

**Untersuchungen zu Extractables aus
Gummistopfen sowie deren Wechselwirkungen
mit Modellproteinen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Carolin Richter

aus Trostberg

Bonn 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Alf Lamprecht
2. Gutachter: Prof. Dr. Werner Knöss

Tag des Promotionskolloquiums: 30.03.2022

Erscheinungsjahr: 2022

I. Danksagung

Die praktischen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von April 2010 bis September 2013 in den Laboren des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in Bonn durchgeführt. Weder diese praktischen Arbeiten noch das anschließende Zusammenschreiben, parallel zu Umzug und Vollzeitstelle, wären ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen möglich gewesen.

Daher möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. A. Lamprecht, für die Betreuung und die unendliche Geduld bedanken. Die vielen Besprechungen fanden immer in sehr freundlicher Atmosphäre statt und führten, insbesondere bei der Ergebnisinterpretation, immer wieder zu neuen Denkanstößen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern am BfArM, Frau Dr. C. Lipperheide, Herrn Dr. U. Lipke und Herrn Dr. T. Zapf für die Initiierung dieses Forschungsprojektes, das mir die Möglichkeit gab, verschiedenste analytische Methoden anzuwenden. Ich habe viel in dieser Zeit gelernt und möchte mich insbesondere bei Frau Dr. Lipperheide und Herrn Dr. Lipke für ihre jahrelange Unterstützung und Geduld, die intensiven Diskussionen und die konstruktive Kritik bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Knöss bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie bei Frau Prof. Dr. D. Imhof und Frau PD Dr. M. Engeser für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission.

An dieser Stelle dürfen auf keinen Fall meine Kolleginnen Frau R. Endler, Frau A. Dittmer und Frau B. Jacobsen im BfArM fehlen. Vielen Dank für die äußerst kompetente Hilfe im Labor, für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die verschiedenen Analysemethoden und nicht zuletzt die gemeinsamen Mittagspausen. Vielen Dank auch an alle anderen Kolleginnen und Kollegen im BfArM für die Unterstützung und freundliche Aufnahme.

Ich möchte mich auch bei Herrn Dr. S. Kehraus für seine Hilfe bei der Strukturaufklärung bedanken sowie beim Team der NMR-Spektroskopie für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Vor allem bedanke ich mich bei meiner Familie und meinem Lebensgefährten. Ihr habt mich jahrelang motiviert, was bestimmt nicht immer leicht gewesen ist. Diese Dissertation würde ohne eure Hilfe und euren Rückhalt nicht vorliegen. Vielen Dank auch an meine Freunde für das jahrelange Zuhören, Motivieren und für die notwendige Ablenkung in stressigen Zeiten.

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Danksagung	I
II.	Inhaltsverzeichnis	II
III.	Abkürzungsverzeichnis	IV
IV.	Symbolverzeichnis	VI
V.	Tabellenverzeichnis	VII
VI.	Abbildungsverzeichnis	XII
1	Einleitung.....	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Gummistopfen als Teil der Primärverpackung	3
2.2	Interaktion zwischen Arzneimittel und Primärverpackung	7
2.3	Arzneimittelformulierungen mit rekombinanten Proteinen	14
3	Zielstellung	29
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Validierung der verwendeten HPLC-DAD-Methode	32
4.2	Qualität der Gummistopfen	40
4.3	Extraktionsversuche	47
4.4	Strukturelle Identifikation der Extractables 6-9	53
4.5	Ergebnisse der Interaktionsstudien.....	57
4.6	Qualität des hergestellten Gummistopfenextrakts.....	60
4.7	Einfluss des Gummistopfenextrakts auf IgG	62
4.8	Einfluss des Gummistopfenextrakts auf EPO.....	72
5	Diskussion	75
6	Zusammenfassung	85

Inhaltsverzeichnis

7	Ausblick.....	87
8	Veröffentlichungen.....	88
9	Experimenteller Teil.....	89
9.1	Materialien, Geräte und Methoden.....	89
9.2	Aufnahme der Extraktionsprofile der verschiedenen Gummistopfen.....	109
9.3	Berechnung der Responsefaktoren von Pyren und TOTM.....	110
9.4	Strukturaufklärung der Extractables 6-9.....	112
9.5	Herstellung des Gummistopfenextrakts.....	113
10	Literaturverzeichnis.....	114
11	Anhang.....	120
11.1	Daten zur Validierung der HPLC-Methode.....	120
11.2	Daten zur Validierung der AAS-Methoden.....	136
11.3	Ergebnisse der Berechnungen zur Konzentration der Extractables in Gummistopfen CB1 und BB6 aus den Extraktionsprofilen.....	144
11.4	Vollständigkeit der Extraktion in Abhängigkeit von der Extraktionszeit.....	145
11.5	Ergebnisse der Extraktionsstudie von Gummistopfen CB1.....	146
11.6	Ergebnisse der Interaktionsstudien von CB1.....	147
11.7	Einfluss der entfetteten Gummistopfenextrakte auf IgG.....	150
11.8	Einfluss von Silikonöl auf IgG.....	152
11.9	Ergebnisse der Entfettung von Gummistopfen CB1.....	153
11.10	Chromatogramme zur Auswertung von EPO – Extractables.....	153
11.11	Strukturaufklärung der Extractables 6-9 von CB1.....	156

III. Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ACN	Acetonitril
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> , Aktiver pharmazeutischer Wirkstoff
BADGE	Bisphenol A – Diglycidylether
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CMC	<i>Critical Micelle Concentration</i> , Kritische Mizellbildungskonzentration
DAD	Diodenarraydetektor
DEHP	Diethylhexylphthalat, <i>Bis(2-ethylhexyl) phthalate</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> , Dynamische Differenzkalorimetrie
EDQM	<i>European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare</i> , Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln
EMA	<i>European Medicines Agency (vor 2010 EMEA - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)</i> , Europäische Arzneimittelagentur
EPO	Erythropoietin
ETFE	Ethylen-Tetrafluorethylen
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> , US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit
HMWPs	<i>High Molecular Weight Proteins</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographie
HSA	Humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> , Internationale Konferenz zur Harmonisierung technischer Anforderungen für die Zulassung von Humanarzneimitteln
IIR	<i>Isobutylene Isoprene Rubber</i> , Isobuten-Isopren-Kautschuk, Butylgummi, Butylkautschuk
IPA	Isopropylalkohol, 2-Propanol
IS	Interner Standard
JP	<i>Japanese Pharmacopoeia</i> , Japanische Pharmakopöe
LOD	<i>Limit of Detection</i> , Nachweisgrenze
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> , Bestimmungsgrenze
MeOH	Methanol

Abkürzungsverzeichnis

MIBK	Methylisobutylketon
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
NAbs	<i>Neutralizing Antibodies</i> , Neutralisierende Antikörper
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance (Spectroscopy)</i> , Kernspinresonanz (Spektroskopie)
NNAbs	<i>Non Neutralizing Antibodies</i> , Nicht-neutralisierende Antikörper
NTU	<i>Nephelometric Turbidity Unit</i> , Nephelometrischer Trübungswert
PET	Polyethylenterephthalat
Ph. Eur.	<i>European Pharmacopoeia</i> , Europäische Pharmakopöe
PRCA	<i>Pure Red Cell Aplasia</i> , Aplasie der roten Blutkörperchen
PS 20	Polysorbat 20
PS 80	Polysorbat 80
r. F.	Relative Feuchte
rhGH	<i>Recombinant Human Growth Hormone</i> , Rekombinantes humanes Wachstumshormon
RP	<i>Reversed Phase</i> , Umkehrphase
rpm	<i>Revolutions per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	<i>Retention Time</i> , Retentionszeit
RRT	<i>Relative Retention Time</i> , Relative Retentionszeit
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> , Relative Standardabweichung
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
S/N ratio	<i>Signal to Noise Ratio</i> , Signal-Rausch-Verhältnis
TOTM	Trioctyltrimellitat, Triethylhexyltrimellitat, <i>Tris(2-ethylhexyl) trimellitate</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> , US-amerikanische Pharmakopöe
UVD	Ultraviolett-detektion

IV. Symbolverzeichnis

A	Oberfläche
c	Konzentration
d	Dicke
D	Diffusionskoeffizient
G	Freie Enthalpie
H	Enthalpie
k	Boltzmann-Konstante
m	Masse
n	Anzahl
K	Verteilungskoeffizient
r	Molekülradius
R ²	Bestimmtheitsmaß
R	Korrelationskoeffizient
S	Entropie
T	Temperatur
T _M	Schmelztemperatur
t	Zeit
η	Viskosität
V	Volumen
x	Abstand
π	Kreiszahl
ρ	Dichte
∞	im Gleichgewichtszustand
σ	Standardabweichung der Residuen
δ	Verschiebung

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Wahrscheinlichkeit von Interaktionen zwischen Arzneimittel und Primärverpackung.....	8
Tabelle 4.1: Robustheit – Ergebnisse der Variation der verschiedenen Methodenparameter	36
Tabelle 4.2: LOD und LOQ der Referenzsubstanzen Pyren und TOTM.	39
Tabelle 4.3: Prüfung des Bromobutylstopfens BB3 nach USP	41
Tabelle 4.4: Prüfung des Bromobutylstopfens BB3 nach JP.	42
Tabelle 4.5: Prüfung des Bromobutylstopfens BB4 nach USP	42
Tabelle 4.6: Prüfung des Bromobutylstopfens BB4 nach JP.	43
Tabelle 4.7: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB1 nach JP.	43
Tabelle 4.8: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB2 nach USP	44
Tabelle 4.9: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB2 nach Ph. Eur.	44
Tabelle 4.10: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB2 nach JP.	45
Tabelle 4.11: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB3 nach USP	45
Tabelle 4.12: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB3 nach Ph. Eur.	46
Tabelle 4.13: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB3 nach JP	46
Tabelle 4.14: Konzentration der <i>Extractables</i> 1-9 in den verschiedenen Modellformulierungen.	58
Tabelle 4.15: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 unbehandelt.	64
Tabelle 4.16: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 unbehandelt.	64
Tabelle 4.17: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 unbehandelt.	66
Tabelle 4.18: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 unbehandelt.	66
Tabelle 4.19: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG mit TOTM.	68
Tabelle 4.20: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG mit TOTM.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.21: SEC-Ergebnisse von EPO-Gummistopfenextrakt CB1 in 0,1 % m/v Polysorbat 20.....	73
Tabelle 4.22: SEC-Ergebnisse von EPO-Gummistopfenextrakt CB1 in 1,0 % m/v PS 20.	74
Tabelle 9.1: Aufschlüsselung der bestellten Gummistopfen	96
Tabelle 9.2: Gegenüberstellung der geforderten Prüfungen gemäß Ph. Eur., USP und JP.....	97
Tabelle 9.3: Eluentenherstellung für die Durchführung der Extraktions- und Interaktionsstudien	97
Tabelle 9.4: Methodenparameter für die Durchführung der Extraktions- und Interaktionsstudien	98
Tabelle 9.5: Probenpräparation für die Extraktionsstudien mit Gummistopfen CB1 und CB4.....	99
Tabelle 9.6: Probenpräparation für die Interaktionsstudien mit den Gummistopfen CB1 und BB2....	100
Tabelle 9.7: Eluentenherstellung für die präparative HPLC-Methode.....	101
Tabelle 9.8: Methodenparameter der präparativen HPLC-Methode	101
Tabelle 9.9: Methodenparameter der HPLC-MS-Methode zur Identifikation der Substanzstruktur....	102
Tabelle 9.10: Methodenparameter zur Bestimmung von Zink gemäß JP	103
Tabelle 9.11: Methodenparameter zur Bestimmung von Zink gemäß Ph. Eur., USP	104
Tabelle 9.12: Methodenparameter zur Bestimmung von Silikonöl.....	104
Tabelle 9.13: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Aggregatbildung von IgG.....	105
Tabelle 9.14: Prüfschema mit Probeentnahme zu definierten Prüfzeitpunkten (X)	106
Tabelle 9.15: Methodenparameter zur Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von IgG mittels SEC	107
Tabelle 9.16: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Aggregatbildung von EPO	108
Tabelle 9.17: Methodenparameter zur Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von EPO mittels SEC	109
Tabelle 9.18: Probenaufarbeitung für die Aufnahme der Extraktionsprofile der Gummistopfen.....	109
Tabelle 9.19: Ergebnisse der Ermittlung der Responsefaktoren bei 0,01 mg/ml.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 9.20: Ergebnisse der Ermittlung der Responsefaktoren bei 0,005 mg/ml.....	111
Tabelle 11.1: Bestimmung der Linearität bei 220 nm auf den HPLC-DAD Systemen 1 und 2.....	120
Tabelle 11.2: Bestimmung der Linearität bei 254 nm auf den HPLC-DAD Systemen 1 und 2.....	121
Tabelle 11.3: Berechnung des Anlagen-Korrekturfaktors.	123
Tabelle 11.4: Robustheit – Variation der Flussgeschwindigkeit um $\pm 5\%$	124
Tabelle 11.5: Robustheit – Variation der Zusammensetzung von Eluent B.....	124
Tabelle 11.6: Robustheit – Variation des Gradienten	124
Tabelle 11.7: Ergebnisse der Methoden- und Gerätepräzision sowie der intermediären Präzision für die Messung der Pyren-Standardlösung.	127
Tabelle 11.8: Ergebnisse der Methodenpräzision für die Messung der Gummistopfen-Probe.	128
Tabelle 11.9: S/N-Verhältnis für Pyren bei 220 nm.....	129
Tabelle 11.10: S/N-Verhältnis für Pyren bei 254 nm.....	129
Tabelle 11.11: Ergebnisse für LOD und LOQ mittels Signal/Rausch-Verfahren für Pyren.....	130
Tabelle 11.12: Pyren: Rohdaten zur Bestimmung von LOD/LOQ mit Kalibriergeradenverfahren.	131
Tabelle 11.13: Ergebnisse für LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für Pyren	131
Tabelle 11.14: TOTM: Rohdaten zur Bestimmung von LOD/LOQ mit Kalibriergeradenverfahren.	131
Tabelle 11.15: Ergebnisse für LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für TOTM	132
Tabelle 11.16: Stabilität des präparierten Standards.	133
Tabelle 11.17: Stabilität der präparierten Gummistopfen-Probe.....	133
Tabelle 11.18: Berechnung des Korrekturfaktors.....	135
Tabelle 11.19: Ergebnisse der Linearität der Zink-Bestimmung gemäß JP.....	136
Tabelle 11.20: Berechnung von LOD und LOQ der Zink-Bestimmung gemäß JP.	136
Tabelle 11.21: Ergebnisse der Methodenpräzision der Zink-Bestimmung gemäß JP.....	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 11.22: Ergebnisse der intermediären Präzision der Zink-Bestimmung gemäß JP	137
Tabelle 11.23: Ergebnisse der Richtigkeit der Zink-Bestimmung gemäß JP:.....	138
Tabelle 11.24: Proben- und Standardstabilität der Zink-Bestimmung gemäß JP.....	138
Tabelle 11.25: Ergebnisse der Variation der Brennerhöhe um $\pm 0,1$ mm.....	139
Tabelle 11.26: Ergebnisse der Variation des Gasflusses um $\pm 0,1$ l/min.....	139
Tabelle 11.27: Ergebnisse der Linearität der Zink-Bestimmung gemäß Ph. Eur., USP	140
Tabelle 11.28: Berechnung von LOD und LOQ der Zink-Bestimmung gemäß Ph. Eur., USP.....	140
Tabelle 11.29: Methodenpräzision – Ergebnisse	141
Tabelle 11.30: Intermediäre Präzision – Ergebnisse	141
Tabelle 11.31: Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit.	142
Tabelle 11.32: Ergebnisse der Proben- und Standardstabilität.....	142
Tabelle 11.33: Variation der Brennerhöhe um $\pm 0,1$ mm	143
Tabelle 11.34: Variation des Gasflusses um $\pm 0,1$ l/min	143
Tabelle 11.35: Ergebnisse für den Gummistopfen CB1 bei einer Extraktion von 3 h.	144
Tabelle 11.36: Ergebnisse für den Gummistopfen BB6 bei einer Extraktion von 3 h.	144
Tabelle 11.37: <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 unter reflux-Bedingungen mit IPA.....	145
Tabelle 11.38: Ergebnisse der Extraktion von Gummistopfen CB1 mit IPA für die <i>Extractables</i> 1-9.	146
Tabelle 11.39: Migration der <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 3	147
Tabelle 11.40: Migration der <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 2	147
Tabelle 11.41: Migration der <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 5	148
Tabelle 11.42: Migration der <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 4	148
Tabelle 11.43: Migration der <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 7	149
Tabelle 11.44 Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 entfettet.....	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 11.45: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 entfettet. ...	150
Tabelle 11.46: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 entfettet.	151
Tabelle 11.47: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 entfettet. ...	151
Tabelle 11.48: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Silikonöl.	152
Tabelle 11.49: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Silikonöl.	152
Tabelle 11.50: Ergebnisse der Entfettung von Gummistopfen CB1.	153

