 Vergleich der extrahierten und migrierten Konzentrationen in Wasser des chlorierten Butylkautschuks B; A_O = Oberfläche, A_P = produktberührende Oberfläche

Stoff	c Extraktivstoff H ₂ O	c Extraktivstoff H ₂ O
	Verschlusskappe $A_O = 49,0 \text{ cm}^2$	Kolbenstopfen $A_O = 36,1 \text{ cm}^2$
m-Xylen	0,031 ± 0,001 mg/l	0,215 ± 0,001 mg/l
o-Xylen	0,011 ± 0,001 mg/l	0,096 ± 0,000 mg/l
Ethylbenzen	0,006 ± 0,000 mg/l	0,082 ± 0,001 mg/l

Korrelation zwischen Extraktions- und Migrationsprofilen

Ein Vergleich unbekannter Extraktivstoffe mit unbekanntem Migrationsstoffen war nicht möglich, da anhand der erhaltenen Profile nicht sichergestellt werden konnte, dass es sich um gleiche Substanzen handelt.

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es Screeningmethoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, häufig vorkommende Kunststoffadditive, deren Abbauprodukte, Restlösemittel und Polymerabbau-
produkte zu identifizieren und zu quantifizieren. Nach einer umfangreichen Literaturrecher-
che und Kommunikation mit verschiedenen Kunststoff- und Elastomerherstellern wurde eine
Übersicht von häufig verwendeten Kunststoffadditiven erstellt, ergänzt durch oft migrierende
Abbauprodukte und Restlösemittel. Für leicht flüchtige Extraktiv- und Migrationsstoffe wur-
de eine HS-GC-FID Methode entwickelt, für flüchtige Stoffe eine GC-MS Methode mit Di-
rektinjektion. Für die Bestimmung nicht flüchtiger Substanzen kamen HPLC-UV und UPLC-
UV-MS zum Einsatz. Durch diese Screeningmethoden konnten 64 verschiedene potentielle
Extraktivstoffe, wie Antioxidantien, UV-Stabilisatoren, Weichmacher, Gleitmittel, Silikonöl-
derivate oder Restlösemittel identifiziert werden. Anhand ausgewählter Stoffe, welche einen
großen Bereich an physikalischen und chemischen Eigenschaften abbildeten, wurde gezeigt,
dass diese Methoden im Ultraspurenbereich validierbar sind. Lediglich das hochkonzentrierte
Kontrastmittel als Medium führte durch Überladung der Säule zu Schwierigkeiten bei der
Validierung der HPLC Methode. Dies kann durch eine Optimierung der Probenvorbereitung
umgangen werden. Die Extraktion der Probe mit apolaren Lösungsmitteln wäre eine Mög-
lichkeit.

Weiterhin wurden Extraktionsmethoden entwickelt, mit denen verschiedene Kunststoffe und
Elastomere hinsichtlich ihrer Extraktionsprofile durch wässrige Extraktion und Extraktion mit
Isopropanol und Hexan untersucht wurden. Häufig extrahierte Substanzen waren die Kunst-
stoffadditive Irganox 1010, BHT, Irganox 1076, MTBC, DEHP, Stearinsäure, Schwefel, sowie
Restlösemittel und Abbauprodukte, wie verschiedene tertiäre Alkohole (z.B. t-Butanol), 2-
Ethyl-1-hexanol, verschiedene Kohlenwasserstoffe (z.B. Dodecan, Tetradecan, Eicosan,
Tetracosan), Irgafos 168 oxid, Palmitin-, Myristinsäure, Benzolderivate und Silikonölderivate.

Diese Extraktionsprofile bilden eine wesentliche Grundlage für die Beurteilung der Eignung
eines Materials als Primärpackmittel bei der Entwicklung neuer Verpackungskonzepte. Dem-
nach würden sich vor allem die Thermoplasten COP, COC, PC und PP, sowie die chlorierten
Butylkautschuke C und D eignen. Hier sind die Extraktionsprofile am wenigsten umfang-

reich. Neben diesen Eigenschaften spielen bei der Verpackungsentwicklung jedoch weitere Faktoren, wie Verarbeitbarkeit des Polymers und Barriereigenschaften eine große Rolle, so dass zwischen alle Faktoren immer ein Kompromiss gefunden werden muss.

Anschließend wurden eigenhändig montierte Behältnisse für den Einsatz im Pharmabereich, befüllt mit Wasser bzw. Kontrastmittel, hinsichtlich ihres Migrationsprofils untersucht. Die Behälter (Kartuschen und Vials unterschiedlichster Zusammensetzung) wurden bei 40 °C und 75 % relativer Feuchte für sechs Monate eingelagert und nach Sterilisation, dreimonatiger und sechsmonatiger Lagerung mittels der entwickelten Methoden untersucht. Migrierte Stoffe waren t-Butanol, BHT, m-Xylen, o-Xylen, Ethylbenzen und Silikonölderivate. Die toxikologische Beurteilung dieser, unter Berücksichtigung der geltenden Rechtsvorschriften, ergab weder für Wasser noch für das Kontrastmittel als Füllgut ein gesundheitliches Risiko. Zur Beurteilung migrierter unbekannter Stoffe wurde die Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG genutzt, da laut FDA die Nutzung von Regelungen im Lebensmittelbereich möglich ist. Da sowohl die Einzelkonzentrationen der bekannten Migrationsstoffe, als auch die Gesamtmigrationswerte aller migrierter Stoffe, einschließlich unbekannter Signale, den Gesamtmigrationsgrenzwert nicht überschritten, wurde das toxikologische Risiko als unbedenklich eingeschätzt. Für unbekannte Stoffe sollte bei beabsichtigter Zulassung des Primärpackmittels eine Identifizierung durchgeführt werden, um eine toxikologische Bedenklichkeit gänzlich auszuschließen.

Beim Vergleich der Extraktionsprofile mit den Migrationsprofilen zeigte sich in vielen Fällen ein ähnliches Bild hinsichtlich bekannter Stoffe. Ein quantitativer Zusammenhang wurde nicht angestellt. Grund hierfür war die Verwendung unterschiedlicher Formlinge, die, verursacht durch ihren Formungsprozess, nicht vergleichbare Additivverteilungen im Kunststoff selbst aufwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen Screeningmethoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist Kunststoffe und Elastomere hinsichtlich ihres Extraktions- und Migrationsprofils zu untersuchen. Diese können bereits im Rahmen der Verpackungsentwicklung bei der Materialauswahl berücksichtigt werden. Eine sich anschließende toxikologische Einschätzung ermöglicht die frühzeitige Entscheidung über die Eignung als Primärpackmittel. Aufgrund der Vielzahl an Kunststoffadditiven, welche auf dem Markt sind und der Möglichkeit zur Bildung

von Reaktionsprodukten mit dem Füllgut ist es notwendig die entwickelten Methoden den Bedürfnissen der zu untersuchenden Behältnisse anzupassen und gegebenenfalls zu ergänzen.