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Herstellung von Butylgummi (IIR) aus Isobuten und Isopren.....	4
Abbildung 2.2: Halogenierung von Butylgummi	5
Abbildung 2.3: Diffusion nach dem 2. Fick'schen Gesetz	9
Abbildung 2.4: Verteilungskoeffizient $K_{P,F}$	9
Abbildung 2.5: Gleichgewichtskonzentration $c_{F,\infty}$ einer Substanz im Füllgut F	9
Abbildung 2.6: Im Rahmen der Zulassung vorzulegende Unterlagen in Anlehnung an Appendix II der <i>Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials</i>	11
Abbildung 2.7: Sekundärstruktur in Polypeptiden.	15
Abbildung 2.8: Darstellung der Tertiärstruktur in den Proteinen Insulin (a) und (b) Ribonuclease.....	16
Abbildung 2.9: Einteilung verschiedener Einflussfaktoren auf die Immunogenität eines Biopharmazeutikums	22
Abbildung 2.10: Struktureller Aufbau eines IgG-Moleküls.....	25
Abbildung 4.1: Robustheit – Variation der Säulencharge.	34
Abbildung 4.2: Robustheit – Chromatogrammausschnitt bei Variation der Flussgeschwindigkeit.	35
Abbildung 4.3: Robustheit – Variation des Gradienten.	35
Abbildung 4.4: Extraktionsprofile der verschiedenen Gummistopfen.	48
Abbildung 4.5: Extraktionsprofil von Gummistopfen CB1 unter reflux-Bedingungen in Abhängigkeit von der Extraktionszeit.	49
Abbildung 4.6: Vergleich der Extraktionsprofile von Gummistopfen CB2 und CB3.	50
Abbildung 4.7: Chromatogramme von Gummistopfen CB1 in Abhängigkeit von der Lagerdauer.....	51
Abbildung 4.8: Vergleich der <i>Extractables</i> -Konzentration bei Extraktion unter forcierten Lagerbedingungen und unter reflux-Bedingungen von Gummistopfen CB1	52
Abbildung 4.9: Extraktionsstudie von Gummistopfen CB4 mit Wasser und IPA als Extraktionsmittel.	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.10: UV-Spektren der <i>Extractables</i> 6-9.	54
Abbildung 4.11: ¹ H-NMR-Spektrum von <i>Extractable</i> 6.	55
Abbildung 4.12: MS-Spektrum von <i>Extractable</i> 6.	56
Abbildung 4.13: Angenommene Molekülstruktur der <i>Extractables</i> 6, 7, 8, 9.	56
Abbildung 4.14: Migration der <i>Extractables</i> 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 3 nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C / 75 % r. F.	57
Abbildung 4.15: Migrationsverlauf in Gegenwart von 0,1 % PS 80 bzw. 20.	59
Abbildung 4.16: Migrationsverlauf in Gegenwart von 1,0 % PS 80 bzw. 20.	60
Abbildung 4.17: Chromatogramm des Gummistopfenextraktes des Typs CB1.	61
Abbildung 4.18: Chromatogramm des Gummistopfenextraktes des Typs BB6.	61
Abbildung 4.19: Chromatogramme der IgG-Probelösung.	63
Abbildung 4.20: Messung der löslichen und unlöslichen IgG-Aggregate in Abhängigkeit von Gummistopfenextrakt CB1.	65
Abbildung 4.21: Messung der löslichen und unlöslichen IgG-Aggregate in Abhängigkeit von Gummistopfenextrakt BB6.	67
Abbildung 4.22: Entwicklung des IgG-Aggregats in Gegenwart der Gummistopfenextrakte (unbehandelt und entfettet) sowie Silikonöl und Trimellitat.	69
Abbildung 4.23: Entwicklung des IgG-Monomers in Gegenwart der Gummistopfenextrakte (unbehandelt und entfettet) sowie Silikonöl und Trimellitat.	70
Abbildung 4.24: SEC-Chromatogramm von IgG in Gegenwart des Gummistopfenextrakts CB1 (unbehandelt).	71
Abbildung 4.25: SEC-Chromatogramme von IgG in Anwesenheit und Abwesenheit des Gummistopfenextrakts CB1 (unbehandelt).	71
Abbildung 4.26: SEC-Chromatogramme von EPO in Gegenwart von Gummistopfenextrakt CB1 (Versuchsreihe 1).	72
Abbildung 4.27: Aggregatbildung von EPO in Gegenwart des Gummistopfenextraktes CB1.	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 11.1: Chromatogramm der Probe auf 100 %-Level, HPLC-DAD System 1, 220 nm.....	121
Abbildung 11.2: Chromatogramm der Probe auf 100 %-Level, HPLC-DAD System 1, 254 nm.....	122
Abbildung 11.3: Chromatogramm der Probe auf 100 %-Level, HPLC-DAD System 2, 220 nm.....	122
Abbildung 11.4: Chromatogramm der Probe auf 100 %-Level, HPLC-DAD System 2, 254 nm.....	123
Abbildung 11.5: Robustheit bei Variation des pH-Wertes des Puffers der mobilen Phase.	125
Abbildung 11.6: Robustheit – Variation der Ameisensäure.....	125
Abbildung 11.7: Robustheit – Variation der Wellenlänge.....	126
Abbildung 11.8: Robustheit – Variation der Ofentemperatur.	126
Abbildung 11.9: Robustheit – Variation der mobilen Phase B.	127
Abbildung 11.10: Ermittlung von LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für Pyren.	130
Abbildung 11.11: Ermittlung von LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für TOTM.	132
Abbildung 11.12: Konzentration der <i>Extractables</i> 1-9 als Summe aus Gummistopfen CB1 in Abhängigkeit von der Zeit.....	145
Abbildung 11.13: Chromatogramm von EPO als Zoom zur besseren Darstellung der einzelnen EPO- Spezies.....	153
Abbildung 11.14: Chromatogramme von EPO in 0,1 % m/v PS20-ACN-Lösung nach 8 Tagen Lagerung bei 55 °C.....	154
Abbildung 11.15: Chromatogramme von EPO in 0,1 % m/v PS20-ACN-Lösung in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei 55 °C.	154
Abbildung 11.16: Chromatogramme von EPO in Gegenwart des Gummistopfenextrakts CB1 in Abhängigkeit von der Lagerdauer.	155
Abbildung 11.17: MS-Spektrum von <i>Extractable</i> 7.	156
Abbildung 11.18: MS-Spektrum von <i>Extractable</i> 8.	156
Abbildung 11.19: MS-Spektrum von <i>Extractable</i> 9.	157
Abbildung 11.20: ¹³ C-NMR-Spektrum von <i>Extractable</i> 6.....	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 11.21: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von <i>Extractable 6</i>	159
Abbildung 11.22: ^1H -NMR-Spektrum von <i>Extractable 7</i>	160
Abbildung 11.23: ^{13}C -NMR-Spektrum von <i>Extractable 7</i>	161
Abbildung 11.24: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von <i>Extractable 7</i> :	162
Abbildung 11.25: ^1H -NMR-Spektrum von <i>Extractable 8</i>	163
Abbildung 11.26: ^{13}C -NMR-Spektrum von <i>Extractable 8</i>	164
Abbildung 11.27: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von <i>Extractable 8</i>	165
Abbildung 11.28: ^1H -NMR-Spektrum von <i>Extractable 9</i>	166
Abbildung 11.29: ^{13}C -NMR-Spektrum von <i>Extractable 9</i>	167
Abbildung 11.30: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von <i>Extractable 9</i>	168

1 Einleitung

Die Verpackung eines Arzneimittels soll dieses primär vor äußeren Einflüssen schützen, beispielsweise vor Licht oder Feuchtigkeit, und insbesondere dessen Integrität in mikrobiologischer Hinsicht bewahren. Neben der Schutzfunktion muss durch die Verpackung jedoch auch die Arzneimittelsicherheit gewährleistet werden. Die Verpackung soll sich also möglichst inert gegenüber dem Arzneimittel verhalten, sodass weder toxikologisch relevante Stoffe aus der Verpackung in das Arzneimittel migrieren noch andere Wechselwirkungen zwischen Arzneimittel und Verpackung auftreten, die die Wirksamkeit des Arzneimittels negativ beeinflussen. Fungiert die Verpackung nicht nur als Behältnis, sondern auch als Teil der Applikation, muss diese Funktion ebenfalls dauerhaft gewährleistet werden [1].

Die genannten Aspekte betreffen hauptsächlich die Primärverpackung eines Arzneimittels, welche in direktem Kontakt mit dem Arzneimittel steht und daher besonders kritisch betrachtet werden muss. Die Sekundärverpackung (Umverpackung) steht wiederum in direktem Kontakt zur Primärverpackung, weist aber keinen direkten Kontakt zum Arzneimittel selbst auf, erfüllt jedoch unter Umständen weitere Schutzfunktionen [2].

Da die Verpackung auch aus behördlicher Sicht entscheidend für die Arzneimittelsicherheit ist, definieren unter anderem das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.), die *United States Pharmacopeia* (USP) und das Japanische Arzneibuch (JP) in eigenen Kapiteln Qualitätsstandards für gängige Materialien zur Herstellung von Verpackungskomponenten. Zusätzlich werden im USP Empfehlungen zur Durchführung entsprechender Kompatibilitätsprüfungen zur Feststellung von *Extractables* und *Leachables* gegeben [2] [3]. Im Rahmen des Zulassungsverfahrens eines Arzneimittels müssen jedoch nicht ausschließlich Materialien eingesetzt werden, die diesen Qualitätsstandards entsprechen. Stattdessen können von dem Antragsteller auch entsprechende In-House-Spezifikationen vorgelegt werden. Die Kompatibilität von Arzneimittel und Verpackung muss jedoch in jedem Fall durch entsprechende Untersuchungen belegt werden.

Im Ph. Eur. befasst sich Kapitel 3 [4] ausschließlich mit dem Qualitätsstandard von Materialien, die als Komponenten zur Herstellung der Primärverpackung von Arzneimitteln verwendet werden, sowie der Primärverpackung selbst. Bezüglich der spezifizierten Materialien nehmen hierbei Kunststoffe, Kunststoffadditive sowie weitere Hilfsmittel wie Silikonöl großen Raum ein, da Kunststoffe neben Glas einen Großteil der pharmazeutischen Primärverpackungen ausmachen.

So spezifiziert Ph. Eur. 3.1.13 Kunststoffadditive wie beispielsweise Weichmacher, die in Kunststoffmaterialien eingesetzt werden können, und erschien im Januar 2019 als überarbeitete Fassung mit vier zusätzlichen Kunststoffadditiven. Grund für die Überarbeitung war die Einstufung des Weichmachers Diethylhexylphthalat (DEHP, Kunststoffadditiv 01) als sehr bedenkliche Substanz [5], welche aktuell noch in vielen Arzneimittelbehältnissen auf Polyvinylchlorid-Basis eingesetzt wird. Um den Herstellern Alternativen zu diesem potentiell fortpflanzungsschädigenden Stoff aufzuzeigen, wurden die vier Weichmacher Cyclohexan-1,2-dicarboxylsäure, Diisononylester (Kunststoffadditiv 24), Butyryl-tri-n-hexylcitrat (Kunststoffadditiv 25), Triethylhexyltrimellitat (TOTM, Kunststoffadditiv 26) sowie Diethylhexylterephthalat (DEHTP, Kunststoffadditiv 27) in das Kapitel 3.1.13 aufgenommen.

Für Arzneimittel, die in parenteraler Form verabreicht werden, wie es bei vielen rekombinanten Proteinformulierungen der Fall ist, ist das gängigste Verschlussystem der Gummistopfen. Dementsprechend befasst sich das Kapitel 3.2.9 ausführlich mit diesem und wurde im Juli 2018 in seinem Geltungsbereich noch um beschichtete Gummistopfen, Doppelschicht-Dichtungen und gleitfähige Verschlüsse erweitert, um die Vielfalt an kommerziell erhältlichen Verschlussystemen auf Gummibasis besser abbilden zu können [6]. Neben dem klassischen Einsatz als Verschluss von Glasvials, werden Gummistopfen auch als Komponenten in Injektionssystemen oder in medizinischen Einwegartikeln eingesetzt. Beispielsweise werden für Arzneimittelformulierungen mit rekombinanten Proteinen oft Fertigspritzen als Injektionssystem verwendet, in welchen der *Plunger* (also das Druckstück) im Spritzenkörper aus Gummi ist und demnach mit dem Arzneimittel in direktem Kontakt steht.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 *Gummistopfen als Teil der Primärverpackung*

Gummistopfen sind aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften ein essentieller Bestandteil der Primärverpackung von Arzneimitteln und Medizinprodukten. Dank ihrer Elastizität dichten sie sehr gut ab und zeigen auch bei wiederholtem Durchstechen mit einer Nadel eine hohe Wiederverschließbarkeit. Dadurch sind Gummistopfen insbesondere für parenterale Arzneimittel (Parenteralia) wie Injektions- und Infusionslösungen als Teil des Verschlusssystems geeignet. Die gute Wiederverschließbarkeit der Gummistopfen schützt Parenteralia bei Entnahme vor dem Eindringen von Verunreinigungen, Feuchtigkeit und Sauerstoff, wodurch auch nach mehrmaliger Entnahme die Integrität der Parenteralia gewahrt bleibt.

Mit dem Begriff „Gummi“ wurde ursprünglich das elastomere Endprodukt bezeichnet, welches mittels Vulkanisation aus Naturkautschuk hergestellt wurde. Der hierfür verwendete Naturkautschuk wurde hauptsächlich aus dem in Mittel- und Südamerika verbreiteten Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) gewonnen. Da Naturkautschuk jedoch als Naturprodukt ein erhöhtes Allergierisiko aufweist und zusätzlich auch seine Qualität saisonalen Schwankungen unterliegt, wird heute in der pharmazeutischen Industrie hauptsächlich synthetischer Gummi zur Herstellung von Bestandteilen der Primärverpackung verwendet. Ein Großteil der kommerziell erhältlichen Gummistopfen besteht aus Butyl- bzw. Halobutylgummi, welcher neben den bereits genannten Vorteilen zusätzlich eine wesentlich geringere Gaspermeabilität als Naturkautschuk aufweist. Bei Butylgummi handelt es sich um das mittels kationischer Polymerisation hergestellte Copolymer aus Isobuten und Isopren, das an den verbliebenen Doppelbindungen vulkanisierbar ist (siehe Abbildung 2.1).

Bei der Vulkanisation werden die einzelnen Polymerketten miteinander durch Schwefel-Brücken-Bindungen verbunden, wodurch eine dreidimensionale Struktur entsteht. Da Halogenatome eine bessere Abgangsgruppe darstellen als Wasserstoffatome, ermöglicht eine vorherige Halogenierung von Butylgummi zu Halobutylgummi (siehe Abbildung 2.2) eine anschließende Vulkanisation unter mildereren Bedingungen. Im Vulkanisationsprozess wird neben hohem Druck und Temperatur eine Vielzahl von Chemikalien eingesetzt, um die gewünschten Materialeigenschaften – primär Elastizität – zu erreichen.

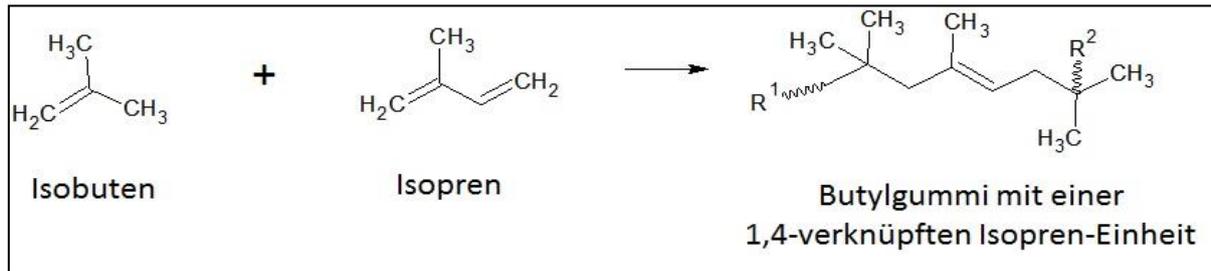


Abbildung 2.1: Herstellung von Butylgummi (IIR) aus Isobuten und Isopren (entnommen von Schäfer [7]).

Die Herstellung erfolgt hauptsächlich mittels Fällungsverfahren. Hierbei werden Isobuten und Isopren in Chlormethan gelöst und auf -100 °C abgekühlt. Anschließend wird durch die Zugabe der Lewis-Säure Aluminiumtrichlorid (AlCl_3) als Initiator die kationische Polymerisation ausgelöst. Die nach der Polymerisation noch vorhandenen Doppelbindungen können mit oder ohne vorherige Halogenierung direkt zur Vulkanisation verwendet werden.

Grundlage der Elastizität ist die bereits angesprochene Vernetzung der einzelnen Polymerketten in die dreidimensionale Struktur, wofür Vulkanisatoren und Beschleuniger benötigt werden. Bei dem vorherrschenden Verfahren der Schwefelvulkanisation werden hierfür Schwefel oder Schwefel-abspaltende Verbindungen eingesetzt. Es existieren jedoch auch alternative Vulkanisationsverfahren unter anderem (u. a.) basierend auf Peroxiden, Phenol/Formaldehydharzen [7], die aber aufgrund der geringeren Wirtschaftlichkeit weniger verbreitet sind. Weiterhin können für die schwefelfreie Vulkanisation auch Metalloxide verwendet werden.

Als Vulkanisationssystem hat sich hierbei Zinkoxid in Kombination mit Phenolharzen bewährt, wobei sich die erforderliche Vulkanisationszeit merklich reduziert. Neben dem Vulkanisationssystem werden weitere Chemikalien eingesetzt, die zur Optimierung der Materialeigenschaften beitragen. So werden Weichmacher (u. a. Phthalate und Paraffine) eingesetzt, um den Gummi weicher und biegsamer zu machen. Mineralische Füllstoffe wie Magnesiumoxid oder -silikat beeinflussen physikalische Eigenschaften wie Bruchfestigkeit und Härte des finalen Gummimaterials. Als klassische Antioxidantien werden Phenole und Amine als Schutz gegen den oxidativen Abbau eingesetzt. Dies ist insbesondere bei Naturkautschuk notwendig, da dieser aufgrund seiner ungesättigten Struktur besonders anfällig für oxidativen Abbau ist. Bei Butylgummi und Halobutylgummi kann hingegen auf den Einsatz von Antioxidantien nahezu verzichtet werden, da diese eine gesättigte Struktur aufweisen und sehr widerstandsfähig gegenüber oxidativem Abbau sind. Für die Farbgebung enthält der fertige Gummi zusätzlich noch Pigmente, bei denen es sich entweder um anorganische Salze oder organische Farbstoffe handelt [8].