9 SUMMARY AND OUTLOOK

The aim of this work was the development of screening methods for the identification and quantification of plastic additives, their degradation products, residual solvents and degradation products of the polymer materials. After having done comprehensive researches on the subject in literature and communication with different manufacturers of plastics and elastomers an overview was compiled about commonly used plastic additives and additionally degradation products and residual solvents which often migrate. For volatile extractables and leachables a HS-GC-FID was developed and for semi volatile components the GC-MS with direct injection was used. The HPLC-UV and the UPLC-UV-MS were applied for the determination of non volatile compounds. With these screening methods 64 potential extractables like antioxidants, UV stabilizers, plasticizers, lubricants, silicone derivatives or residual solvents could be identified. By means of selected substances which represented a broad range of chemical and physical properties it could be shown that these methods are amenable to validation. Solely the contrast medium led to difficulties during validation of the HPLC-UV method caused by the highly concentrated radio-opaque substance which results in overloading of the column. An optimized sample preparation shall avoid these effects. Extraction with non polar solvents could be an opportunity.

Additionally extraction methods for the investigation of different plastic and elastomers concerning their extractable profiles after extraction with water, isopropanol and hexane were developed. The plastic additives Irganox 1010, BHT, Irganox 1076, MTBC, DEHP, stearic acid, sulphur, as well as residual solvents and degradation products like different tertiary alcohols (p.a. t-butanol), 2-ethyl-1-hexanol, various hydrocarbons (p.a. dodecane, tetradecane, eicosane, tetracosane), Irgafos 168 oxide, palmitic-, myristic acid, benzyls and silicone derivatives were the commonly extracted substances.

These extractable profiles serve as an essential basis for assessing the suitability of materials as primary packaging materials during the development of new container closure systems. Thus COP, COC, PC and PP as plastics and the chlorinated butyl rubbers C and D would be appropriated. The extractable profiles of these materials are least comprehensive. Among

these properties additional factors are important during the development of packaging, p. a. process ability and barrier properties. A compromise between these claims shall be identified.

Afterwards one's own hand assembled devices, filled with water or rather contrast medium, was investigated concerning their migration profiles. These devices (cartridges and vials with different composition) were being stored at 40 °C and 75 % relative humidity for six months. After sterilization, tri- and the storage for six month the devices were investigated with the developed analytical methods. T-butanole, BHT, m-Xylene, o-Xylene, Ethylbenzene and silicone derivates were migrated compounds.

With the help of statutory provisions the toxicological assessment didn't show any health hazard neither for water nor for contrast medium as filling. For the assessment of migrated unknown substances the Kunststoffrichtlinie 2002/72/EG was used. According to FDA using regulations from the food sector is possible. Concentrations of known leachables as well as the global migration limits, summarizing concentrations of known and unknown substances were not exceeded. The toxicological risk was estimated being harmless. For unknown substances identification should be conducted to exclude any toxicological risk if a registration as primary packaging material is targeted.

When comparing extractable and leachable profiles in many cases a similar screen was shown concerning known compounds. However a quantitative correlation couldn't be demonstrated. The reason was the use of different moulded articles. The different moulding processes caused an allocation of plastic additives in plastics and elastomers which wasn't comparable.

Within the scope of this work screening methods to investigate plastics and elastomers concerning their extractable and leachable profiles has been developed successfully. It is possible to select materials already during the development process considering the potential of migration of the used plastic additives. The following toxicological assessment allows an early decision about the suitability as primary packaging material. Caused by the multiplicity of plastic additives which are currently on the market and their possibility to create reaction products with the filling it is necessary to adapt or amend the developed methods.

10 ANHANG

Tabelle A - 1 Robustheitsprüfung HS-GC-FID Wasser: Einfluss der NaCl-Zugabe (4 g und 3,5 g)

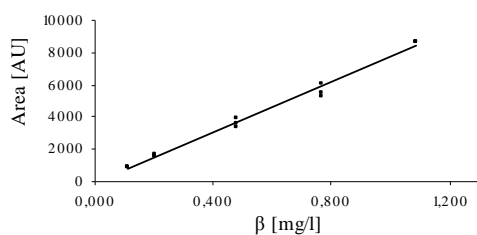
	t-B	EB	mX	oX	2E1H
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	5,44	4,88	5,50	4,70	5,78
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	0,66	1,84	1,83	1,82	0,92
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

Tabelle A - 2 Robustheitsprüfung HS-GC-FID Wasser: Einfluss der NaCl-Zugabe (4 g und 4,5 g)

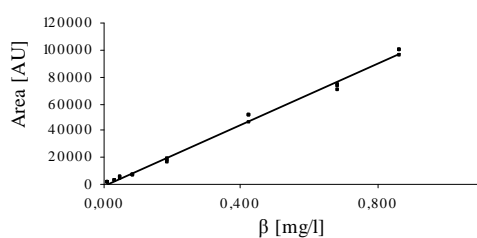
	t-B	EB	mX	oX	2E1H
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	2,97	1,79	1,52	1,05	2,73
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	0,71	1,60	1,76	2,10	0,80
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

Tabelle A - 3 Robustheitsprüfung HS-GC-FID Wasser: Stabilität der Lösung nach 24 h

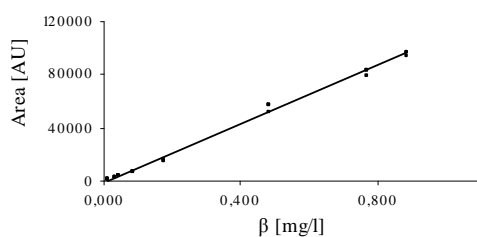
	t-B	EB	mX	oX	2E1H
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	5,65	3,29	3,01	2,38	1,53
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	0,57	0,94	0,92	0,80	1,32
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

t-Butanol

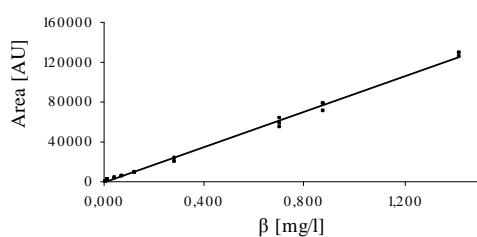
n :	8
$b \pm SD [AU/(mg/l)]$:	$111,9 \pm 100,5$
$m \pm SD [AU]$:	$7622,4 \pm 198,4$
$s(y) [AU]$:	208,5358
$s(x_0) [mg/l]$:	0,0274
r :	0,9980
$x_N [\mu g/l]$:	11
$x_B [\mu g/l]$:	113

Ethylbenzen

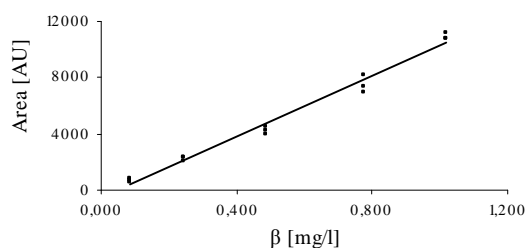
n :	10
$b \pm SD [AU/(mg/l)]$:	$-1021,2 \pm 861,7$
$m \pm SD [AU]$:	$112308,6 \pm 2266,6$
$s(y) [AU]$:	2142,3624
$s(x_0) [mg/l]$:	0,0191
r :	0,9976
$x_N [\mu g/l]$:	5
$x_B [\mu g/l]$:	9

m-Xylen

n :	10
$b \pm SD [AU/(mg/l)]$:	$-762,8 \pm 762,3$
$m \pm SD [AU]$:	$108965,9 \pm 1872,0$
$s(y) [AU]$:	1902,3841
$s(x_0) [mg/l]$:	0,0175
r :	0,9988
$x_N [\mu g/l]$:	5
$x_B [\mu g/l]$:	8

o-Xylen

n :	10
$b \pm SD [AU/(mg/l)]$:	$-1368,6 \pm 779,3$
$m \pm SD [AU]$:	$89423,8 \pm 1341,3$
$s(y) [AU]$:	1948,9341
$s(x_0) [mg/l]$:	0,0218
r :	0,9991
$x_N [\mu g/l]$:	< 8
$x_B [\mu g/l]$:	8

2-Ethyl-1-hexanol

n :	7
$b \pm SD [AU/(mg/l)]$:	$-274,8 \pm 218,2$
$m \pm SD [AU]$:	$10499,3 \pm 413,8$
$s(y) [AU]$:	393,3183
$s(x_0) [mg/l]$:	0,0375
r :	0,9961
$x_N [\mu g/l]$:	32
$x_B [\mu g/l]$:	86

Abbildung A - 1 Kalibriergeraden HS-GC-FID (Kontrastmittel) von t-Butanol, Ethylbenzen, m-Xylen, o-Xylen und 2-Ethyl-1-hexanol; β = Massenkonzentration, n = Anzahl Messpunkte, b = y-Achsenabschnitt, m = Steigung, SD = Standardabweichung, $s(y)$ = Reststandardabweichung, $s(x_0)$ = Verfahrensstandardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, x_N = Nachweisgrenze, x_B = Bestimmungsgrenze

Tabelle A - 4 Präzision HS-GC-FID Methode Kontrastmittel

Parameter	Sollwert	t-Butanol	Ethylbenzen	o-Xylen	m-Xylen	2-Ethyl-1-hexanol
VK Systempräzision [%]	≤ 10	2,71	8,70	6,82	7,87	4,88
VK Methodenpräzision [%]	≤ 15	6,25	8,86	7,80	8,06	6,66

Tabelle A - 5 Richtigkeit für HS-GC-FID Methode Kontrastmittel; Wdf₂₀₀ = Wiederfindungsrate bei 200 ppb, VK_{M4} = vierfacher VK der Methode

	Wdf ₂₀₀ [%]	VK _{M4}
t-Butanol	92,8	25,0
Ethylbenzen	101,6	17,6
m-Xylen	100,4	13,9
o-Xylen	101,1	13,6
2-Ethyl-1-hexanol	100,5	24,7

Tabelle A - 6 Auflösung R für die HS-GC-FID Methode; tB = t-Butanol, Prop = 1-Propanol, 2But = 2-Butanol, 3MH = 3-Methylhexan, MCH = Methylcyclohexan, 3Pent = 3-Pentanol, 3Hex = 3-Hexanon, EB = Ethylbenzen, mX = m-Xylen, oX = o-Xylen, pMS = p-Methylstyren, 2-E-1-H = 2-Ethyl-1-hexanol

Peakpaare	tB/Prop	Prop/2But	2But/3MH	3MH/MCH	MCH/3Pent	3Pent/3Hex
Auflösung R	8,73	9,89	9,96	16,63	1,18	20,4

Peakpaare	3Hex/EB	EB/mX	mX/oX	oX/pMS	pMS/2-E-1-H
Auflösung R	12,85	3,21	3,26	17,72	3,97

Tabelle A - 7 Robustheitsprüfung HS-GC-FID Kontrastmittel: Einfluss der NaCl-Zugabe (4 g und 3,5 g)

	t-B	EB	mX	oX	2E1H
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	1,66	1,38	1,17	1,18	1,43
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	0,83	0,71	0,18	0,51	0,82
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

Tabelle A - 8 Robustheitsprüfung HS-GC-FID Kontrastmittel: Einfluss der NaCl-Zugabe (4 g und 4,5 g)

	t-B	EB	mX	oX	2E1H
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	1,22	1,84	1,36	1,32	1,10
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	0,22	1,81	1,37	1,63	0,15
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

Tabelle A - 9 Robustheitsprüfung HS-GC-FID Kontrastmittel: Stabilität der Lösung nach 24 h

	t-B	EB	mX	oX	2E1H
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	1,80	4,27	1,37	5,81	1,96
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	2,16	1,94	2,19	2,07	2,06
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

Tabelle A - 10 Robustheitsprüfung GC-MS Wasser: Stabilität der Lösung nach 24 h

	OMCTS	BHT	B-BHA	DEHP
Anzahl der Werte n	2 x 5			
Varianzenhomogenität nach F-Test	2,01	2,26	1,33	3,63
Tabellenwert F-Test	6,39			
Wert für t-Test	0,27	0,63	2,15	0,08
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36			