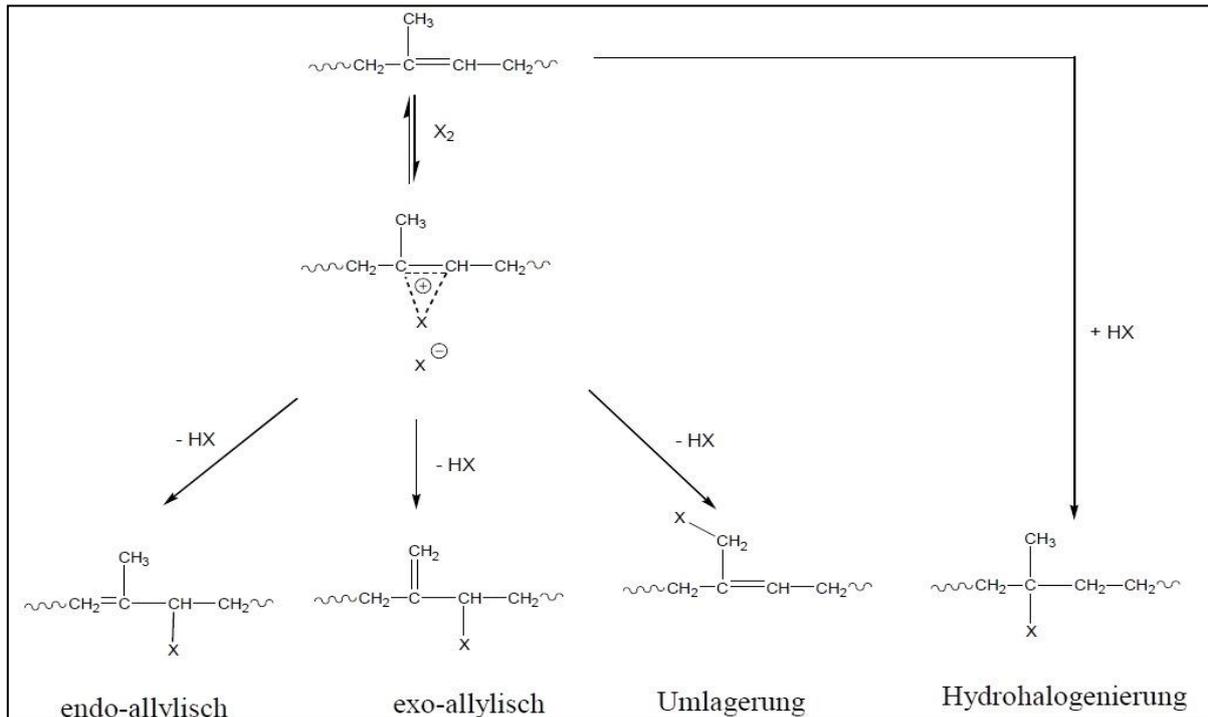


Abbildung 2.2: Halogenierung von Butylgummi (entnommen von Schäfer [7]). Die Halogenierung von Butylgummi mit elementarem Chlor oder Brom findet in Hexan als Lösungsmittel statt. Es werden verschiedene Produkte gebildet, hauptsächlich jedoch das exo-allylische Produkt (zu etwa 80 %).

Für die Herstellung von Gummistopfen sind mehrere Prozessschritte notwendig. Zunächst werden die erforderlichen Materialien eingewogen und in einem Mixer unter Temperaturerwärmung miteinander vermischt. Die resultierende Mischung wird anschließend gewalzt und mittels Extruder zu Pellets, Fellen oder Strängen gepresst. Diese werden in die entsprechende Vulkanisierform eingebracht und bei hohem Druck und Temperatur vulkanisiert. Abschließend werden die Gummistopfen aus den nun vorliegenden vulkanisierten Gummifellen ausgestanzt und gewaschen. Zusammen mit dem Waschvorgang wird meist eine Silikonisierung kombiniert, da ohne diese die Gummistopfen einerseits aufgrund ihrer Materialeigenschaften zusammenkleben würden, andererseits erhöht die Silikonisierung die Gleitfähigkeit und Maschinengängigkeit des Gummistopfens [9]. Die eingesetzten Chemikalien liegen nach der Vulkanisation im Butyl- bzw. Halobutylgummi und damit auch im fertigen Gummistopfen als ungebundene Moleküle vor und können sich durch diesen frei bewegen (siehe hierzu auch Kapitel 2.2). Diese ungebundenen Moleküle aus dem Gummistopfen können ebenso wie anhaftendes Silikonöl in das Arzneimittel migrieren, wodurch ungewollte Wechselwirkungen zwischen diesem und dem Arzneimittel ermöglicht werden.

Eine Alternative zu den traditionellen silikonisierten Gummistopfen stellen zunehmend laminierte bzw. beschichtete Gummistopfen dar, da die Fluoropolymer-Beschichtung als Barriere fungiert und damit die Migration von Substanzen aus dem Gummistopfen in das Arzneimittel reduzieren kann. Zusätzlich kann bei beschichteten Gummistopfen oft auf eine Oberflächensilikonisierung verzichtet werden [9].

Da Gummistopfen/Gummitteile als Bestandteil der Primärverpackung in direktem Kontakt mit dem Arzneimittel stehen und ungewollte Wechselwirkungen auftreten können, definieren die Arzneibücher einen Qualitätsstandard für diese. Für den europäischen Raum ist dieser Qualitätsstandard im Ph. Eur. 3.2.9 *Rubber closures for containers for aqueous parenteral preparations, for powders and freeze-dried powders* [10] definiert, für den amerikanischen Raum gilt hingegen das USP <381> *Elastomeric closures for injections* [11], für den asiatischen Raum gilt das JP 7.03 *Tests for Rubber Closures for Aqueous Infusions* [12].

Neben Prüfungen zur Identifikation und Funktionalität (auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll) enthalten die genannten Monographien verschiedene Reinheitsprüfungen, die alle mit einer Prüflösung durchgeführt werden, welche zuvor aus den zu prüfenden Gummistopfen hergestellt werden muss. Das Ph. Eur. und USP unterscheiden hierbei abhängig von ihrer Reinheit zwischen Gummistopfen des Typs 1 und 2. Typ 1-Gummistopfen müssen den höchsten Anforderungen entsprechen und daher die Spezifikationen aller definierten Reinheitsprüfungen erfüllen. Typ 2-Gummistopfen müssen hingegen nicht allen Spezifikationen entsprechen, da bei diesen die mechanischen Eigenschaften im Vordergrund stehen und sie daher eher für spezielle Anwendungen gedacht sind. Die Optimierung der mechanischen Eigenschaften lässt sich jedoch oft nur auf Kosten der Reinheit durch den Einsatz weniger „sauberer“ Hilfsmittel beim Vulkanisationsprozess bewerkstelligen. Meist werden diese Gummistopfen dann auch aus Naturkautschuk als Ausgangsstoff hergestellt.

Während sich Ph. Eur. und USP bezüglich der Prüfung von Gummistopfen weitestgehend entsprechen, unterscheidet sich die entsprechende Monographie im JP merklich. So ist im JP keine Unterscheidung der Gummistopfen in Typ 1 und Typ 2 vorgesehen und auch der Prüfumfang unterscheidet sich hinsichtlich der vorgeschriebenen Parameter und Spezifikationen von Ph. Eur./USP. Vor Publikation der komplett überarbeiteten Monographie in der 17. Edition des JP stellte jedoch die Herstellung der Prüflösung den markantesten Unterschied dar. Gemäß JP erfolgte diese gewichtsabhängig, d. h. pro 1 g Gummistopfen wurden 10 ml Wasser zugesetzt und autoklaviert. Ph. Eur. und USP schreiben hingegen eine

oberflächenabhängige Herstellung der Prüflösung vor, d. h. die Verwendung von 2 ml Wasser pro 1 cm² Gummistopfen. Insbesondere bei kleineren und leichteren Gummistopfen resultierte dadurch bei der Prüflösung gemäß JP ein relativ großes Oberflächen-Lösungsmittel-Verhältnis, verglichen mit der Prüflösung gemäß Ph. Eur. und USP. Dadurch fielen diese Gummistopfen oft bei der Prüfung gemäß JP durch, während sie gleichzeitig den im Ph. Eur. und USP vorgegebenen Spezifikationen entsprachen.

In der 17. Edition (Veröffentlichung: 01.04.2016) des JP wurde daher die Präparation der Prüflösung an Ph. Eur. und USP angeglichen, sodass seither auch nach JP die Herstellung der Prüflösung oberflächenabhängig erfolgt. Zusätzlich wurde der *Schaum-Test* im Zuge der Überarbeitung gestrichen. Mit der wässrigen Prüflösung werden anschließend verschiedene Prüfungen durchgeführt, die jedoch nicht auf die Identifikation spezifischer extrahierbarer Substanzen abzielen, stattdessen handelt es sich hauptsächlich um die Erfassung einzelner Substanzklassen, die Rückschlüsse auf die eingesetzten Vulkanisationssysteme zulassen. Die zum Zeitpunkt der praktischen Arbeiten geforderten Parameter gemäß Ph. Eur., USP und JP sind in Kapitel 9.1.6 detailliert aufgeschlüsselt.

2.2 Interaktion zwischen Arzneimittel und Primärverpackung

An die Primärverpackung von Arzneimitteln werden hohe Anforderungen gestellt, wobei die FDA empfiehlt, diese risikobasiert zu definieren [1] und die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung zwischen Arzneimittel und Primärverpackung mit der Kritikalität der Darreichungsform des Arzneimittels zu kombinieren. Gemäß Tabelle 2.1 besteht für feste Darreichungsformen wie Tabletten oder Kapseln nur eine geringe Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung mit dem Packmittel, für flüssige und halbfeste Darreichungsformen wird die Wahrscheinlichkeit hingegen als hoch eingeschätzt.

Grund hierfür ist, dass eine mögliche Interaktion zwischen der Primärverpackung und dem Arzneimittel als Füllgut letztendlich immer auf kinetischen Diffusionsprozessen und thermodynamischen Verteilungsprozessen beruht. Diese können dazu führen, dass Stoffe aus der Primärverpackung in das Arzneimittel diffundieren (Migration) oder aus der Umgebung durch die Primärverpackung hindurch in das Arzneimittel gelangen (Permeation). Es ist jedoch auch der umgekehrte Weg denkbar, d. h. dass Stoffe aus dem Arzneimittel in die Primärverpackung hineindiffundieren (Absorption) oder durch diese hindurch diffundieren (Permeation) oder physikochemisch an diese gebunden werden (Adsorption) [13].

Tabelle 2.1: Wahrscheinlichkeit von Interaktionen zwischen Arzneimittel und Primärverpackung in Abhängigkeit von der Darreichungsform (entnommen aus *Guidance for Industry* [1]). Die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung von Packmittel und Darreichungsform ist abhängig von der Beschaffenheit des Arzneimittels, wobei für flüssige Arzneimittel eine höhere Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung angenommen wird als für feste Arzneimittel. Die Einschätzung der Kritikalität einer möglichen Wechselwirkung ist abhängig von der Applikationsform. Demnach werden Wechselwirkungen zwischen Packmittel und Arzneimittel als besonders kritisch für Inhalations-, Injektions- und Infusionslösungen eingestuft.

Examples of Packaging Concerns for Common Classes of Drug Products

Degree of Concern Associated with the Route of Administration	Likelihood of Packaging Component-Dosage Form Interaction		
	High	Medium	Low
Highest	Inhalation Aerosols and Solutions; Injections and Injectable Suspensions ^a	Sterile Powders and Powders for Injection; Inhalation Powders	
High	Ophthalmic Solutions and Suspensions; Transdermal Ointments and Patches; Nasal Aerosols and Sprays		
Low	Topical Solutions and Suspensions; Topical and Lingual Aerosols; Oral Solutions and Suspensions	Topical Powders; Oral powders	Oral Tablets and Oral (Hard and Soft Gelatin) Capsules

Die Diffusion von Molekülen beruht auf der Brown'schen Molekularbewegung und findet aufgrund der besseren Teilchenbeweglichkeit in Gasen und Flüssigkeiten mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit als in Feststoffen statt (ausgedrückt durch den Diffusionskoeffizienten), weshalb für flüssige Arzneimittelformen sowie Aerosole zur Inhalation eine Interaktion mit dem Packmittel wahrscheinlicher ist als bei festen Arzneiformen.

Kinetisch beschrieben wird die Diffusion ungebundener Moleküle durch das Packmittel, beispielsweise durch einen Gummistopfen, mit dem 2. Fick'schen Diffusionsgesetz [14], welches besagt, dass der Massentransport in Richtung eines Konzentrationsgradienten stattfindet um diesen auszugleichen. Da dieses Konzentrationsgefälle weder zeitlich noch örtlich konstant ist, resultiert eine Differentialgleichung, welche die örtliche Konzentrationsänderung ∂c als Funktion von der Zeit t beschreibt:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \text{mit} \quad D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

Abbildung 2.3: Diffusion nach dem 2. Fick'schen Gesetz mit Konzentration c , Zeit t , Diffusionskoeffizienten D , Abstand x , Boltzmann-Konstante k , absolute Temperatur T , Kreiszahl π , Viskosität der Matrix η und dem Molekülradius r

Nach der Diffusion durch das Packmittel wird das Ausmaß der Migration an der Grenzfläche zwischen Packmittel und Füllgut hauptsächlich durch den Verteilungskoeffizienten $K_{P,F}$ bestimmt, welcher definitionsgemäß das Verhältnis der Konzentration einer Substanz im Packmittel P zu der Konzentration im Füllgut F in einem geschlossenen System im thermodynamischen Gleichgewicht darstellt. Dieser ist sowohl von der Löslichkeit der Substanz im Packmittel und dem Füllgut als auch von der Viskosität des Füllguts abhängig [13].

$$K_{P,F} = \frac{c_{P,\infty} \rho_P}{c_{F,\infty} \rho_F}$$

Abbildung 2.4: Verteilungskoeffizient $K_{P,F}$ mit der Gleichgewichtskonzentration einer Substanz in Packmittel und Füllgut $c_{P,\infty}/c_{F,\infty}$ und der Dichte ρ von Packmittel P und Füllgut F

Das Ausmaß der Migration einer Substanz aus dem Packmittel in das Füllgut lässt sich folgendermaßen abschätzen [15]:

$$c_{F,\infty} = \frac{m_F}{V_F} = \frac{m_{P,0}}{[V_F + (K_{P,F} \times A \times d)]}$$

Abbildung 2.5: Gleichgewichtskonzentration $c_{F,\infty}$ einer Substanz im Füllgut F mit der Masse der Substanz im Füllgut m_F und im Packmittel zu Beginn $m_{P,0}$, dem Volumen des Füllguts V_F , dem Verteilungskoeffizienten $K_{P,F}$, der Oberfläche des Packmittels A und der Dicke des Packmittels d

Die Kritikalität einer möglicherweise auftretenden Wechselwirkung zwischen Packmittel und Arzneimittel ist abhängig von der Applikationsform: So besitzen beispielsweise oral verabreichte Arzneimittel wie Tabletten und Kapseln eine niedrige Kritikalität, da bei diesen einerseits der Wirkstoff langsam freigesetzt wird und andererseits die Einnahme anwenderfreundlich für den Patienten ist. Zu den kritischsten Darreichungsformen zählen dagegen neben Inhalationslösungen auch Parenteralia, da diese subkutan, intradermal,

intramuskulär oder intravenös verabreicht werden. Die direkte Injektion in Körpergewebe bzw. Kreislauf bietet den Vorteil einer schnellen Wirkstoffaufnahme und damit Arzneimittelwirkung, führt jedoch auch dazu, dass in Verbindung mit diesen Darreichungsformen häufiger schwere Arzneimittelnebenwirkungen beobachtet werden, wobei hierbei auch praktische Anwendungsfehler eine Rolle spielen [16].

Unabhängig davon, ob die Bestandteile der Primärverpackung dem in den Arzneibüchern definierten Qualitätsstandards entsprechen oder eine andere Qualität gewählt wurde, muss im Rahmen des Zulassungsverfahrens eines Arzneimittels die Eignung der Primärverpackung hinsichtlich der Faktoren *Schutz*, *Kompatibilität*, *Sicherheit* und *Funktionalität* gezeigt werden [1].

Für Komponenten der Primärverpackung auf Kunststoffbasis ist der Umfang der einzureichenden Eignungsprüfungen in der *Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials* [17] näher erläutert. Diese Guideline bezieht sich auf das Zulassungsverfahren von Human- und Tierarzneimitteln und wurde 2005 von der EMA publiziert, um weiterführende Informationen zu den Direktiven 2003/63/EC (Verbesserung der Richtlinie 2001/83/EC zu Medizinprodukten im Humanbereich) und 2001/82/EC (zu Medizinprodukten im Veterinärbereich) bereitzustellen. Appendix II dieser Guideline beschreibt einen Entscheidungsbaum zu den für die Zulassung erforderlichen Unterlagen in Abhängigkeit von der Darreichungsform und ist in Abbildung 2.6 vereinfacht dargestellt.

Wird beispielsweise die Primärverpackung eines parenteralen Arzneimittels aus Materialien hergestellt, die weder im Ph. Eur. noch in der Pharmakopöe eines Mitgliedsstaates definiert sind, sind bei der Zulassung neben allgemeinen Informationen und Spezifikationen auch Extraktions- und Interaktionsstudien sowie die toxikologischen Informationen vorzulegen. Sind die Materialien hingegen im Ph. Eur. oder in der Pharmakopöe eines Mitgliedsstaates definiert, kann auf die Vorlage von Extraktionsstudien und toxikologischen Informationen verzichtet werden, Interaktionsstudien müssen jedoch auch in diesem Fall eingereicht werden.

Bei Extraktionsstudien werden die finale Primärverpackung, ihre einzelnen Komponenten oder das unverarbeitete Kunststoffmaterial unter Laborbedingungen mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln versetzt, mit dem Ziel, potentielle organische oder anorganische chemische Substanzen freizusetzen (*Extractables*). Die angewandten Laborbedingungen können weitaus aggressiver gewählt werden als die späteren anwendungsgemäßen

Lagerbedingungen des finalen Arzneimittels in seiner Primärverpackung, da sie lediglich dem Zwecke dienen, das Maximum an Informationen bzw. *Extractables* zu erhalten [2].