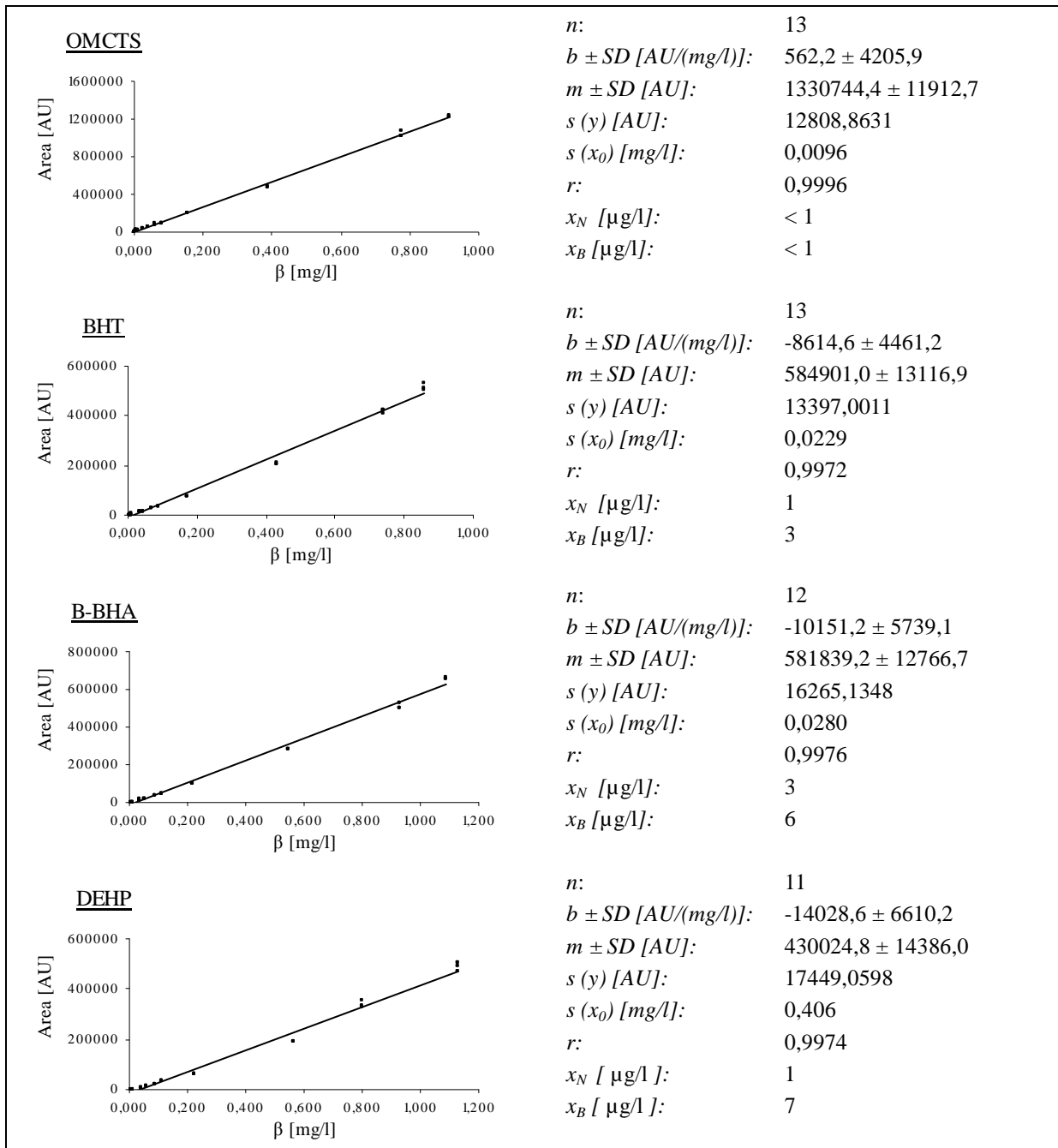


Abbildung A - 2 Kalibriergeraden GC-MS (Kontrastmittel) für OMCTS, BHT, B-BHA und DEHP; β = Massenkonzentration, n = Anzahl Messpunkte, b = y-Achsenabschnitt, m = Steigung, SD = Standardabweichung, $s(y)$ = Reststandardabweichung, $s(x_0)$ = Verfahrensstandardabweichung, r = Korrelationskoeffizient, x_N = Nachweisgrenze, x_B = Bestimmungsgrenze

Tabelle A - 11 Präzision der DIR-GC Methode Kontrastmittel

Parameter	Sollwert	OMCTS	BHT	B-BHA	DEHP
VK Systempräzision [%]	≤ 10	0,96	3,11	1,09	6,41
VK Methodenpräzision [%]	≤ 15	2,76	6,47	3,80	8,30

Tabelle A - 12 Auflösung R für die GC-MS Methode Kontrastmittel: Dec = Decan, 1Non = 1-Nonanol, Dode = Dodecan, Dihex = Dihexylether, Tetrad = Tetradecan, tAP = t-Amylphenol, Hexad = Hexadecan, tOP = t-Octylphenol, Octa = Octadecan, Eico = Eicosan, Doco = Docosan, Hexac = Hexacosan

Peakpaare	HMCTS/OMCTS	OMCTS/Dec	Dec/DMCPS	DMCPS/1Non	1Non/Dode
Auflösung R	18,3	5,6	21,7	9,4	5,0

Peakpaare	Dode/Dihex	Dihex/Tetrad	Tetrad/tAP	tAP/BHT	BHT/Hexad
Auflösung R	13,1	27,1	1,08	17,1	13,4

Peakpaare	Hexad/tOP	tOP/B-BHA	B-BHA/Octa	Octa/Eico	Eico/DBP
Auflösung R	2,48	3,30	19,3	21,6	2,34

Peakpaare	DBP/Doco	Doco/MTBC	MTBC/DEHP	DEHP/Hexac
Auflösung R	17,3	24,4	11,3	4,4

Tabelle A - 13 Robustheitsprüfung GC-MS Kontrastmittel: Stabilität der Lösung nach 24 h

	OMCTS	BHT	B-BHA	DEHP
Anzahl der Werte n	2 x 5			
Varianzhomogenität nach F-Test	4,08	4,45	1,29	4,66
Tabellenwert F-Test	6,39			
Wert für t-Test	1,06	2,24	1,05	0,65
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36			

Anhang

Tabelle A - 14 Auflösung R für die HPLC-UV Methode Wasser: Eus = Eusolex, Tin = Tinuvin, Add = Additiv, Top = Topanol, Chim = Chimasorb, Irg = Irganox, Irgaf = Irgafos, ox = oxid

Peakpaare	Phenol/BPA	DHBP/DHMBP	DHMBP/DHDMBP	DHDMBP/Euso	Euso/BBHA
Auflösung R	5,39	4,11	5,01	3,08	10,17
Peakpaare	BBHA/TinP	DTBP/BHT	BHT/S	MTBC/Add 8	Add 8/Tin 329
Auflösung R	3,78	13,44	9,62	6,17	4,00
Peakpaare	Tin329/Top	Chim/Tin326	Tin326/DEHP	DEHP/Tin327	Tin327/Add 13
Auflösung R	2,37	3,90	2,82	4,28	5,58
Peakpaare	Add 13/ODPA	ODPA/Irg1010	Irgaf ox/Irgaf 168	Irgaf 168/Irg 1076	
Auflösung R	2,54	15,56	17,38	2,22	