Darreichungsform	Oralia, Topika		Parenteralia, Inhalanda, Ophthalmika			
	fest	halbfest, flüssig		fest	halbfest, flüssig	
Material beschrieben in		Ph.Eur., Pharmakopöe eines Mitgliedsstaates oder zugelassen für LM?			Ph.Eur. oder Pharmakopöe eines Mitgliedsstaates?	
		ja	nein		ja	nein
Allgemeine Information	X	X	X	X	X	X
Spezifikation	X	X	X	X	X	X
Interaktionsstudien		X	X	ggf.	X	X
Extraktionsstudien			X			X
Toxikologische Information			X			X

Abbildung 2.6: Im Rahmen der Zulassung vorzulegende Unterlagen in Anlehnung an Appendix II der *Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials* (entnommen aus [13]), LM: Lebensmittel

In der *Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials* versteht man unter "Interaktionsstudien" generell Studien bei denen die finale Primärverpackung, einzelne Komponenten von dieser oder das unverarbeitete Kunststoffmaterial mit dem späteren aktiven pharmazeutischen Wirkstoff (API) oder der finalen Arzneimittelformulierung selbst in Kontakt gebracht werden und wechselwirken können.

Migrationsstudien sind Interaktionsstudien, bei denen Extraktionsbedingungen gewählt werden, die der späteren anwendungsgemäßen Lagerung der finalen Arzneimittelformulierung entsprechen, mit dem Ziel festzustellen, ob und in welcher Konzentration während der späteren definierten Haltbarkeitsdauer (auch als Laufzeit bezeichnet) organische oder anorganische chemische Substanzen aus der Primärverpackung in das Arzneimittel migrieren können (*Leachables*). Im Rahmen einer Migrationsstudie festgestellte *Leachables* sind daher immer als Teilmenge der zuvor festgestellten *Extractables* zu verstehen. Dementsprechend müssen Migrationsstudien zwingend durchgeführt werden, wenn bei vorhergegangenen Extraktionsstudien *Extractables* gefunden wurden.

Für die Wahl der Extraktionsbedingungen einer Migrationsstudie kann die ICH Guideline Q1A (R2) *Stability Testing of new Drug Substances and Products* [18] zur Orientierung

dienen. Diese gibt Hinweise zur Durchführung von Stabilitätsstudien für Arzneimittel, die im Rahmen des entsprechenden Zulassungsverfahrens vorgelegt werden müssen. Für Arzneimittel, die eine Kühlung erfordern, wird die Durchführung von entsprechenden Langzeitstabilitätsstudien bei $5 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Mindestdauer von 12 Monaten und beschleunigten Stabilitätsstudien bei $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C} / 60 \pm 5 \text{ } \%$ r. F. für eine Mindestdauer von sechs Monaten als notwendig erachtet. Die ICH Guideline Q5C *Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products* [19] enthält weitere Vorgaben für Biopharmazeutika, insbesondere bezüglich zusätzlicher Analysetechniken, und entspricht weitestgehend der ICH Guideline Q1A (R2). Jedoch wird explizit betont, dass die in der ICH Guideline Q1A (R2) genannten Lagerbedingungen für beschleunigte Stabilitätsstudien bei Biopharmazeutika ungeeignet sein können und bezogen auf den Einzelfall ausgewählt werden müssen.

Auch die 2017 in der USP erschienenen Monographien <1663> und <1664> bieten Empfehlungen zur Durchführung von Extraktions- und Migrationsstudien (bezeichnet als *Extraction studies* und *Leachables studies*) [2] [3], haben jedoch lediglich informativen Charakter und beinhalten keine spezifischen Methoden oder Spezifikationen. Dies ist der Komplexität der Thematik geschuldet, da die Zusammensetzung von Primärverpackung und Arzneimittel selbst eine hohe Variabilität aufweist. So kann selbst bei Vorliegen einer vollständigen Liste der eingesetzten Rohmaterialien nicht auf die Durchführung einer Extraktionsstudie verzichtet werden, da die potentiellen *Extractables* auch ungewollt in den eingesetzten Rohmaterialien vorliegen können, beispielsweise in Form von Verunreinigungen. Ebenfalls denkbar ist die Entstehung von *Extractables* durch chemische Reaktionen zwischen Arzneimittelformulierung und Primärverpackung [20]. Hinzu kommen *Extractables*, die während des Herstellungsprozesses in die Primärverpackung eingetragen werden [21].

Die Durchführung einer Extraktionsstudie ist komplex, da aufgrund der chemischen Diversität der möglichen *Extractables* verschiedene Parameter wie die Polarität des Extraktionsmediums, die Extraktionsdauer, die Extraktionstemperatur und auch das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen die Konzentration, Art und Anzahl der gefundenen *Extractables* beeinflussen können. Zudem richtet sich die Wahl der eingesetzten Extraktionsparameter nach dem definierten Ziel der Extraktionsstudie. So kann bei einer Extraktionsstudie mit dem Ziel der Materialcharakterisierung von Komponenten der Primärverpackung der Einsatz organischer Lösungsmittel sinnvoll sein, während bei einer

Extraktionsstudie mit dem Ziel eines *worst case* Profils der späteren potentiellen *Leachables* die Arzneimittelformulierung selbst ein sinnvolles Extraktionsmedium sein kann [2]. Die anschließend erfolgenden Migrationsstudien sind zeitaufwendig, und die dabei resultierenden *Leachables* liegen meist nur in sehr niedriger Konzentration vor, was eine anschließende Identifikation und toxikologische Bewertung erschwert. In diesen Fällen empfiehlt das USP die Durchführung einer Simulationsstudie, bei der es sich eigentlich um eine Extraktionsstudie handelt, da bei dieser die Arzneimittelformulierung durch ein geeignetes Simulationsmedium (beispielsweise durch den entsprechenden Placebo) ersetzt und die Lagerbedingungen deutlich aggressiver gestaltet werden, um ein höheres *Leaching* in einer kürzeren Zeitspanne zu erreichen [3].

Leachables sind insofern von Interesse, da sie unter Umständen die Wirksamkeit, Sicherheit und Qualität eines Arzneimittels negativ beeinflussen [3], indem sie entweder selbst ein toxikologisches Risiko darstellen oder mit dem pharmazeutisch aktiven Wirkstoff bzw. anderen Bestandteilen der Arzneimittelformulierung wechselwirken können. Ein Beispiel für toxikologisch relevante *Leachables* stellt Bisphenol-A-Diglycidylether (BADGE) dar, welches zur Herstellung der Innenschutzbeschichtung von Aluminiumtuben für den pharmazeutischen Gebrauch verwendet wird. Im Rahmen von Migrationsstudien wurde diese Substanz, die vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) als bedeutendes Kontaktallergen bewertet wird, als *Leachable* in verschiedenen halbfesten Darreichungsformen detektiert [13]. Ebenfalls als *Leachable* bekannt ist das bereits erwähnte DEHP (siehe hierzu auch Kapitel 1), welches als Weichmacher in Medizinprodukten auf Polyvinylchlorid-Basis eingesetzt wird und als potentiell fortpflanzungsschädigend [5] gilt. In verschiedenen Studien wurde das *Leaching* von DEHP aus Medizinprodukten nachgewiesen [22]. Insbesondere das *Leaching* aus Infusionsbeuteln in parenterale Ernährungslösungen besitzt eine hohe Kritikalität, da diese meist über einen längeren Zeitraum hinweg verabreicht werden, wodurch Patienten einer erhöhten Exposition ausgesetzt sind [23].

Es existieren auch verschiedene Untersuchungen zu ungewünschten Wechselwirkungen von *Leachables* mit dem pharmazeutisch aktiven Wirkstoff selbst in einer Arzneimittelformulierung. So fanden Seidl *et al.* lösliches Wolfram als Kontaminanten in vorgefüllten Spritzen, das von den *Pins* stammte, mit welchen während der Produktion der *Fluid path* der Spritze hergestellt wird. Diese festgestellten Wolfram-Spezies verursachten Proteindenaturierung und -aggregation während einer klinischen Studie vor Markteinführung eines *Biosimilar* Epoetins [21]. Neben Wolfram wurden in verschiedenen Studien auch

andere Metallionen in den Arzneimittelformulierungen festgestellt, die primär von den Glaskomponenten der Primärverpackung und des Herstellungsprozesses stammen und mitunter zu Proteinaggregation und Präzipitation führen können [24].

Doch auch die verschiedenen Membranfiltersysteme, die im Rahmen von Herstellung, Aufreinigung und Abfüllung proteinhaltiger Lösungen eingesetzt werden, können die Quelle von *Leachables* im späteren Arzneimittel sein. Eine Studie mit den gängigen Membranfilter-Typen Polyvinylidenfluorid (PVDF), Polyethersulfon (PES) und Cellulose-Mischester (MCE) und einer IgG2-Modellformulierung zeigte, dass nicht nur *Leachables* aus dem Filtermaterial in der Modellformulierung detektiert werden konnten, sondern dass diese auch oberflächenaktive Eigenschaften ähnlich eines Löslichkeitsvermittlers aufwiesen und auf das Modellprotein einen destabilisierenden Effekt hatten [25].

Auch bei einem bereits zugelassenen und seit Jahren etablierten Arzneimittel können bereits geringfügige Veränderungen der Arzneimittelformulierung oder der Primärverpackung zu einem veränderten *Leachables*-Profil führen. So führte ein Austausch von humanem Serumalbumin (HSA) als ursprünglichem Löslichkeitsvermittler gegen Polysorbat 80 in Eprex® zu einem vermehrten *Leaching* aus dem unbeschichteten Gummistopfen in das Arzneimittel [26] (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.4).

2.3 Arzneimittelformulierungen mit rekombinanten Proteinen

2.3.1 Technische Herausforderungen einer stabilen Arzneimittelformulierung

In den letzten Jahren hat die Zahl der zugelassenen Biopharmazeutika stetig zugenommen. Ende 2020 waren in Deutschland insgesamt 339 Biopharmazeutika zugelassen, wobei davon 25 Biopharmazeutika allein im Jahr 2020 neu hinzukamen, was 45 % aller Neuzulassungen in 2020 entspricht. Da sich zu diesem Zeitpunkt weitere 657 Biopharmazeutika in der klinischen Entwicklung befanden, ist mit einer weiteren Zunahme an Neuzulassungen zu rechnen [27].

Definitionsgemäß handelt es sich bei Biopharmazeutika um Arzneimittel, die von gentechnisch veränderten, lebenden Mikroorganismen, tierischen oder pflanzlichen Zellen produziert werden. Dies bedeutet, dass diese Organismen erst durch das künstliche Einschleusen eines entsprechenden Gens dazu befähigt werden, die gewünschten Proteine,

Peptide oder Nucleinsäuren zu bilden, die anschließend u. a. zur Therapie von Krebs, Autoimmunerkrankungen oder Stoffwechselstörungen eingesetzt werden [28].

Da es sich bei Proteinen um Makromoleküle (ab einer Kettenlänge von 100 Aminosäuren spricht man von einem Protein) mit dreidimensionaler Struktur handelt, deren pharmakologische Wirksamkeit auf ihrer biologischen Aktivität beruht, sind sie verglichen mit chemischen Wirkstoffen weitaus empfindlicher.

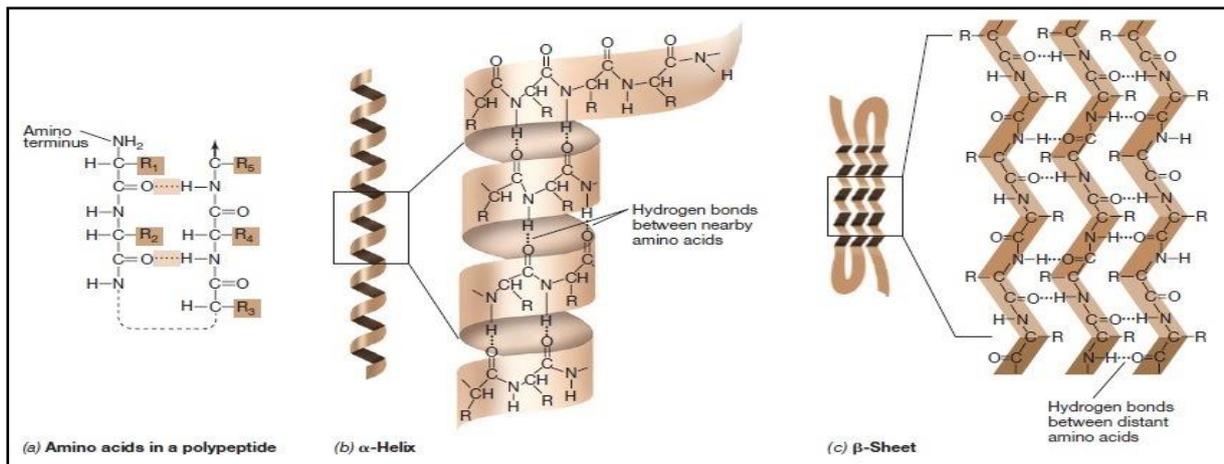


Abbildung 2.7: Sekundärstruktur in Polypeptiden. (a) Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen, durch welche sich dreidimensionale Strukturen wie die alpha-Helix (b) oder auch das beta-Faltblatt (c) ausbilden. Entnommen aus [29].

Die Klassifizierung der Proteinstruktur erfolgt auf vier Ebenen: Die Primärstruktur stellt die einfachste Ebene dar und bezeichnet die bloße Abfolge der Aminosäuren in den Polypeptidketten. In den vorliegenden Polypeptidketten bilden die durch Peptidbindung miteinander kovalent verbundenen Atome das Polypeptidrückgrat, an welchem die Aminosäurereste, d. h. die Seitenketten der einzelnen Aminosäuren, hängen. Da die vorliegenden Carbonyl- und Amino-Gruppen des Polypeptidrückgrats untereinander Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, bildet sich hierdurch die Sekundärstruktur aus (siehe Abbildung 2.7). Aufgrund der Vielzahl der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen ergibt sich eine nahezu unbegrenzte Anzahl an möglichen Proteinkonformationen, von denen jedoch die alpha-Helix, das beta-Faltblatt und das *Random Coil* die bekanntesten Sekundärstrukturelemente darstellen.

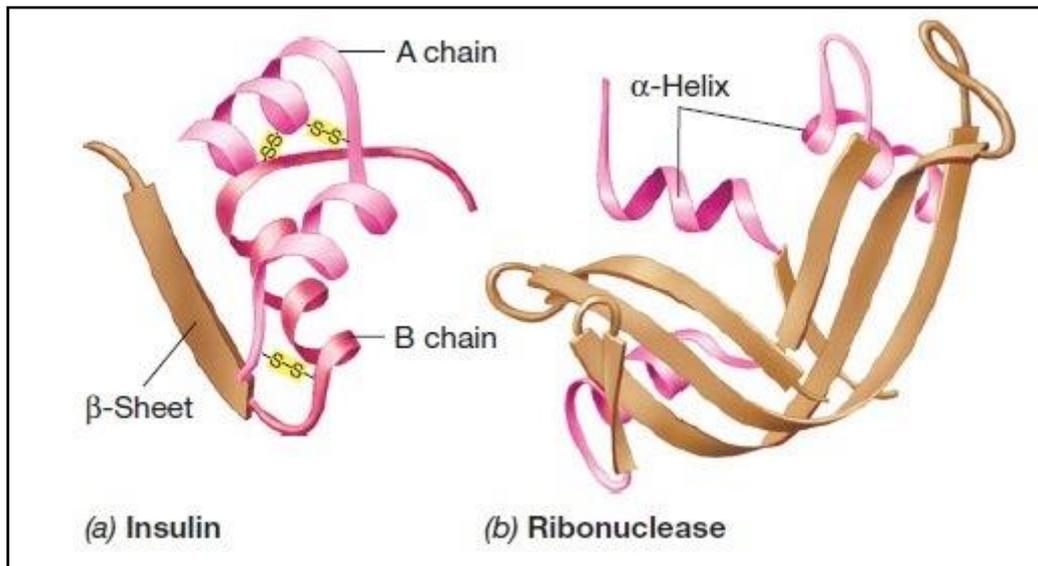


Abbildung 2.8: Darstellung der Tertiärstruktur in den Proteinen Insulin (a) und (b) Ribonuclease. Entnommen aus [29]

Da auch die Aminosäurereste der verschiedenen Sekundärstrukturelemente untereinander kovalente und nicht-kovalente Bindungen eingehen, ergibt sich durch diese Wechselwirkungen die dreidimensionale Anordnung eines Proteins, d. h. seine Tertiärstruktur. Bei den Bindungen handelt es sich hauptsächlich um Disulfidbrücken zwischen verschiedenen schwefelhaltigen Aminosäuren, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Lagern sich mehrere Tertiärstrukturen, d. h. dreidimensionale Untereinheiten, zu größeren Einheiten zusammen, bilden sie die sogenannte Quartärstruktur, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und Coulombsche Kräfte stabilisiert wird. Proteine mit Quartärstruktur werden unterschieden in Faserproteine, globuläre Proteine und Proteinkomplexe.

Die biologische Aktivität von Proteinen beruht auf deren nativer Tertiär- bzw. Quartärstruktur, sodass schon geringfügige strukturelle Veränderungen zu einer Verminderung oder im schlimmsten Fall zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen können. Proteininstabilitäten werden in chemische und physikalische Instabilitäten unterschieden.

Chemische Instabilitäten (u. a. Hydrolyse, Deamidierung, Oxidation) beruhen auf einer Veränderung der kovalenten Bindungen, wobei dies sowohl die Bildung neuer Bindungen als auch den Bruch bereits bestehender Bindungen einschließt.

Physikalische Instabilitäten hingegen verändern die räumliche Proteinstruktur, während die kovalenten Bindungen unverändert bleiben [30]. Zu den physikalischen Instabilitäten zählen

etwa die Denaturierung, Aggregation, Ausfällung und Adsorption von Proteinen wobei insbesondere die Proteinaggregation intensiv erforscht wird, da diese im schlimmsten Fall zu einer körpereigenen lebensbedrohlichen Immunantwort führen kann (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.3).

Aufgrund der empfindlichen Proteinstruktur sind biopharmazeutische Formulierungen komplex in ihrer Zusammensetzung und enthalten eine Vielzahl an Stoffen, die in ihrem Zusammenspiel das Protein schützen und Instabilitäten vermeiden sollen [31]. Bestandteile solcher Formulierungen sind u. a. Puffersalze, Natriumchlorid, Zucker, Co-Solventien, Antioxidantien und Löslichkeitsvermittler.

Puffersalze sind notwendig, da schon geringfügige Änderungen des pH-Wertes die Proteininstabilität und -löslichkeit negativ beeinflussen können und die Löslichkeit insbesondere am isoelektrischen Punkt auf ein Minimum abfällt [32]. Natriumchlorid und Zucker dienen hauptsächlich zur Einstellung von Ionenstärke und Osmolarität, da eine Arzneimittelformulierung bei intravenöser Verabreichung isotonisch sein muss. Besonders Proteine, die die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin, Cystein oder Cystin enthalten, sind anfällig für oxidativen Abbau, weshalb oft Antioxidantien wie Bisulfite, Butylhydroxytoluol (BHT) oder Ascorbinsäure zugesetzt werden.

Um ein Protein verlässlich in Lösung zu halten, kann mit Co-Solventien wie Glycerol gearbeitet werden. Die Wirkung von Co-Solventien beruht auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, abhängig von dem jeweiligen Protein. Entweder das Co-Solvent bindet direkt an das Proteinmolekül, wodurch die der Umgebung zugekehrte Proteinoberfläche reduziert und dadurch die native Proteinkonformation thermodynamisch begünstigt wird. Möglich ist aber auch, dass das Co-Solvent eine vollkommene Hydrathülle um das Protein herum bildet, wodurch dieses ebenfalls seine native Konformation behält [31].

Als nichtionische Löslichkeitsvermittler werden in Biopharmazeutika insbesondere die Polysorbate 20 und 80 in einem Konzentrationsbereich von etwa 0,001-0,1 % m/v eingesetzt. Die chemische Struktur von Polysorbaten beruht auf einem Sorbitanring, dessen Hydroxylgruppen durch Polyethylenoxid-Einheiten substituiert und anschließend mit einer Fettsäure verestert wurden, d. h. es handelt sich um ethoxylierte Sorbitanfettsäureester. Die Polysorbate 20 und 80 unterscheiden sich lediglich in ihrem Fettsäureester an der z-Position, wobei dies bei Polysorbat 20 der Laurinsäureester und bei Polysorbat 80 der Ölsäureester ist. Ihren amphiphilen Charakter erhalten die Polysorbate durch den hydrophilen

ethoxylierten Sorbitanring, während die Kohlenstoffkette der Fettsäure die hydrophobe Struktur bildet [33].

Aufgrund ihrer Struktur ordnen sich Polysorbat-Moleküle in wässriger Umgebung so an, dass der Kontakt zwischen hydrophiler Umgebung und ihrem hydrophoben Anteil auf ein Minimum reduziert wird. Da Luft-Wasser-Grenzflächen hydrophober Natur sind, bilden die Polysorbat-Moleküle an diesen eine Monoschicht aus, bei welcher nur der hydrophile Molekülteil dem Wasser zugekehrt ist. Mit steigender Polysorbat-Konzentration werden allmählich alle Plätze an der Luft-Wasser-Grenzfläche besetzt, bis ab einer gewissen Konzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC), die vollständige Sättigung der Grenzflächen erreicht ist und die nun noch freien in der Lösung vorliegenden Polysorbat-Moleküle damit beginnen, Mizellen auszubilden, bei welchen der hydrophile ethoxylierte Sorbitanring in die Lösung zeigt, während die hydrophobe Kohlenstoffkette der Fettsäure in das Mizellinnere ragt. Die CMC ist für Polysorbat 20 etwa 0,007 % m/v und für Polysorbat 80 etwa 0,002 % m/v, sie ist jedoch von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Konzentration anderer Lösungsbestandteile abhängig und kann daher variieren [34].

Antriebskraft für dieses Verhalten ist der sogenannte hydrophobe Effekt. Die Wassermoleküle, die den hydrophoben Polysorbat-Teil umgeben, können mit diesem keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen und müssten sich daher stärker um diesen „herumstrukturieren“, d. h. sie müssten von einem ungeordneten in einen geordneten Zustand übergehen, was gleichbedeutend mit einer Abnahme der Entropie wäre. Dies widerspricht jedoch dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik, nach welchem in geschlossenen Systemen niemals die Entropie abnehmen kann, d. h. als Konsequenz lagern sich die Polysorbat-Moleküle zusammen und verringern dadurch die hydrophobe Oberfläche, wodurch sich auch die Anzahl der geordneten Wasser-Moleküle verringert. Thermodynamisch lässt sich dieser Sachverhalt auch über die Gibbs-Gleichung der freien Enthalpie ΔG darstellen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Bei konstantem Druck p und konstanter Temperatur T laufen Reaktionen freiwillig ab, wenn die damit verbundene Zustandsänderung zu einer Abnahme der freien Enthalpie führt. Freie Wassermoleküle bilden untereinander Wasserstoffbrückenbindungen aus, was zu einer Abnahme der Enthalpie ΔH führt, gleichzeitig können sich die Moleküle frei in der Lösung bewegen, d. h. die Entropie ΔS nimmt zu, wodurch ΔG abnimmt. Liegen nun aber auch

hydrophobe Moleküle in der Lösung vor, wird die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen erschwert und zusätzlich werden die Wassermoleküle in der Nähe der hydrophoben Oberflächen in eine starre Struktur gezwungen, d. h. die Entropie ΔS nimmt ab, wodurch die freie Enthalpie ΔG zunehmen würde. Da durch die Mizellbildung die hydrophobe Oberfläche so weit wie möglich reduziert wird, nimmt die Zahl der Wassermoleküle wieder zu, die frei beweglich in der Lösung vorliegen, dementsprechend nimmt auch die Entropie ΔS zu und ΔH ab.

Polysorbate als Löslichkeitsvermittler schützen in der Arzneimittelformulierung das entsprechende Protein hauptsächlich vor Adsorption an den hydrophoben Grenzflächen, entweder zwischen Flüssigkeit und Luft oder zwischen Flüssigkeit und der Oberfläche der Primärverpackung, und halten es hierdurch in Lösung. Hierbei sind zwei Mechanismen denkbar, einerseits können die Polysorbat-Moleküle mit den Protein-Molekülen um die verfügbaren Grenzflächen konkurrieren und diese dadurch verdrängen, andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Polysorbat-Moleküle mit den hydrophoben Regionen von Protein-Molekülen wechselwirken und diese damit absättigen [35]. Es wird angenommen, dass der Verdrängungsmechanismus an den Grenzflächen die dominierende Rolle spielt, da sich dieser auch thermodynamisch günstig auswirkt. Bei einer Reihe von Untersuchungen wurden jedoch auch Wechselwirkungen zwischen Polysorbaten und verschiedenen Modellproteinen nachgewiesen, beispielsweise mit rekombinant hergestelltem Somatotropin (rhGH) [36] oder EPO [37].

Ein Nachteil von Polysorbaten ist deren Neigung zu Autooxidation und anderen Abbaureaktionen wie beispielsweise der Hydrolyse von Esterbindungen [33], wodurch Peroxide und kurzkettige Säuren wie Ameisensäure gebildet werden, die folglich als unerwünschte Verunreinigungen vorliegen. Da insbesondere Peroxide später in Arzneimittelformulierungen zur Oxidation von Proteinen führen können [38], sollte die Lagerung von Polysorbat-Lösungen möglichst unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff stattfinden, auch die Zugabe von Butylhydroxytoluol als Antioxidans unterbindet ungewollte Abbaureaktionen.

2.3.2 Proteinaggregation

Proteinaggregation bezeichnet die Ansammlung von zwei oder mehreren Proteinmonomeren, die hauptsächlich durch non-kovalente Wechselwirkungen

zusammengehalten werden [39]. Die Ursachen von Proteinaggregation sind vielfältig und oft finden verschiedene Aggregationsmechanismen gleichzeitig nebeneinander statt, hauptsächlich scheinen jedoch fünf unterschiedliche Mechanismen eine Rolle zu spielen [40]:

1. Die reversible Assoziation nativer Monomere: Mit zunehmender Größe der Oligomere steigt hierbei jedoch auch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Disulfidbrücken, was final zu einer irreversiblen Aggregation führen kann. Da mit zunehmender Größe des Oligomers auch dessen Stabilität und damit Löslichkeit abnimmt, ist auch eine Ausfällung des Oligomers möglich.
2. Die Aggregation nicht-nativer Monomere: Proteine sind bezüglich ihrer Konformation keine starren Moleküle, sodass angenommen wird, dass die native Proteinkonformation im Gleichgewicht mit der entsprechenden denaturierten, vollkommen entfalteten Proteinkonformation steht. Der Weg dorthin führt über verschiedene intermediäre teilweise entfaltete Proteinkonformationen [31]. In ihrer nativen Konformation haben Proteine einen hydrophoben Kern, d. h. hydrophobe Aminosäurereste zeigen nach innen und wechselwirken miteinander, während die hydrophile Proteinoberfläche nach außen seiner meist hydrophilen, beispielsweise wässrigen Umgebung zugewandt ist. Bei der Entfaltung kehrt das Protein nach und nach seine hydrophoben Aminosäurereste nach außen, wodurch sich ein thermodynamisch ungünstiger Zustand ergibt. Daher neigen die hydrophoben Aminosäurereste nun dazu, mit den hydrophoben Aminosäureresten anderer denaturierter Proteine zu wechselwirken und dabei Aggregate zu bilden. Bei diesem Reaktionsmechanismus ist die Entfaltung des Proteins, d. h. seine Konformationsänderung, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und die Aggregation mit großer Wahrscheinlichkeit irreversibel.
3. Die Aggregation von chemisch veränderten Monomeren: Verändern sich durch chemische Instabilitäten die kovalenten Bindungen innerhalb des Monomers, führt dies unter Umständen zu besonders aggregationsanfälligen Regionen an der Proteinoberfläche, was zu einer möglicherweise irreversiblen Aggregation führen kann.
4. Die Nukleations-kontrollierte Aggregation: Liegen in einer Lösung kleinere Oligomere vor, haben diese nur eine geringe Tendenz zur Bildung größerer Aggregate. Bildet sich jedoch zufällig ein größeres Aggregat, kann dieses der Auslöser (Nucleus) einer explosionsartigen weiteren Aggregation sein, sodass unter Umständen auch eine

Ausfällung bzw. Partikelbildung erkennbar ist. Der Nucleus kann aber auch eine unbeabsichtigte Verunreinigung sein, beispielsweise von Glas- oder Metallpartikeln und auch Silikonöltröpfchen.

5. Die Proteinaggregation an Oberflächen: Bei diesem Mechanismus adsorbiert ein natives oder teilweise entfaltetes Proteinmonomer zunächst an einer Oberfläche, beispielsweise an der Primärverpackung und erfährt hierdurch eine Konformationsänderung. Die Adsorption erfolgt hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen, weshalb die Adsorptionsneigung von teilweise entfaltenen Monomeren höher ist als die von nativen Monomeren [30]. Anschließend bilden sich analog zum 2. Mechanismus Aggregate. Da die Luft-Wasser-Grenzfläche wie eine hydrophobe Oberfläche wirkt, können auch an dieser Grenzfläche Proteine adsorbieren und anschließend aggregieren. Dieser Aggregationsmechanismus wird u. a. bei mechanischem Stress wie beispielsweise Rühren oder Schütteln beobachtet, weil sich hierdurch die Luft-Wasser-Grenzfläche vergrößert [41].

2.3.3 Immunogenität

Unter Immunogenität versteht man die Fähigkeit einer Substanz, eine Immunantwort im Körper auszulösen [42]. Eine Immunantwort erfolgt entweder in Form einer Immunsuppression oder Immunstimulation, wobei die Immunstimulation bei der Therapie mit Biopharmazeutika im Fokus steht. Die Gabe von Biopharmazeutika kann zur Bildung von antigenspezifischen Antikörpern gegen den Wirkstoff [43] führen, welche selbst wiederum in neutralisierende und nicht-neutralisierende Antikörper unterschieden werden können. Neutralisierende Antikörper (*NAbs*, *neutralizing antibodies*) binden direkt an das therapeutische Protein, wodurch sie die Wirksamkeit von diesem beeinflussen oder auch direkt aufheben. In seltenen Fällen richten sich die gebildeten *NAbs* nicht nur gegen das therapeutische Protein, sondern auch gegen die endogen vorliegende Variante, was eine komplette Neutralisation des entsprechenden Proteins im Körper zur Folge haben und daher lebensbedrohlich für den Patienten sein kann.

Häufiger wird bei der Therapie mit Biopharmazeutika jedoch die Bildung von nicht-neutralisierenden Antikörpern (*NNAbs*, *non neutralizing antibodies*) gegen das therapeutische Protein beobachtet. Diese binden zwar ebenfalls an das Protein, jedoch an Positionen, welche nicht die Wirksamkeit des Proteins beeinflussen [44]. Ob ein

Biopharmazeutikum eine immunogene Reaktion auslöst, ist von produkt-, patienten- und behandlungsspezifischen Faktoren abhängig (siehe Abbildung 2.9).

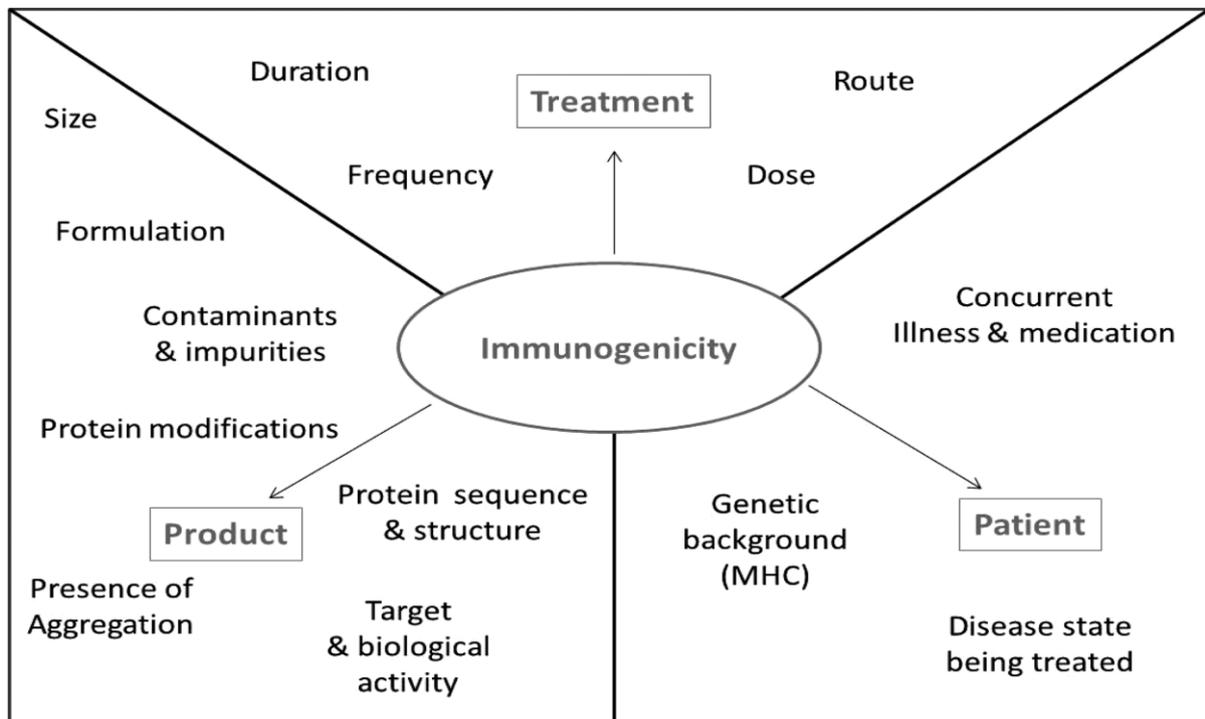


Abbildung 2.9: Einteilung verschiedener Einflussfaktoren auf die Immunogenität eines Biopharmazeutikums (entnommen aus [42]). Die Immunogenität wird von patienten- und produktspezifischen Faktoren beeinflusst, sowie von der Behandlung selbst, *MHC: Major histocompatibility complex*

Zu den patientenspezifischen Faktoren zählen sowohl der genetische Hintergrund als auch die Art und Anzahl der vorliegenden Krankheiten einschließlich deren Medikation. So reagieren beispielsweise Patienten mit geschwächtem Immunsystem oft mit einer weniger stark ausgeprägten Immunantwort auf die Gabe eines therapeutischen Proteins [44].

Bei den behandlungsspezifischen Faktoren spielt neben der eingesetzten Dosis, Behandlungsdauer und Verabreichungsfrequenz vor allem die eingesetzte Darreichungsform eine entscheidende Rolle. Biopharmazeutika werden vorwiegend parenteral in Form von Injektions- oder Infusionslösungen verabreicht, wobei bei der subkutanen Injektion die Wahrscheinlichkeit einer Immunantwort am höchsten ist. Grund hierfür ist vermutlich, dass bei einer subkutanen Injektion das therapeutische Protein in unmittelbarer Nähe zu Lymphknoten platziert wird, welche als Teil des Immunsystems B- und T-Zellen enthalten [44].

Die produktspezifischen Faktoren, welche die Immunogenität beeinflussen können, sind vielfältig und spiegeln damit auch die Komplexität biopharmazeutischer Formulierungen wider. Einerseits ist die Proteingröße und die Proteingewinnung (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.4) entscheidend, andererseits spielt auch die Vielzahl an erforderlichen Prozessschritten bei der Produktion von Biopharmazeutika (u. a. Fermentation, Vireninaktivierung, Aufreinigung, Formulierung, Filtration und Abfüllung) eine Rolle. So können während der Produktion sowohl Verunreinigungen in das finale Biopharmazeutikum gelangen als auch ungewollte chemische Modifikationen des therapeutischen Proteins ausgelöst werden (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.1).