Tabelle A - 15 Robustheitsprüfung HPLC-UV Wasser: Stabilität der Lösung nach 24 h

	DHBP	BHT	Schwefel	MTBC	DEHP	Irg 1010	Irgaf 168 oxid
Anzahl der Werte n	2 x 5						
Varianzhomogenität nach F-Test	3,12	3,87	1,26	1,82	5,38	3,03	1,92
Tabellenwert F-Test	6,39						
Wert für t-Test	0,95	1,39	0,67	0,60	1,74	0,75	0,68
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36						

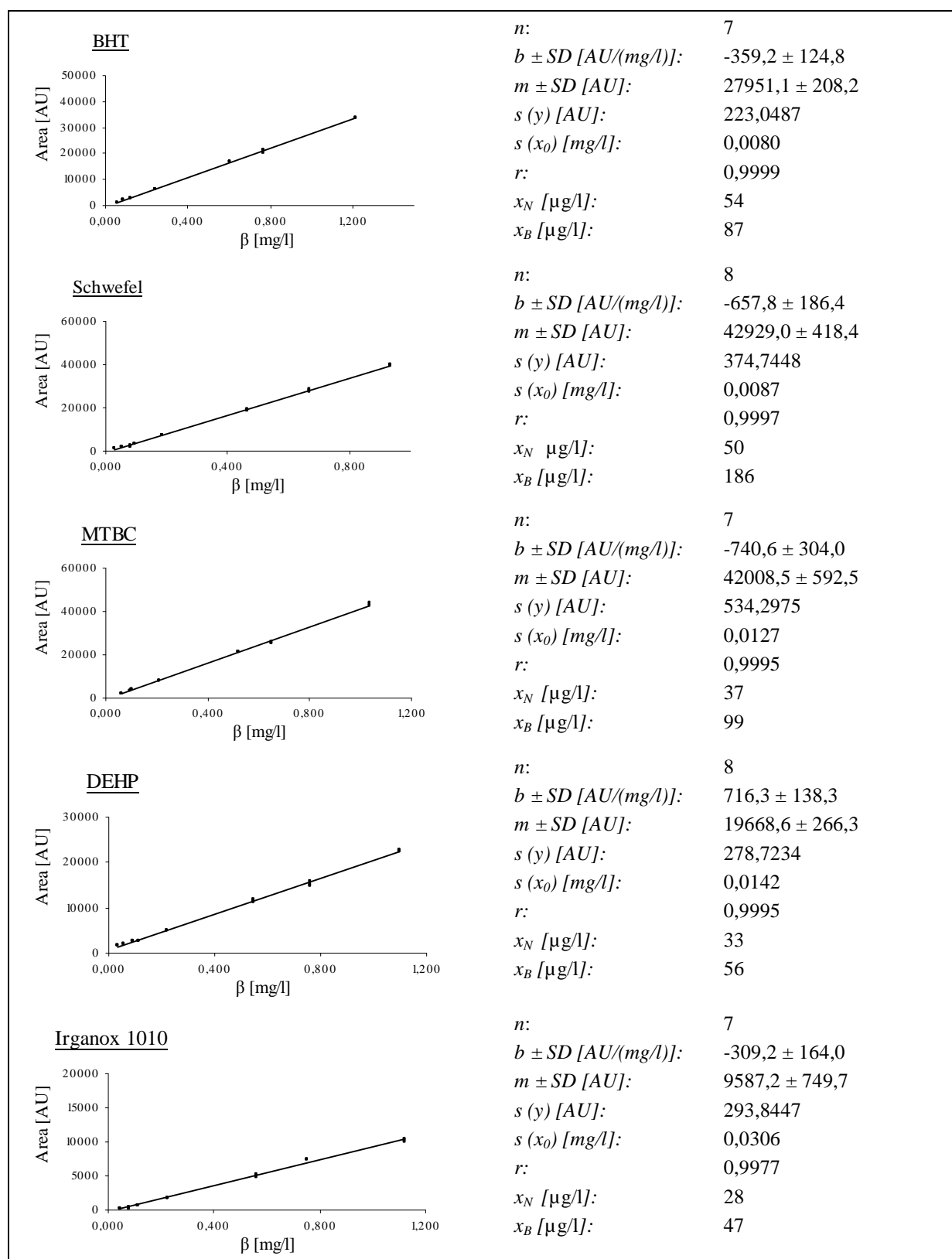


Abbildung A - 3 Kalibriergeraden HPLC-UV (Kontrastmittel) für BHT, Schwefel, MTBC, DEHP und Irganox 1010, β = Massenkonzentration, *n* = Anzahl Messpunkte, *b* = y-Achsenabschnitt, *m* = Steigung, *SD* = Standardabweichung, *s*(y) = Reststandardabweichung, *s* (*x*₀) = Verfahrensstandardabweichung, *r* = Korrelationskoeffizient, *x*_N = Nachweisgrenze, *x*_B = Bestimmungsgrenze

Anhang

Tabelle A - 16 Präzision HPLC-UV Methode Kontrastmittel

Parameter	Sollwert	BHT	Schwefel	MTBC	DEHP	Irganox 1010
VK Systempräzision [%]	≤ 10	2,35	5,03	4,00	2,84	4,98
VK Methodenpräzision [%]	≤ 15	6,26	7,62	7,28	5,77	8,38

Tabelle A - 17 Richtigkeit für HPLC-UV Methode Kontrastmittel; Wdf₅₀₀ = Wiederfindungsrate bei 500 ppb, VK_{M4} = vierfacher VK der Methode

	Wdf ₅₀₀ [%]	VK _{M4} [%]
BHT	101,8	25,0
Schwefel	101,4	30,5
MTBC	99,3	29,1
DEHP	88,2	23,1
Irganox 1010	119,5	33,5

Tabelle A - 18 Auflösung R für die HPLC-UV Methode Kontrastmittel: Tin = Tinuvin, Add = Additiv, Top = Topanol, Chim = Chimasorb, Irg = Irganox, Irgaf = Irgafos, ox = oxid

Peakpaare	BBHA/TinP	TinP/DTBP	DTBP/BHT	BHT/S	S/MTBC
Auflösung R	2,73	1,30	9,23	7,02	1,43
Peakpaare	MTBC/Add 8	Add 8/Tin 329	Tin329/Top	Top/Chim	Chim/Tin326
Auflösung R	6,32	3,05	2,12	1,16	3,13
Peakpaare	Tin326/DEHP	DEHP/Tin327	Tin327/Add 13	Add 13/ODPA	ODPA/Irg1010
Auflösung R	2,50	6,93	2,98	2,17	13,02
Peakpaare	Irg1010/Irg133	Irg1330/Irg565	Irg565/Irgaf ox	Irgaf ox/Irgaf 168	Irgaf 168/Irg1076
Auflösung R	1,98	2,32	1,24	7,97	2,35