Diese chemischen Modifikationen können einerseits direkt die Immunogenität beeinflussen, indem die chemisch modifizierte Position selbst eine Immunantwort auslöst. Andererseits ist es ebenso möglich, dass durch die chemische Modifikation die Tertiärstruktur des therapeutischen Proteins verändert und dadurch eine Immunantwort ausgelöst wird. Zu den produktspezifischen Faktoren gehört auch das Vorliegen ungewollter Proteinaggregate, welche ebenfalls die Immunogenität eines Biopharmazeutikums erhöhen können, wie eine Vielzahl von Publikationen nahelegt [42].

Grund für die erhöhte Immunogenität von Proteinaggregaten ist die erhöhte Anzahl repetitiver Epitope verglichen mit der monomeren Form des Proteins, wodurch Proteinaggregate in ihrer Struktur Pathogenen ähneln und vermutlich vom Immunsystem als solche erkannt werden, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird [43]. So konnten beispielsweise Fradkin *et al.* zeigen, dass Aggregate des rekombinanten menschlichen Wachstumshormons (rhGH), welche zuvor durch Gefriertrocknung oder Rühren erzeugt worden waren, in verschiedenen Mausmodellen zu einer erhöhten Immunogenität führten [45]. Ebenfalls *in vivo* im Mausmodell untersuchten Pisal *et al.* Aggregate vom Blutgerinnungsfaktor VIII und kamen zu dem Schluss, dass diese verglichen mit dem monomeren Faktor VIII Molekül immunogener waren [46].

Ein prominentes Beispiel einer Immunogenitätsreaktion aus der klinischen Praxis stellt jedoch der Eprex®-Vorfall dar, dessen Ursache nicht abschließend geklärt werden konnte. Im Jahr 1989 erfolgte die erstmalige Zulassung eines rekombinanten EPO-Präparats mit Epoetin alpha als Wirkstoff zur Behandlung von Anämie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Ab 1998 wurde ein vermehrtes Auftreten von *Antibody mediated pure red cell aplasia* (PRCA, Aplasie der roten Blutkörperchen)-Vorfällen als unerwünschte Nebenwirkung beobachtet, bei der neutralisierende Antikörper sowohl gegen das

therapeutische als auch endogene EPO gebildet werden. Diese schwerwiegende Nebenwirkung trat hauptsächlich bei Patienten auf, die Epoetin alpha außerhalb der USA als Eprex® (in Deutschland vertrieben durch Ortho Biotech unter dem Handelsnamen Erypo®) als subkutane Injektion erhalten hatten. Bei der anschließenden Untersuchung stellte sich heraus, dass der ursprüngliche Löslichkeitsvermittler HSA (Humanes Serumalbumin) durch Polysorbat 80 ausgetauscht worden war. Dieses verstärkte die Migration von *Leachables* aus dem unbeschichteten Gummistopfen [26], welche die Arzneimittelformulierung kontaminierten.

Es existieren verschiedene Hypothesen inwieweit die vorhandenen *Leachables* zu der Bildung der neutralisierenden Antikörper beigetragen haben. Möglicherweise fungierten die *Leachables* als Adjuvantien und riefen dadurch eine Immunantwort hervor [26], dieser Hypothese widerspricht jedoch, dass bei entsprechenden Untersuchungen im Mausmodell keine Immunantwort durch Kombination von Eprex®/Erypo® mit den entsprechenden *Leachables* hervorgerufen werden konnte [47]. Hermeling *et al.* hingegen nahmen an, dass die in Eprex®/Erypo® eingesetzte Konzentration von Polysorbat 80 mit 0,03 % zu der Bildung von Mizellen geführt hatte, welche einen geringen Anteil an EPO-Molekülen enthielten und dadurch eine Immunantwort hervor gerufen hatten [48]. Auf demselben Versuchsansatz basierend führten Villalobos *et al.* [37] eine weitere Untersuchung durch und verwarfen diese Hypothese wieder. Eine weitere Hypothese ist die verstärkte Aggregatbildung von EPO und eine damit erhöhte Immunogenität, hervorgerufen durch die relativ hohe Konzentration an Polysorbat 80 [49].

2.3.4 Eingesetzte Modellproteine

Immunoglobulin G (IgG) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa und gehört zu der Klasse der Antikörper. Der Anteil von IgG beträgt 10-20 % des gesamten Plasmaproteins im menschlichen Blutserum. IgG lässt sich nochmals in die vier Subtypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilen, wobei mit aufsteigender Nummerierung deren Anteil am Plasmaprotein abnimmt. Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz stimmen die vier Subtypen zwar zu 90 % überein, unterscheiden sich jedoch in ihrer physiologischen Wirkung wie beispielsweise Antigenbindung, in-vivo-Halbwertszeit und Plazentagängigkeit [50].

Das IgG Molekül besteht aus vier Polypeptidketten, zwei davon bilden mit jeweils 50 kDa identische *schwere* Polypeptidketten, bei den anderen zwei Polypeptidketten handelt es sich um identische *leichte* Ketten mit jeweils 25 kDa. Die schweren und leichten Polypeptidketten

sind miteinander über Disulfidbrücken verbunden und bilden gemeinsam eine y-förmige Struktur aus. Die leichten Ketten bestehen jeweils aus einer variablen und einer konstanten Domäne (VL und CL), während die schweren Ketten aus einer variablen und drei konstanten Domänen bestehen (VH, CH1, CH2, CH3). Jeweils eine VL-Domäne assoziiert mit je einer VH- und einer CH1-Domäne und bildet hierbei einen Fab (*fragment antigen binding*)-Arm aus und ist entscheidend für die Antigenbindung. Die CH2- und CH3-Domäne bilden den Fc (*fragment crystalline*)-Arm, welcher unter anderem mittels Bindung an Fc-Rezeptoren den Transport der Antikörper durch das Epithelgewebe bedingt. Zwischen den Domänen CH1 und CH2 befindet sich zusätzlich die sehr flexible Hinge-Region, in welcher sich auch die Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Polypeptidketten befinden.

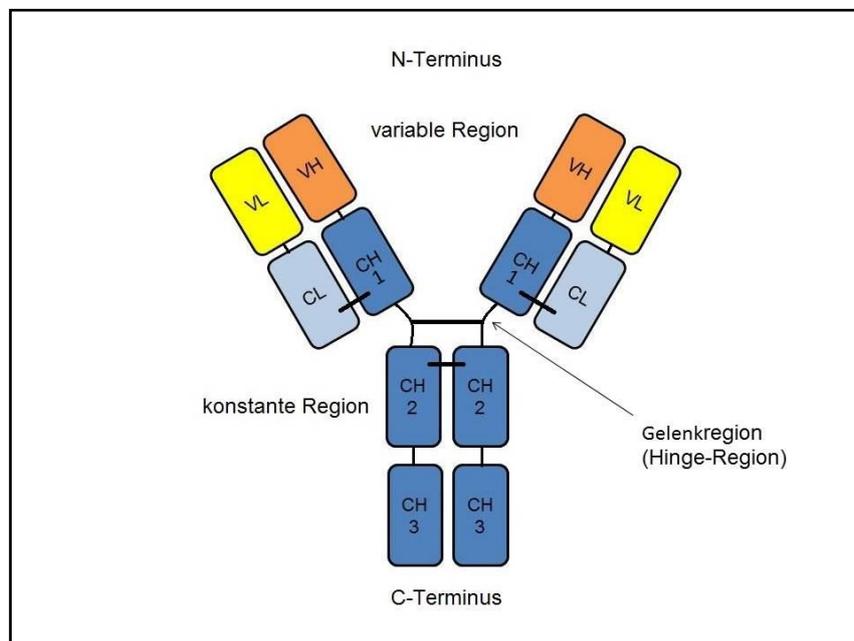


Abbildung 2.10: Struktureller Aufbau eines IgG-Moleküls. IgG besteht aus zwei schweren Ketten (Heavy chains, H) und zwei leichten Ketten (Light chains, L) – V: Variable Domäne, C: Konstante Domäne, H: Schwere Kette, L: Leichte Kette

Mit steigender Temperatur beginnt sich IgG zu entfalten, wobei sich die Fab- und Fc-Arme unabhängig voneinander verhalten. Die Schmelztemperatur T_M der Fab-Arme liegt in einem Bereich von 63-71 °C und für den Fc-Arm bei 78-82 °C [51] T_M ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der vorhandenen Proteinmoleküle in einem entfalteten, denaturierten Zustand vorliegt. Die Schmelztemperatur kann mittels verschiedener analytischer Verfahren wie Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC – *differential scanning calorimetry*), Circular dichroismus (CD)-, FTIR- sowie extrinsischer und intrinsischer

Fluoreszenz-Spektroskopie ermittelt werden. Die thermisch induzierte Entfaltung von IgG ist ein irreversibler Prozess, wie anhand von IgG des Subtyps 2b gezeigt werden konnte [51]. Grund hierfür sind die sich an die Proteinentfaltung anschließenden Folgereaktionen wie Aggregation oder auch chemische Reaktionen. Abhängig von pH-Wert, Ionenstärke und dem vorliegenden Subtyp sind für IgG unterschiedliche Aggregationswege und Aggregatstrukturen bekannt [52].

Antikörper sind Teil der induzierten Immunantwort des Körpers auf eingedrungene Pathogene, wobei sie an die Oberfläche der Pathogene binden und diese damit markieren und für den körpereigenen Abbau zugänglich machen. Mit Muromonab-CD3 wurde 1986 erstmals ein industriell hergestellter Antikörper zur Therapie akuter Abstoßungsreaktionen im Rahmen von Organtransplantationen zugelassen. Die Herstellung erfolgte klassisch mittels Hybridom-Technologie, welche es ermöglicht monoklonale Antikörper zu gewinnen, also Antikörper die auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehen und daher nahezu identisch sind und eine gleichbleibende Spezifität aufweisen. Die Gewinnung des B-Lymphozyten erfolgt hierbei aus immunisierten Versuchstieren (beispielsweise aus Mäusen), weshalb die resultierenden monoklonalen Antikörper leicht vom Körper als *körperfremd* erkannt werden und daher in der Therapie oft Immunogenitätsreaktionen als Nebenwirkung auslösen.

Um die Immunogenität tierischer Antikörper zu senken, kann dessen tierischer Anteil durch Chimärisierung bzw. Humanisierung reduziert werden, indem Teile des tierischen Antikörpers gegen humane Anteile mittels Gentechnologie ausgetauscht werden [53]. Da jedoch auch chimäre bzw. humanisierte Antikörper zu Immunogenitätsreaktionen führen können, werden mittlerweile vollhumane rekombinante Antikörper hergestellt, d. h. diese enthalten keinen tierischen Anteil mehr und werden meist mittels Phagen-Display-Technologie *in vitro* in Säugerzellen produziert.

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein bestehend aus 165 Aminosäuren, an die vier Kohlehydratreste gebunden sind. EPO hat ein Molekulargewicht von 30 kDa, wovon 40 % auf die Kohlehydratreste entfallen, von denen drei Reste N-glykosidisch über die Aminosäure Asparagin und ein Rest O-glykosidisch über Serin angebunden sind. EPO weist bezüglich der Kohlehydratreste eine *Mikroheterogenität* auf, d. h. diese bestehen aus einer Abfolge der Monosaccharide Mannose, Galactose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Galactosamin und endständigen Sialinsäuren, jedoch kann sowohl die Anordnung der Monosaccharide als auch die Anzahl der endständigen Sialinsäuren variieren [54].

Physiologisch handelt es sich bei EPO um ein Hormon, welches bei Erwachsenen hauptsächlich in der Niere, in der fötalen Phase jedoch primär in der Leber produziert wird [55] und entscheidend zur Bildung von Erythrozyten beiträgt, indem es von der Niere durch den Blutkreislauf zu spezifischen Oberflächenrezeptoren gelangt und dort die Ausdifferenzierung dieser Zellen zu Erythrozyten und Retikulozyten ermöglicht.

EPO hat verglichen mit anderen globulären Proteinen eine relativ niedrige Schmelztemperatur T_M von 53 °C [56], was an sich ein Indiz für ein thermodynamisch instabiles Protein ist. Jedoch zeigen Messungen, dass sich EPO kinetisch sehr stabil gegen Hitzestress erweist und die hitzebedingte Entfaltung in hohem Maße reversibel ist [56]. Arakawa *et al.* beobachteten demnach mittels CD-Messung und Gelelektrophorese eine Aggregatbildung erst bei einer Erhitzung auf 79 °C für 15 Minuten. Endo *et al.* hingegen inkubierten EPO bei 60 °C für 24 Stunden und verfolgten mittels SEC-Technik die Bildung des entsprechenden Dimers und eines Aggregats, bestehend aus 20 EPO-Monomeren [57]. Im Rahmen dieser Studie wurde auch festgestellt, dass die Kohlehydratreste maßgeblich für die Hitzestabilität von EPO verantwortlich sind.

2.3.5 Verwendete Analysetechniken zur Analyse von Proteinaggregaten

2.3.5.1 SEC-Chromatographie

Bei der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) erfolgt die Auftrennung von Analyten anhand ihrer Größe. Der Mechanismus beruht darauf, dass sehr große Analyten nicht in die Poren des Säulenmaterials eindringen können und demnach im Totvolumen eluieren, während kleinere Analyten in die Poren diffundieren und dort anhand ihrer Größe eine unterschiedliche Verweildauer aufweisen. Je kleiner der Analyt ist, desto tiefer dringt er in die Poren ein und desto später eluiert er von der Säule. Da der Analyt keinerlei Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial eingeht, hat sich diese Technik insbesondere zur Analyse von Proteinen und Proteinaggregaten etabliert, wobei Voraussetzung ist, dass diese vollständig in Lösung vorliegen. Für globuläre Proteine richtet sich die Elutionsreihenfolge nach dem Molekulargewicht, da der hydrodynamische Radius dieser Proteine in Lösung mit ihrem Molekulargewicht korreliert. Nimmt man nun eine Kalibriergerade mit mehreren Modellproteinen unterschiedlichen Molekulargewichts auf, ist es möglich, das Molekulargewicht eines Analyten anhand seiner Retentionszeit zu berechnen. Weichen Proteine jedoch von der idealen globulären Form ab, ist es nicht mehr möglich ihr

Molekulargewicht sicher zu bestimmen, da ihr abweichender hydrodynamischer Radius gegebenenfalls zu einer verfrühten oder verspäteten Retentionszeit führen kann. Die Detektion erfolgt meist photometrisch, das Absorptionsmaximum der Peptidbindung liegt bei 205 nm, das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäurereste liegt bei 280 nm.

2.3.5.2 Trübungsmessung

Die Erfassung von unlöslichen Proteinaggregaten basiert auf einer von Eckhardt *et al.* [58] vorgeschlagenen Methode, bei der es sich letztendlich um eine photometrische Adaption der im Ph. Eur. 2.2.1 beschriebenen visuellen Methode zur Messung der Opaleszenz einer Lösung handelt. Da unlösliche Proteinaggregate in einer Lösung analog zu suspendierten Partikeln Lichtstrahlen absorbieren und reflektieren, wird das Licht in alle Richtungen gestreut. Eine Zunahme der Anzahl an unlöslichen Proteinaggregaten führt demnach zu einer Zunahme der Lichtstreuung, was optisch als zunehmende Opaleszenz bzw. Trübung der Lösung wahrgenommen wird.

Die visuelle Bestimmung der Opaleszenz beruht auf einem Vergleich der Versuchslösung mit vier Referenzsuspensionen definierter Trübung (3, 6, 18 und 30 NTU). Laut Eckhardt *et al.* lässt sich die Trübung photometrisch in einem Bereich von 340-360 nm messen und korreliert mit den Ergebnissen der visuellen Bestimmung, hat jedoch den Vorteil schneller und objektiver durchführbar zu sein. In unserer Studie wurden für jede Messserie die vier Referenzsuspensionen gemäß Ph. Eur. hergestellt und zusammen mit den entsprechenden Probelösungen bei 350 nm vermessen. Das Modellprotein Immunglobulin G (IgG) zeigt bei dieser Wellenlänge keine UV-Aktivität, sodass allein die Trübung erfasst wird. Die resultierenden Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse auf exakte Konzentration, Größe oder Form der entstehenden unlöslichen Proteinaggregate zu, bieten jedoch die Möglichkeit deren Entstehung qualitativ zu verfolgen.

3 Zielstellung

Parenteralia, also sterile Arzneimittelformulierungen, die zur Injektion, Infusion oder Implantation bestimmt sind, werden hauptsächlich in flüssiger oder lyophilisierter Form in Glasbehältnissen angeboten, die mit einem Gummistopfen verschlossen werden. Gummi eignet sich aufgrund seiner Elastizität hervorragend für das Behältnis-Verschlusssystem (Primärverpackung) von Parenteralia, da sich der Gummistopfen eng an die Ränder des Glasbehältnisses schmiegt und dieses dadurch gut verschließt. Auch bei mehrmaliger Entnahme des Arzneimittels mittels Kanüle führt die Elastizität dazu, dass das bei der Punktion entstehende Loch sich immer wieder selbst verschließt, sodass das Arzneimittel weiterhin vor externen Verunreinigungen geschützt bleibt und daher seine Integrität behält [8]. Die besondere Elastizität von Gummi lässt sich auf seine quervernetzte Struktur zurückführen, welche das Resultat des als *Vulkanisation* bekannten Herstellungsprozesses ist. Für die Vulkanisation wird eine Vielzahl von Additiven verwendet, bei welchen es sich meist um kleine Moleküle handelt, die in der Gummimatrix nicht kovalent gebunden vorliegen und daher potentielle *Leachables* darstellen. Aufgrund des direkten Kontakts des Gummistopfens als Komponente der Primärverpackung mit der Arzneimittelformulierung, können diese kleinen unvernetzten Additive unter Umständen in diese migrieren und dadurch die Stabilität, Effizienz und Sicherheit der Arzneimittelformulierung negativ beeinflussen. Daher schreiben sowohl die EMA [17] als auch die FDA [1] [59] [60] die Durchführung von Extraktions- und Interaktionsstudien von Arzneimittel und Primärverpackung vor, um die Kompatibilität während der späteren vorgesehenen Lagerdauer sicherzustellen.

Neben der Prüfung der Kompatibilität definieren die verschiedenen Arzneibücher für Gummistopfen in entsprechenden Monographien einen gewissen Qualitätsstandard (Ph. Eur. 3.2.9 [10], USP <381> [11] und JP 7.03 [12]), welcher für die pharmazeutischen Hersteller jedoch nicht verpflichtend ist. Die genannten Monographien beinhalten neben biologischen (nur im USP enthalten) und funktionellen Prüfungen auch eine Reihe von chemischen Prüfungen, die sich primär auf Summenparameter konzentrieren und Rückschlüsse auf die verwendeten Chemikalien bei der Vulkanisation zulassen. Die entsprechende Prüflösung wird durch Extraktion der Gummistopfen mit Wasser als Extraktionsmittel gewonnen. Dies mag ausreichend sein, um die geforderten Summenparameter analysieren zu können, diese können jedoch bestenfalls Hinweise auf spätere *Leachables* geben, eine strukturelle

Identifizierung organischer oder anorganischer *Leachables* aus den Gummistopfen ist nach Ph. Eur. 3.2.9, USP <381> und JP 7.03 nicht vorgesehen. Rückschlüsse auf eventuelle *Extractables* und daraus resultierende *Leachables* im finalen Arzneimittel lassen sich nur aus der Durchführung von langwierigen Extraktions- und Interaktionsstudien ziehen. Aufgrund der komplexen Thematik existieren hierzu jedoch keine exakten Vorgaben zur Durchführung, lediglich Empfehlungen.

Da Gummi altert, werden unter Umständen erst nach längerer Lagerung schwer lösliche *Leachables* aus dem Gummistopfen an die Arzneimittelformulierung abgegeben, dementsprechend müssen die Durchführungskriterien der Extraktions- und Interaktionsstudien sorgsam gewählt werden. Insbesondere die gewählten Extraktionsbedingungen und Extraktionsmittel müssen die oft komplexe Zusammensetzung einer Arzneimittelformulierung befriedigend widerspiegeln, da die Wirksamkeit und Sicherheit des Arzneimittels über die Dauer der Lagerung jederzeit gewährleistet sein muss.

Insbesondere die zunehmende Entwicklung und damit verbundene Marktzulassung von Biopharmazeutika, d. h. Arzneimittel mit proteinbasierten Wirkstoffen, stellt eine besondere Herausforderung hinsichtlich der Formulierung, Primärverpackung, Transport- und Lagerbedingungen dar. Aufgrund ihrer Molekülgröße und besonderen strukturellen Eigenschaften sind Proteine relativ empfindlich und neigen zu physikalischen und chemischen Instabilitäten, wodurch wiederum ihre biologische Aktivität stark beeinträchtigt werden kann. Daher ist die Zusammensetzung der Formulierung eines Biopharmazeutikums komplex, gleichzeitig reagiert der proteinbasierte Wirkstoff sehr empfindlich auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise der Migration von *Leachables*. Da proteinbasierte Wirkstoffe meist direkt in den menschlichen Stoffwechsel des Patienten eingreifen, können geringste strukturelle Veränderungen von diesen ernsthafte Konsequenzen hinsichtlich der Immunogenität des Biopharmazeutikums haben. So wurde im Falle des plötzlichen vermehrten Auftretens von *Pure red cell aplasia (PRCA)* bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung im Jahre 1998 in verschiedenen Publikationen ein Zusammenhang zwischen *Leachables* aus dem unbeschichteten elastomeren *Plunger* der vorgefüllten Spritzen und der erhöhten Immunogenität der Eprex®-Formulierung gesehen [26] [37] [47].

Ziel dieser Studie war daher die Untersuchung verschiedener käuflich verfügbarer Gummistopfen hinsichtlich der Anforderungen von Ph. Eur. 3.2.9, USP <381> und JP 7.03 und dem entsprechenden Extraktions- und Migrationsverhalten von diesen unter Einsatz

verschiedener Extraktionsmittel und Modellformulierungen. Resultierende *Leachables* sollten identifiziert und deren Einfluss auf verschiedene Modellproteine untersucht werden. Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Modellproteinen und den gefundenen *Leachables* sollte ein, verglichen mit den üblichen langwierigen Kompatibilitätsstudien, zeitsparender Versuchsansatz gewählt werden. Die hierfür nötigen Analysemethoden sollten, soweit selbst entwickelt, für ihren Einsatz validiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der verwendeten HPLC-DAD-Methode

Die in Kapitel 9.1.7.1 beschriebene HPLC-DAD-Methode zur Analyse von *Extractables* und *Leachables* der verschiedenen untersuchten Gummistopfen wurde hinsichtlich der Linearität, Robustheit, Präzision und der Proben- und Standardstabilität in Anlehnung an ICH Q2 (R1) validiert. Zusätzlich wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Alle für die Validierung notwendigen Berechnungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2007 (Redmond, USA) durchgeführt.

Die Herausforderung bei der Entwicklung der HPLC-DAD-Methode lag darin, eine befriedigende Auftrennung von einer Vielzahl strukturell unbekannter *Extractables* zu erreichen, die aus den Gummistopfen extrahiert werden konnten. Da zum Zeitpunkt der Validierungsarbeiten die Strukturaufklärung von diesen noch nicht abgeschlossen worden war, wurde stattdessen für die Validierung Pyren verwendet, da dieses auch als interner und externer Standard diente. Als Probe fungierte ein Extrakt aus dem Gummistopfen CB1, dessen Probenpräparation detailliert im Anhang (siehe Kapitel 11.1.1) beschrieben ist.

4.1.1 Linearität

Die Linearität wurde auf den HPLC-DAD Systemen 1 und 2 anhand von Pyren und den *Extractables* 1-9 zunächst bei der Wellenlänge 220 nm ausgewertet. Für alle *Extractables* wurde als Bedingung für die Linearität der Korrelationskoeffizient R gewählt, der mindestens 0,999 betragen sollte. Zusätzlich sollte der resultierende y-Achsenabschnitt der linearen Funktion weniger als 5 % entsprechen, bezogen auf die Peakfläche des jeweiligen *Extractables* in der Probe auf 100 %-Level.

Die Auswertung zeigte, dass bei 220 nm nicht für alle *Extractables* 1-9 der definierte Korrelationskoeffizient R eingehalten werden konnte. Auf dem HPLC-DAD System 1 ergab sich für *Extractable* 8 der Korrelationskoeffizient $R = 0,998$ (siehe Tabelle 11.1). Auch auf dem HPLC-DAD System 2 resultierte für die *Extractables* 7 und 8 ein zu niedriger Korrelationskoeffizient (*Extractable* 7: 0,991 und *Extractable* 8: 0,986). Bei dem HPLC-DAD System 2 wurden die niedrigen Korrelationskoeffizienten dadurch verursacht, dass die Signalintensitäten der *Extractables* 7 und 8 das mögliche Detektorfenster überschritten.

Hierdurch war die Linearität nicht mehr gegeben und führte zu dem niedrigen Korrelationskoeffizienten und auch zu einem y-Achsenabschnitt, der nicht den definierten Bedingungen entsprach (*Extractable 7*: 17,8 %; *Extractable 8*: 22,6 %; *Extractable 9*: 7,4 %). Daher wurde die Auswertung für die *Extractables 6-9* für beide HPLC-DAD Systeme zusätzlich bei 254 nm vorgenommen. Aufgrund der niedrigeren Signalintensität erwies sich die Auswertung bei 254 nm als linear (siehe Tabelle 11.2 im Anhang).

4.1.2 Robustheit

Als Maß für die Robustheit wurden das *Extractable 5* und ein vorgelagerter Peak ausgewählt. Unter Standardbedingungen ließ sich der vorgelagerte Peak von *Extractable 5* zumindest mit der Funktion *split peak* abtrennen (siehe Abbildung 4.1) dementsprechend wurde untersucht, inwiefern systemische Veränderungen das Elutionsverhalten der beiden Substanzen zueinander beeinflussen (zu den Einzelheiten der getroffenen systemischen Variationen siehe auch Kapitel 11.1.2 im Anhang). Hierbei ergab sich, dass die Methode größtenteils stabil auf die Variation der verschiedenen Parameter reagierte, d. h. eine Abtrennung des vorgelagerten Peaks war möglich.

Die Erhöhung der Flussgeschwindigkeit um 5 % führte jedoch dazu, dass der vorgelagerte Peak mit dem *Extractable 5* zusammenlief und nicht mehr detektiert werden konnte (siehe Abbildung 4.2). Die Methode wurde daher hinsichtlich einer Erhöhung der Flussgeschwindigkeit als instabil bewertet. Eine Reduktion der Flussgeschwindigkeit führte hingegen zu keiner Verschlechterung der Auflösung, d. h. die Methode reagierte stabil gegenüber dieser Variation.

Ebenfalls als instabil erwies sich die Methode bei der Variation der Gradientensteilheit des ternären Systems, da bei Anwendung eines flacheren Gradienten (Gradient 1) der vormals vorgelagerte Peak nicht mehr detektiert werden konnte. Unklar blieb hierbei, ob dieser mit dem *Extractable 5* oder mit dem Peak bei der Retentionszeit 34,8 min zusammengelaufen war. Die Anwendung eines steileren Gradienten (Gradient 2) führte hingegen zu einer sehr guten Abtrennung des vorgelagerten Peaks (siehe Abbildung 4.3).

Die Variation der Wellenlänge erfolgte nur bei 220 nm, da die Auswertung von *Extractable 5* standardmäßig bei dieser Wellenlänge erfolgte. Auf eine Variation der Wellenlänge 254 nm wurde also verzichtet.

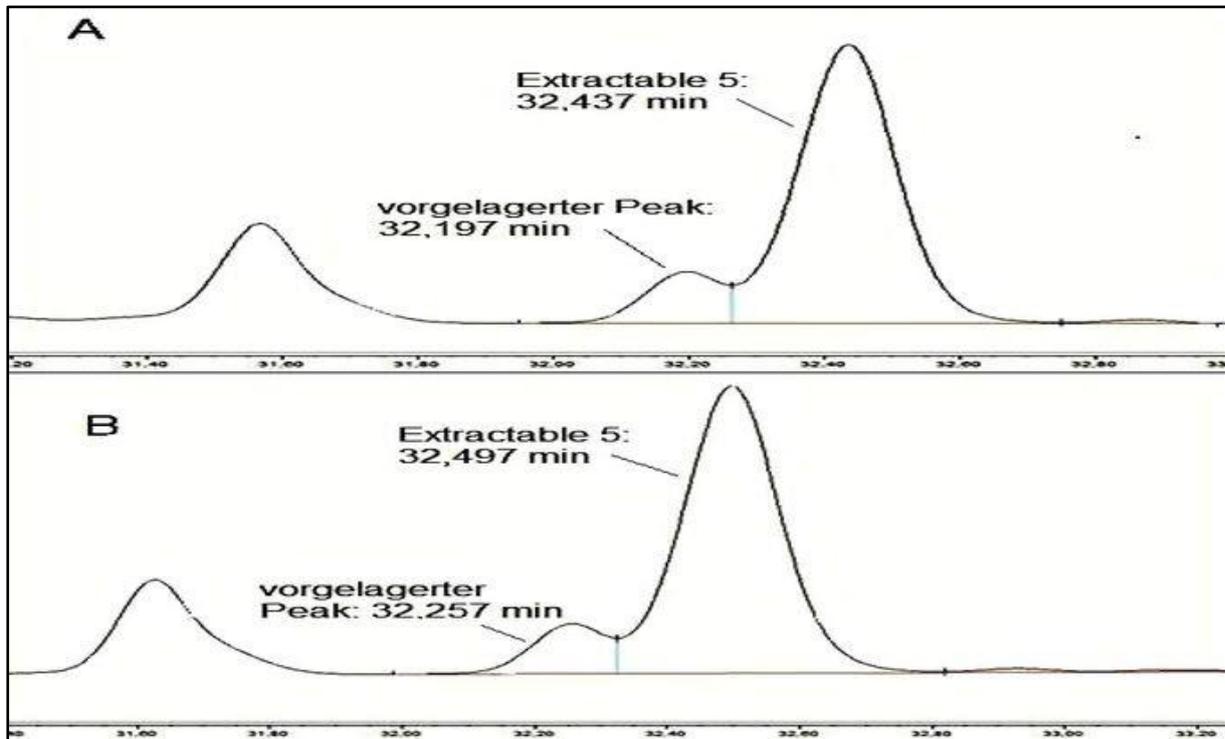


Abbildung 4.1: Robustheit – Variation der Säulencharge. A: Ausschnitt eines Chromatogramms unter Standardbedingungen mit *Extractable 5* und dem vorgelagerten Peak. B: Chromatogrammausschnitt bei Verwendung einer anderen Säulencharge: Das *Extractable 5* und der vorgelagerte Peak zeigen vergleichbare Retentionszeiten.

Die Variation der Ofentemperatur um ± 5 °C ausgehend von 40 °C als der standardmäßigen Temperatur zeigte eine Beeinflussung der Peaktrennung. Während bei 35 °C die beiden Peaks basisliniengetrennt erschienen (siehe Abbildung 11.8 im Anhang), führte eine Erhöhung der Ofentemperatur auf 45 °C zu einer merklichen Verschlechterung der Peaktrennung. Da jedoch mittels der Funktion *split peak* zumindest noch eine Abtrennung des vorgelagerten Peaks und damit die Auswertung möglich war, ist das System in einem Temperaturbereich von 35-45 °C als stabil zu betrachten. Im Zuge der Robustheitsprüfung wurde die Analyse auch mit einer anderen Charge der Analysensäule wiederholt. Die Auswertung ergab, dass das Trennverhalten von dem vorgelagerten Peak und dem *Extractable 5* mit den beiden eingesetzten Säulenchargen 519091-1 und 557308-1 vergleichbar und dementsprechend das System gegenüber dieser Variation stabil reagierte. Zusammenfassend erwies sich das HPLC-System als ausreichend robust, lediglich die

Ergebnisse

Erhöhung der Flussgeschwindigkeit sowie die Anwendung eines flacheren Gradienten führten dazu, dass eine Abtrennung des vorgelagerten Peaks von *Extractable 5* nicht mehr gewährleistet werden konnte.

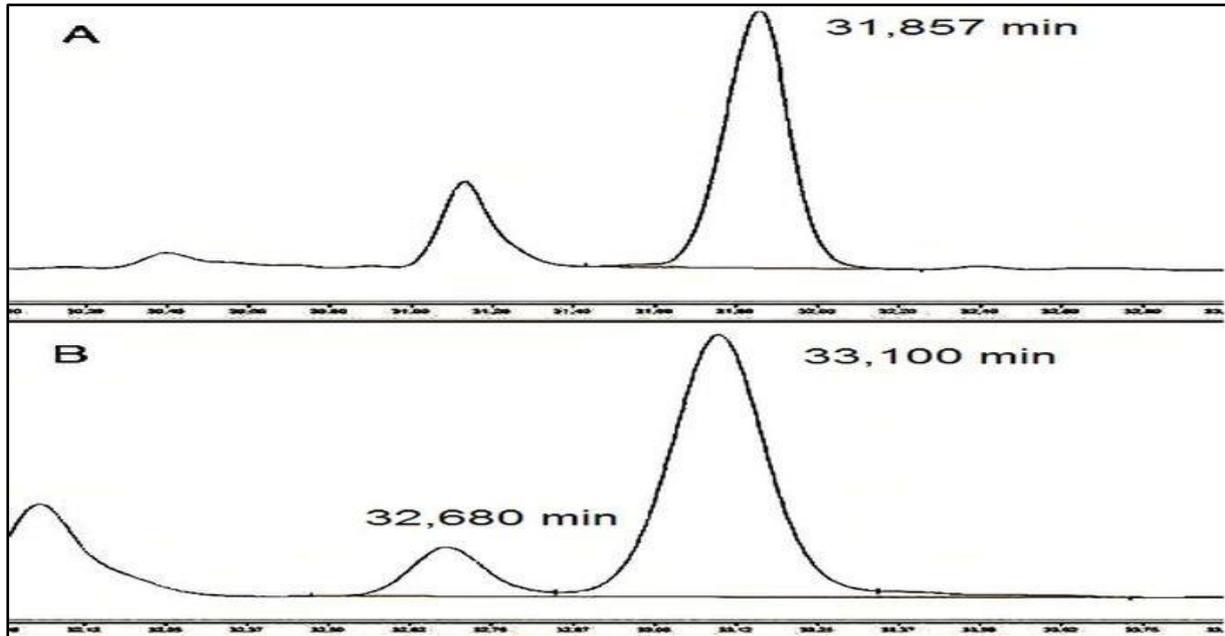


Abbildung 4.2: Robustheit – Chromatogrammausschnitt bei Variation der Flussgeschwindigkeit. A: erhöhter Fluss: *Extractable 5* (RT = 31,857 min), ist von dem ehemals vorgelagerten Peak nicht mehr abgetrennt. **B: Reduzierter Fluss:** *Extractable 5* (RT = 33,100 min) ist nun von dem vorgelagerten Peak (RT = 32,680 min) basisliniengetreunt.