Tabelle A - 19 Robustheitsprüfung HPLC-UV Kontrastmittel: Stabilität der Lösung nach 24 h

	BHT	Schwefel	MTBC	DEHP	Irg 1010
Anzahl der Werte n	2 x 5				
Varianzenhomogenität nach F-Test	1,71	1,20	1,83	2,34	1,02
Tabellenwert F-Test	6,39				
Wert für t-Test	0,40	0,49	0,89	1,66	0,07
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36				

Tabelle A - 20 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt HC-GC-FID Wasser

	t-Butanol	Ethylbenzen	o-Xylen	m-Xylen	2-Ethyl-1-hexanol
Anzahl der Werte n	8	8	8	8	8
Wert für t-Test	1,67	1,82	0,94	0,07	1,98
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50

Tabelle A - 21 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt GC-MS Wasser

	OMCTS	BHT	B-BHA	DEHP
Anzahl der Werte n	8	11	11	10
Wert für t-Test	4,68	2,17	2,13	3,06
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,50	3,17	3,17	3,25

Tabelle A - 22 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt HPLC-UV Wasser

	DHBP	BHT	Schwefel	MTBC
Anzahl der Werte n	6	6	6	7
Wert für t-Test	0,19	0,19	0,72	2,23
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	4,03	4,03	4,03	3,71
	DEHP	Irganox 1010	Irgafos 168 oxid	
Anzahl der Werte n	7	6	8	
Wert für t-Test	2,24	2,19	6,75	
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,71	4,03	3,50	

Tabelle A - 23 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt UPLC-UV-MS Wasser

	DHBP	MTBC	Add. 8 Ph. Eur.	Irganox 1010
Anzahl der Werte n	9	8	10	9
Wert für t-Test	3,48	1,44	1,68	0,78
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,36	3,50	3,25	3,36
	Tinuvin P	Schwefel		
Anzahl der Werte n	8	7		
Wert für t-Test	0,02	1,07		
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,50	3,71		

Tabelle A - 24 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt HC-GC-FID Kontrastmittel

	t-Butanol	Ethylbenzen	m-Xylen	o-Xylen	2-Ethyl-1-hexanol
Anzahl der Werte n	8	10	10	10	7
Wert für t-Test	1,52	1,51	1,27	2,22	1,85
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,50	3,25	3,25	3,25	3,71

Tabelle A - 25 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt GC-MS Kontrastmittel

	OMCTS	BHT	B-BHA	DEHP
Anzahl der Werte n	13	13	12	11
Wert für t-Test	0,16	2,32	2,16	2,67
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,06	3,06	3,11	3,17

Tabelle A - 26 Sollwert t-Test für y-Achsenabschnitt HPLC-UV Kontrastmittel

	BHT	Schwefel	MTBC	DEHP	Irganox 1010
Anzahl der Werte n	7	8	7	8	7
Wert für t-Test	4,26	4,97	3,67	7,27	2,78
Tabellenwert t-Test (P = 99 %)	3,71	3,50	3,71	3,50	3,71

11 VERÖFFENTLICHUNGEN

Kaiser, S., Kempter, C., Krause, M., Schmitz, M., Storm, T., Surmann, J.P.: UPLC-MS as a fast screening method for identifying and quantifying 38 widely used additives; *PDA Extractables/Leachables Forum*, Bethesda, Maryland, 06.-08.11.2007

12 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Saechtling, H.: Kunststoff-Taschenbuch, 30. Auflage, *Carl Hanser Verlag München* (2007)

- [2] Plastics Europe, Association of plastics manufacturers: The compelling facts about plastics (2009)

- [3] Keim, W.: Kunststoffe: Synthese, Herstellungsverfahren, Apparaturen, 1.Auflage, *Wiley-VCH* (2006)

- [4] Sibley, R. L.: Preservation of rubber, Patent-Nr 2,216,534 (1940)

- [5] Phillips, T.; Helfer, R. A.: Dyes in PET, A look at FDA compliance issues, *ANTEC*, 2880-2881 (1999)

- [6] Flemming, A.: Wax Used for Milk and Food Containers, *Public Health Rep*, **74**, 9 (1959)

- [7] Kaufman, C. W.: Food packaging and the 1958 food-additives amendment, *Food Drug Law J*, 649-656 (1959)

- [8] Stiftung Warentest: Da geht was rein, Rückstände aus Verpackungen, *Stiftung Warentest*, **3**, 16-21 (2005)

- [9] Guess, W. J.; Jacob, J.; Autian, J.: A study of polyvinyl chloride blood bag assemblies I. Alteration or contamination of ACD solutions, *Drug Intell Clin Pharm*, **1**, 120-127 (1967)

- [10] Venkataramanan, R. et al.: Leaching of DEHP from PVC bags into intravenous cyclosporine solution, *Am J Hosp Pharm*, **43**, 2800-2802 (1986)
- [11] Pearson, S. D.; Trissel, L. A.: Leaching of DEHP from PVC containers by selected drugs and formulation components, *Am J Hosp Pharm*, **50**, 1405-1409 (1993)
- [12] Ono, K. et al.: Migration of plasticiser from haemodialysis blood tubing, *Proc Eur Dial Transplant ASSOC*, **12**, 571-576 (1976)
- [13] Jaeger, R. J.; Rubin, R. J.: Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues, *N Engl J Med*, **287**, 1114-1118 (1972)
- [14] Waugh, W. N.; Trissel, L. A.; Stella, V. J.: Stability, compatibility, and plasticizer extraction of taxol injection diluted in infusion solutions and stored in various containers, *AJHP*, **48**, 1520-1524 (1991)
- [15] Fachinformation Taxol 6 mg/l Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, Bristol-Meyers Squibb, *Rote Liste Service GmbH*
- [16] Boven, K. et al.: The increased incidence of pure red cell aplasia with Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes, *Kidney Int*, **67**, 2346-2353 (2005)
- [17] Yoshikawa, T.; Ushimi, K.; Kimura, K.; Tamura, M.: The rapid Identification Method of Additives in PP by MS, *J Appl Poly Sci*, **15**, 2065-2072 (1971)
- [18] Biles, J. E.; McNeal, T. P.; Begley, T. H.; Hollifield, H. C.: Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids, *J Agric Food Chem*, **45**, 3541-3544 (1997)

- [19] Dopico-Garcia, M. S.; López-Vilarino, J. M.; González-Rodríguez, M. V.: Determination of antioxidant migration levels from low-density polyethylene films into food simulants, *J Chromatogr A*, **1018**, 53-62 (2003)
- [20] Kim, H.; Gilbert, S. G.; Johnson, J. B.: Determination of potential migrants from commercial amber polyethylene terephthalate bottle wall, *Pharm Res*, **7**, 2, 176-179 (1990)
- [21] Ulsaker, G. A.; Teien, G.: Identification of caprolactam as a potential contaminant in parenteral solutions stored in overwrapped PVC bags, *J Pharm Biomed Anal*, **10**, 1, 77-80 (1992)
- [22] Arbin, A. et al.: Studies on contamination of intravenous solutions from PVC-bags with dynamic headspace GC-MS and LC-diode array techniques, *Int J Pharm*, **28**, 211-218 (1986)
- [23] FDA Guidance for Industry: Container Closure Systems for Packaging Human drugs and Biologics (1999)
- [24] EMEA Guideline on plastic immediate packaging materials (2005)
- [25] PQRI Safety thresholds and best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products (2006)
- [26] Ehrenstein, G. W.: Polymer Werkstoffe, Struktur, Eigenschaften, Anwendung, 2. Auflage, *Carl Hanser Verlag München Wien* (1999)
- [27] Römpp CD, Thieme Chemistry (2006)

- [28] Riedel E.: *Moderne anorganische Chemie*, 2. Auflage, *Walter de Gruyter GmbH & Co. Berlin* (2003)
- [29] www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/9/mac/andere_polymerisationen/ziegler_natta/ziegler_natta.vlu.html, *Chemgaroo Educational Systems*
- [30] Domininghaus, H.: *Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften*, 6. Auflage, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* (2005)
- [31] Murphy, J.: *Additives for Plastics Handbook*, 1. Auflage, *Elsevier Advanced Technology Oxford* (1996)
- [32] Selke, S. E. M.; Culter, J. D.; Hernandez, R. J.: *Plastics Packaging, Properties, Processing, Applications, and Regulations*, 2. Auflage, *Carl Hanser Verlag, München* (2004)
- [33] Gächter, R.; Müller, H.: *Kunststoffadditive*, 3. Auflage, *Carl Hanser Verlag München Wien* (1989)
- [34] Pritchard, G.: *Plastics Additives, Rapra Market Report*, *Rapra Technology Limited* (2005)
- [35] www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/9/mac/andere/polyethylen/polyethylen.vlu/Page/vsc/de/ch/9/mac/andere/polyethylen/lldpe.vscml.html, *Chemgaroo Educational Systems*
- [36] Kaiser, W.: *Kunststoffchemie für Ingenieure*, 2. Auflage, *Carl Hanser Verlag München* (2007)
- [37] Hayano, S. et al.: Stereospecific ring-opening metathesis polymerization of cycloolefins using novel molybdenum and tungsten complexes having biphenolate ligands. development of crystalline hydrogenated poly(endo-dicyclopentadiene) and poly(norbornene), *Macromolecules*, **36**, 7422-7431 (2003)

- [38] Waddell, W. H.; Tsou, A. H.: Butyl rubbers, Rubber compounding, *Chemistry and applications*, 133-162 (2004)
- [39] Jenke, R. D.: Linking Extractables and Leachables in Container/closure Applications, *J Pharm Sci Technol*, **59**, 4, 265-281 (2005)
- [40] FDA Guidance for Industry: MDI and DPI Drug Products Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation (1998)
- [41] EMEA Guideline on the specification limits for the residues of metal catalysts (2008)
- [42] ICH-Guideline Q8: Pharmaceutical development (2005)
- [43] ICH-Guideline Q6A: Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances
- [44] ICH-Guideline Q3B: Impurities in new drug products (2006)
- [45] ICH-Guideline Q3C: Impurities: Guideline for residual solvents (2009)
- [46] ICH-Guideline Q1A: Stability testing of new drug substances and products (2003)
- [47] FDA Guideline for Drug Master Files (1989)
- [48] EMEA Guideline on the limits of genotoxic impurities (2007)
- [49] Richtlinie 2002/72/EG der Kommission über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (2002)

- [50] Richtlinie 2004/19/EG zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (2004)
- [51] Richtlinie 2005/79/EG zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (2005)
- [52] Richtlinie 2008/39/EG zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EWG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (2008)
- [53] Europäisches Arzneibuch, 6. Ausgabe, *Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart* (2008)
- [54] Nerin, C.; Asensio, E.: Migration of organic compounds from multilayer plastic-paper material intended for food packaging, *Anal Bioanal Chem*, **389**, 589-596 (2007)
- [55] Jenke, R. D.: Evaluation of the chemical compatibility of plastic contact materials and pharmaceutical products; safety considerations related to extractables and leachables, *J Pharm Sci*, **96**, 10, 2566-2581 (2007)
- [56] Jenke, R. D.; Story, J.; Lalani, R.: Extractables/leachables from plastic tubing used in product manufacturing, *Int J Pharm*, **315**, 75-92 (2006)
- [57] Moskovkin, A. S.: Chromatographic-Mass-Spectrometric determination of toxic substances liberated from polymeric materials, *Anal Chem*, **57**, 6, 507-512 (2002)
- [58] Burman, L.; Albertsson A.; Höglund, A.: Solid-phase microextraction for qualitative and quantitative determination of migrated degradation products of antioxidants in an organic aqueous solution, *J Chromatogr A*, **1080**, 107-116 (2005)

- [59] Forrest, M.; Holding, S.; Howells, D.: The use of two-dimensional GC-MS for the identification and quantification of low molecular weight compounds from high performance elastomers, *Polymer Testing*, **25**, 63-74 (2006)
- [60] Nerín, C.; Fernández, C.; Domeno, C.; Salafranca, J.: Determination of Potential Migrants in Polycarbonate Containers Used for Microwave Ovens by High-Performance Liquid Chromatography with UV and FD, *J Agric Food Chem*, **51**, 5647-5653 (2003)
- [61] Xiao, B.; Gozo, S. K.; Herz, L.: Development and validation of HPLC methods for the determination of potential extractables from elastomeric stoppers in the presence of a complex surfactant vehicle used in the preparation of parenteral drug products, *J Pharm Biomed Anal*, **43**, 558-565 (2007)
- [62] Rück, C.: Untersuchung der Permeation von Etikettenklebstoffen auf Polyacrylatbasis durch pharmazeutische Kunststoffbehältnisse, Dissertation, *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin* (2009)
- [63] Leibnitz, E.; Struppe, H. G.: Handbuch der Gaschromatographie, 3. Auflage, *Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G. Leipzig* (1984)
- [64] Hanrieder, D.: Schenllextraktion qualitätsrelevanter Inhaltsstoffe als Basis für eine Schnellbeurteilung von Obst und Gemüse, Schlussbericht zur Forschungsprojektförderung, *Hochschule Anhalt, Fachbereich Landwirtschaft, Ökotrophologie und Landespfl ege* (2004)
- [65] Hachenberg, H.; Beringer, K.: Die Headspace-Gaschromatographie als Analysen- und Meßmethode, *Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH Braunschweig Wiesbaden* (1996)
- [66] Demoré, B. et al.: Leaching of DEHP from PVC bags into i.v. etoposide solution, *J Clin Pharm Therap*, **27**, 139-142 (2002)

-
- [67] Garde, J.A., Catalá, R., Gavara, R., Hernández, R. J.: Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants, *Food Addit Contam*, **18**, 8, 750-762 (2001)
- [68] Zhang, F.; Chang, A.; Karaisz, K.; Feng, R.; Cai, J.: Structural identification of extractables from rubber closure used for pre-filled semisolid drug applicator by chromatography, mass spectrometry, and organic synthesis, *J Pharm Biomed Anal*, **34**, 841-849 (2004)
- [69] Hayward, D. S.; Jenke, R. D.: Interactions between polymer containers and parenteral solutions Correlating equilibrium polymer-water interaction constants with solute partition coefficients, *Int J Pharm*, **66**, 87-96 (1990)
- [70] Jenke, R. D.; Chess, E. K.; Zietlow, D. C.; Rabinow, B. E.: Model of estimating the accumulation of solutes leaching from polymeric containers into parenteral solutions, *Int J Pharm*, **78**, 115-122 (1992)
- [71] Bauer, C.: UPLC-ESI TOF: die Vorteile einer neuartigen Kopplungstechnologie anhand eines Beispiels aus dem Bereich Metabonomics, Stofftrennung und Detektion, *Detecta 04* (2004)
- [72] Bentayeb, K.; Batle, R.; Romero, C.; Nerin, C.: UPLC-MS as a powerful technique for screening the nonvolatile contaminants in recycled PET, *Anal Bioanal Chem*, **388**, 1031-1038 (2007)
- [73] Ermer, J., Kibat, P. G.: Validierung analytischer Verfahren-1. Teil: Anforderungen bei der Zulassung von Arzneimitteln, *PZ Prisma*, **4**, 239-243 (1997)
- [74] Bitar, Y.: Entwicklung und Validierung chromatographischer bzw. elektrophoretischer Methoden zur Reinheitsprüfung von Arzneistoffen, Dissertation, *Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg* (2007)
- [75] ICH-Guideline Q2: Validation of Analytical Procedures: Text and methodology (2005)

- [76] Rucker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, *Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart* (2001)
- [77] Jenke, R. D.: Guidelines for the design, implementation and interpretation of validations for chromatographic methods used to quantitate Leachables/Extractables in pharmaceutical solutions, *J Liquid Chromatogr Related Technol*, **27**, 20, 3141-3176 (2004)
- [78] Kromidas, S.: Validierung in der Analytik, 1. Auflage, *Wiley-VCH* (1999)
- [79] Shen, H.: Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods, *Talanta*, **66**, 734-739 (2005)
- [80] Kim, H.; Gilbert, S.G.; Johnson, J.B.: Determination of potential migrants from commercial amber polyethylene terephthalate bottle wall, *Pharm Res*, **7**, 176-179 (1990)
- [81] Dilettato, D.; Arpino, P.J.; Nguyen, K.; Bruchet, A. Investigation of low mass oligomers and polymer additives from plastics. Part II: application to polyolefin soxhlet extracts, *J High Res Chromatogr*, **14**, 335-342 (1991)
- [82] Kauffman, J. S.: Identification and Risk-Assessment of Extractables and Leachables, *Pharm Technol Anal Methods*, 14-22 (2006)
- [83] Nielson, R. C.: Extraction and quantification of polyolefin additives, *J Liq Chromatogr*, **14**, 3, 503-519 (1991)
- [84] Haider, N., Karlsson S.: A rapid ultrasonic extraction technique to identify and quantify additives in poly(ethylene), *Analyst*, **124**, 797-800 (1999)

- [85] Dopico-Garcia, M. S.: Extraction and quantification of antioxidants from low-density polyethylene by microwave energy and liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **521**, 179-188 (2004)
- [86] Renoe, B. W.: Microwave assisted extraction, *Am Laborat*, 34-40 (1994)
- [87] Paré, J. R. J.; Bélanger, M. R.; Stafford, S. S.: Microwave-Assisted Process (MAP): a new tool for the analytical laboratory, *Trends Anal Chem*, **13**, 4, 176-184 (1994)
- [88] Francis, V.C.; Sharma, Y. N.; Bhardwaj, I. S.: Quantitative determination of antioxidants and ultraviolet stabilizers in polymers by high performance liquid chromatography, *Die Angew Makromolekulare Chem*, **113**, 219-225 (1983)
- [89] ASTM Standard Practice for Extraction of Additives in Polyolefin Plastics (D 7210-06)
- [90] U. S. Pharmacopeia 32, United states pharmacopeial convention, Inc.
- [91] Sawaguchi, T.; Takesue, T.; Ikemura, T.; Seno, M.: Thermal degradation of polymers in the melt I. Characterization of volatile oligomers formed by thermal degradation of polyisobutylene, *Macromol Chem Phys*, **196**, 4139-4157 (1995)
- [92] Chien, J. W. C.; Kiang, J. K. Y.: Polymer reactions X. Thermal pyrolysis of poly(isoprene), *Eur Polym J*, **15**, 1059-1065 (1979)
- [93] Vichi, S. et al.: Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **1125**, 117-123 (2006)

- [94] Occupational safety & health administration: Occupational safety & health guideline for t-Butanol,
<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/tertbutylalcohol/recognition.html>
- [95] Material Safety Data Sheet BHT, Cayman Chemical Company
- [96] OECD SIDS: SIDS initial assessment report BHT, UNEP Publications
- [97] Begründung für Bewertung von Stoffeigenschaften: Octamethylcyclotetrasiloxan (D4),
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (2001)
- [98] Sicherheitsdatenblatt Hexamethylcyclotrisiloxan, *Sigma Aldrich Chemie GmbH* (2009)
- [99] Kolb, B., Ettre, L. S.: Static Headspace Gaschromatography: Theory and practice, 2. Edition, *John Wiley & Sons, Inc.* (2006)
- [100] Kolb, B.: Application of an automated Head-Space procedure for trace analysis by gas chromatography, *J Chromatogr A*, **122**, 553-568 (1976)