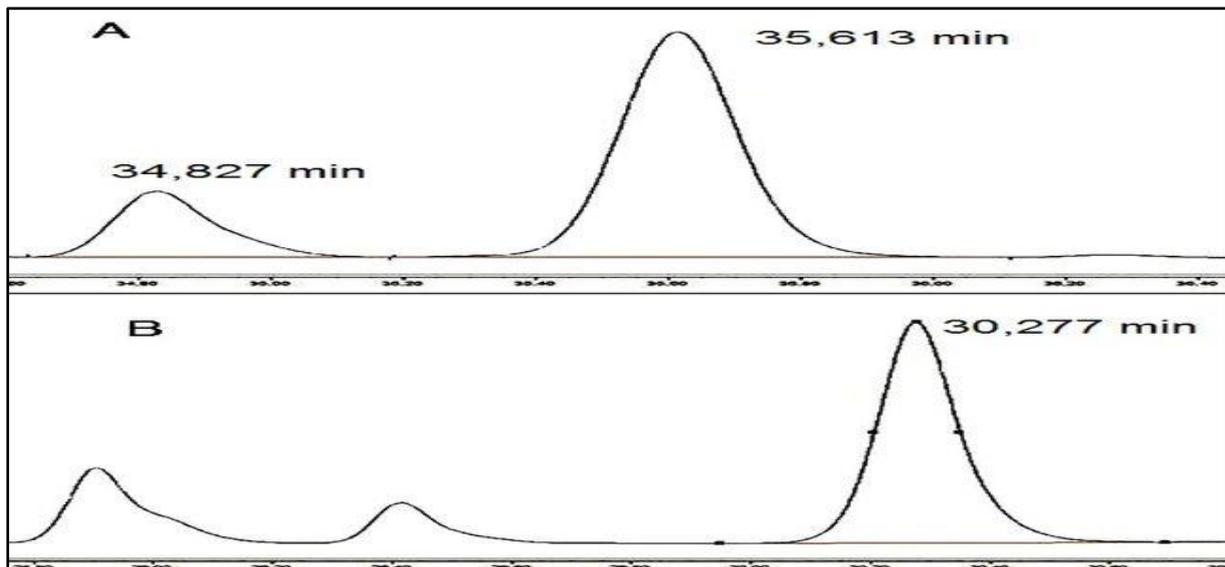


Abbildung 4.3: Robustheit – Variation des Gradienten. A: Chromatogrammausschnitt mit Gradient 1. Der vorgelagerte Peak wurde nicht detektiert, da dieser entweder mit *Extractable 5* (RT = 35,613 min) oder mit dem Peak bei RT = 34,827 min zusammengelaufen ist. **B: Chromatogrammausschnitt aus einem mit Gradient 2**

Ergebnisse

aufgenommenen Chromatogramm: Der vorgelagerte Peak ist von *Extractable 5* (RT = 30,277 min) klar abgetrennt.

Tabelle 4.1: Robustheit – Ergebnisse der Variation der verschiedenen Methodenparameter hinsichtlich der Abtrennung des vorgelagerten Peaks von *Extractable 5*. Das System reagierte weitestgehend stabil, die Variation der Flussgeschwindigkeit und des Gradienten führte jedoch dazu, dass der dem *Extractable 5* vorgelagerte Peak nicht mehr detektiert werden konnte.

Parameter	Variation	Peak abgetrennt von <i>Extractable 5</i>	System
Flussgeschwindigkeit	+ 5 %	<i>nein</i>	<i>instabil</i>
	- 5 %	ja	stabil
pH-Wert von Eluent A	+ 0,5	ja	stabil
	- 0,5	ja	stabil
Anteil ACN in Eluent B	+ 2 %	ja	stabil
	- 2 %	ja	stabil
Gradientensteilheit	Gradient 1	<i>nein</i>	<i>instabil</i>
	Gradient 2	ja	stabil
Wellenlänge 220 nm	+ 2 nm	ja	stabil
	- 2 nm	ja	stabil
Temperatur Säulenofen	+ 5 °C	ja	stabil
	- 5 °C	ja	stabil

4.1.3 Präzision

Bei der Präzision muss zwischen Gerätepräzision, Methodenpräzision und intermediärer Präzision unterschieden werden. Bei der Gerätepräzision wird lediglich die Genauigkeit des Analysengeräts selbst überprüft, während bei der Methodenpräzision die Genauigkeit des

gesamten Analysenprozesses, d. h. von der Probenpräparation bis zur Analyse, untersucht und die Variabilität berechnet wird. Unter intermediärer Präzision versteht man die Genauigkeit des gesamten Analysenprozesses unter Wiederholbedingungen, der gesamte Analysenprozess wird also nochmals von einem anderen Analysten durchgeführt, idealerweise an unterschiedlichen Tagen an unterschiedlichen Analysengeräten. Die Ergebnisse dieser Analyse werden mit den Ergebnissen der Originalanalyse verglichen und die resultierende Variabilität zwischen diesen berechnet.

Die Gerätepräzision wurde aus der 6-fachen Injektion einer Pyren-Standardlösung und einer Probe am HPLC-DAD System 1 berechnet. Hierbei ergab sich für die Standardlösung bei der Betrachtung der detektierten Peakflächen eine relative Standardabweichung von 0,35 % (siehe Tabelle 11.7 im Anhang). Für die Probe lag diese für alle neun ausgewerteten *Extractables* inklusive dem internen Standard Pyren zwischen 0,21 und 0,52 % (siehe Tabelle 11.8 im Anhang). Auch die Methodenpräzision wurde an HPLC-DAD System 1 durchgeführt, wobei jeweils sechs Probelösungen und sechs Standardlösungen präpariert und als Einfachinjektion analysiert wurden. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 11.7 für die Standardlösung und in Tabelle 11.8 für die Probelösung dargestellt und weisen für die Standardlösungen eine relative Standardabweichung von 2,48 % und für die Probelösungen 1,44 bis 2,51 % auf.

Die intermediäre Präzision wurde an HPLC-DAD System 2 durchgeführt und zur Auswertung mit den Ergebnissen der Methodenpräzision an HPLC-DAD System 1 verglichen. Obwohl Proben- und Standardpräparation analog durchgeführt worden waren, zeigte ein Vergleich der Ergebnisse, dass die Messreihe an HPLC-DAD System 2 für die *Extractables* 1-9 eine niedrigere relative Standardabweichung aufwies als an HPLC-DAD System 1 (siehe Tabelle 11.7 und Tabelle 11.8 im Anhang). Diese lag in einem Bereich von 0,29 bis 1,66 % für die *Extractables*, für den internen Standard Pyren jedoch bei 2,94 %. Für die sechs Pyren-Standardlösungen resultierte eine relative Standardabweichung von 3,87 %. Auch an HPLC-DAD System 2 ließ sich der bereits aus der Robustheitsprüfung bekannte vorgelagerte Peak von dem *Extractable* 5 durch die Funktion *split peak* abtrennen.

4.1.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Berechnung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) erfolgte einerseits gemäß Ph. Eur. über das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis), andererseits gemäß ICH Guideline Q2 (R1) mittels Kalibriergeradenverfahren [61]. Für Pyren als

Referenzsubstanz wurden der LOD und LOQ nach beiden Verfahren bei den beiden Wellenlängen 220 und 254 nm bestimmt, da dieses bei allen Studien als interner und externer Standard verwendet wurde. Zusätzlich wurde für die Referenzsubstanz TOTM als beispielhaftes Trimellitat der LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für beide genannten Wellenlängen bestimmt.

Bei der Probenpräparation im Rahmen der Interaktionsstudien (siehe Tabelle 9.6) lag Pyren in einer finalen Konzentration von 3,7 µg/ml in der Probenlösung vor. Für die manuelle Bestimmung des S/N-Verhältnisses gemäß Ph. Eur. wurden daher ausgehend von dieser Konzentration fünf verschiedene Verdünnungen im Bereich von 0,75-1,75 % (0,028 – 0,037 – 0,046 – 0,056 – 0,065 µg/ml) hergestellt und gemessen und manuell das S/N-Verhältnis berechnet (alle Ergebnisse sind in den Tabelle 11.9 und Tabelle 11.10 im Anhang dargestellt). Für den LOD musste gemäß Ph. Eur. ein S/N-Verhältnis von 3:1 gegeben sein, für den LOQ sollte ein S/N-Verhältnis von 10:1 erfüllt werden.

Das Kalibriergeradenverfahren basierte auf der Berechnung von LOD und LOQ aus der Standardabweichung der Residuen (σ) und der Geradensteigung der Kalibriergeraden (m) gemäß den Formeln:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{m}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m}$$

Für Pyren wurde eine Kalibriergerade mit denselben fünf Konzentrationsstufen aufgenommen und gemäß den obigen Formeln ausgewertet. Für Pyren resultierten bei der Berechnung mittels Kalibriergeradenverfahren ein niedrigerer LOD und LOQ als mit dem Signal/Rausch-Verfahren (siehe Tabelle 4.2).

Bei der Referenzsubstanz TOTM wurde eine Kalibriergerade mit den fünf Konzentrationsstufen 0,050 – 0,075 – 0,100 – 0,125 – 0,175 µg/ml aufgenommen und entsprechend ausgewertet. Da es sich bei den *Extractables* 6-9 um Trimellitate handelte, wurden für die finale Auswertung der Extraktions- und Interaktionsstudien die für TOTM ermittelten gerundeten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei den Wellenlängen 220 nm (LOD: 0,05 µg/ml, LOQ: 0,14 µg/ml) und 254 nm (LOD: 0,06 µg/ml, LOQ: 0,18 µg/ml) verwendet.

Tabelle 4.2: LOD und LOQ der Referenzsubstanzen Pyren und TOTM. Die Ergebnisse wurden für die Wellenlängen 220 und 254 nm über das S/N-Verhältnis gemäß Ph. Eur. und mittels Kalibriergeradenverfahren gemäß ICH Q2(R1) ermittelt.

--	Pyren				TOTM	
	LOD [$\mu\text{g/ml}$]		LOQ [$\mu\text{g/ml}$]		LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
Wellenlänge [nm]	Ph. Eur.	ICH	Ph. Eur.	ICH	ICH	ICH
220	0,026	0,005	0,087	0,016	0,047	0,144
254	0,022	0,003	0,074	0,008	0,058	0,177

4.1.5 Proben- und Standardstabilität

Die Stabilität von fertig präparierten Standard- und Probelösungen im Autosampler bei eingestellten 5 °C wurde für einen Zeitraum von 72 h untersucht, indem der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung aus allen 19 Injektionen für die einzelnen Peaks berechnet wurden. Hierbei resultierte bei der Standardlösung für die Peakfläche eine relative Standardabweichung von 1,44 %, während diese für die Probelösung in einem Bereich von 0,64 bis 2,22 % lag. Ebenfalls untersucht wurde die Stabilität der zur Herstellung von Standard und Probe verwendeten Stammlösungen, die im Kühlschrank bei 5 ± 3 °C gelagert wurden. Beim Standard handelte es sich um die Pyren-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,37 mg/ml. Als Proben-Stammlösung wurde die gemäß Kapitel 11.1.1 (im Anhang) präparierte Probelösung ohne Zusatz des internen Standards verwendet. Es wurde ein Zeitraum von 48 h betrachtet und wieder der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung der Peakflächen aller Injektionen ($n = 3$) berechnet. Hierbei resultierte für die Standardlösung eine relative Standardabweichung von 1,40 %, für die Probelösung lag diese in einem Bereich von 0,98-2,60 %. Die einzelnen Ergebnisse können Tabelle 11.16 sowie Tabelle 11.17 (beide im Anhang) entnommen werden.

4.1.6 Fazit der Validierung

Die Ergebnisse der Validierung zeigten, dass die HPLC-Methode für die qualitative und quantitative Analyse von *Extractables* aus Gummistopfen geeignet war. Während die

Extractables 1-5 bei 220 nm ausgewertet werden konnten, mussten die *Extractables* 6-9 jedoch aufgrund ihrer hohen UV-Aktivität bei der Wellenlänge 254 nm ausgewertet werden, da die gewählten Linearitätsbedingungen bei 220 nm nicht eingehalten werden konnten. Zusätzlich stellte sich heraus, dass trotz der Verwendung von Pyren als internem Standard die Ergebnisse auf den zwei eingesetzten HPLC-Systemen 1 und 2 voneinander abwichen und die berechneten Flächenverhältnisse $\text{Fläche}_{\text{Extractable}}/\text{Fläche}_{\text{IS}}$ auf dem HPLC-System 1 immer geringer ausfielen. Um eine Vergleichbarkeit von auf beiden Systemen erzeugten Daten zu gewährleisten, musste daher ein Korrekturfaktor verwendet werden, welcher als Faktor 1,126 berechnet wurde (siehe hierzu Tabelle 11.18 im Anhang). Demnach mussten die auf dem HPLC-System 2 erzeugten Flächenverhältnisse durch diesen Faktor dividiert werden, um eine Vergleichbarkeit mit den Daten auf HPLC-System 1 zu gewährleisten.

4.2 Qualität der Gummistopfen

Die erworbenen Gummistopfen wurden auf Übereinstimmung mit dem durch Ph. Eur. 3.2.9, USP <381> und JP 7.03 definierten Qualitätsstandard geprüft. Sofern Zertifikate zur Bestätigung der Übereinstimmung von den Lieferanten bereitgestellt werden konnten, wurde auf eine eigene Prüfung verzichtet. Insgesamt wurden sechs Gummistopfen aus Bromobutylgummi (BB1-BB6) und vier Gummistopfen aus Chlorobutylgummi (CB1-CB4) von sieben verschiedenen Lieferanten bezogen (siehe Tabelle 9.1). Hierbei nahm der Gummistopfen CB4 eine Sonderstellung ein, da es sich bei diesem um einen laminierten Gummistopfen handelte. Die Laminierung aus Ethylentetrafluoroethylen (ETFE) stellt eine physikalische Barriere zwischen dem Basiselastomer und dem Arzneimittel dar, wodurch die Migration von *Leachables* aus dem Basiselastomer in das Arzneimittel reduziert wird. Da das Ph. Eur. 3.2.9 zum Zeitpunkt der praktischen Arbeiten jedoch ausdrücklich die Prüfung von beschichteten/laminierten Gummistopfen ausschloss und dieser Gummistopfen hauptsächlich zu Vergleichszwecken bei den Extraktionsstudien (siehe Kapitel 4.3.2) diente, wurde auf weitere Prüfungen verzichtet. Zudem lagen für das Basiselastomer ohne Laminierung auch die Zertifikate gemäß Ph. Eur. und USP vor.

Der geforderte Prüfumfang gemäß Ph. Eur. und USP entsprach sich weitestgehend (siehe Tabelle 9.2). Das JP hingegen unterschied sich erheblich von Ph. Eur. und USP, sowohl hinsichtlich des Prüfumfanges als auch in der Herstellung der Prüflösung. Für die Prüfung nach Ph. Eur. und USP wurde die Prüflösung mit jeweils 10 Gummistopfen hergestellt, da diese Anzahl der geforderten Gesamtoberfläche von 100 cm² entsprach (alle gekauften

Ergebnisse

Gummistopfen hatten 13 mm Zapfendurchmesser und eigneten sich als Verschluss für Injektionsflaschen mit 20 mm Bördelranddurchmesser). Die Prüflösung nach JP wurde mit jeweils 20 Gummistopfen hergestellt, da nach damaligem Stand gemäß JP das Gewicht der Gummistopfen berücksichtigt wurde. Auch der Reinigungsschritt vor der Herstellung der eigentlichen Prüflösung unterschied sich wesentlich: Während die Gummistopfen gemäß Ph. Eur. und USP vorher durch 5-minütiges Kochen in Wasser gereinigt wurden, forderte das JP lediglich die Reinigung mit kaltem Wasser ohne definierte Anzahl an Spülschritten. Alle nach Ph. Eur., USP und JP erforderlichen Prüfungen in wässriger Prüflösung wurden durchgeführt. Prüfungen am Gummistopfen (Bestimmung von *Cadmium* und *Blei* gemäß JP) oder dem Gummimaterial selbst sowie die gemäß JP geforderten Parameter *Systemische Toxizität*, *Pyrogen Test* und *Haemolyse Test*, waren nicht Teil des aktuellen Promotionsvorhabens.

Alle erworbenen Gummistopfen erfüllten die Spezifikationen gemäß Ph. Eur. und USP. Die im JP definierten Spezifikationen wurden jedoch nicht von allen Gummistopfen eingehalten, so entsprachen die Gummistopfen BB3, BB4, CB1 und CB2 nicht der Spezifikation des Parameters *Transparenz*, d. h. die entsprechenden Prüflösungen waren nicht ausreichend transparent (siehe Tabelle 4.4, Tabelle 4.6, Tabelle 4.7 und Tabelle 4.10). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit dem Ph. Eur. und dem USP war nicht möglich, da dieser Parameter lediglich gemäß JP gefordert wurde.

Tabelle 4.3: Prüfung des Bromobutylstopfens BB3 nach USP

Parameter	Spezifikation USP	Ergebnis BB3
<i>Opaleszenz</i>	≤ Referenzsuspension B	entspricht
<i>Farbe</i>	≤ Farbstandard	entspricht
<i>Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen</i>	≤ 0,3 ml NaOH (0,01 M) oder ≤ 0,8 ml HCl (0,01 M)	entspricht
<i>Absorption</i>	≤ 0,2 AU zw. 220-360 nm	0,1 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 3,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	0,70 ml
<i>Extrahierbare Schwermetalle</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Ammonium</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 5,0 mg/l	0,70 mg/l
<i>Flüchtige Sulfide</i>	Färbung _{Probe} ≤ Färbung _{Standard}	entspricht

Ergebnisse

Tabelle 4.4: Prüfung des Bromobutylstopfens BB3 nach JP. ¹ Der Gummistopfen BB3 entspricht nicht JP hinsichtlich der Transparenz bei 430 nm und der reduzierenden Substanzen.

Parameter	Spezifikation JP	Ergebnis BB3
<i>Klarheit</i>	klar	entspricht
<i>Farbe</i>	farblos	entspricht
<i>Transparenz (430 nm, 650 nm)</i>	≥ 99,0 %	98,6 % (430 nm) ¹ 99,4 % (650 nm)
<i>Absorption</i>	≤ 0,20 AU zw. 220-350 nm	0,17 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 2,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	2,9 ml*
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 10,0 mg/l	1,0 mg/l
<i>Verdampfungsrückstand</i>	2,0 mg/100 ml	1,0 mg/100 ml
<i>Schaumtest</i>	innerhalb von 3 min fast kein Schaum mehr	entspricht
<i>pH-Wert</i>	Δ pH ≤ 1,0	Δ pH = 0,1
<i>Cadmium</i>	≤ 0,5 mg/l	nicht geprüft
<i>Blei</i>	≤ 1,0 mg/l	nicht geprüft

Tabelle 4.5: Prüfung des Bromobutylstopfens BB4 nach USP

Parameter	Spezifikation USP	Ergebnis BB4
<i>Opaleszenz</i>	≤ Referenzsuspension B	entspricht
<i>Farbe</i>	≤ Farbstandard	entspricht
<i>Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen</i>	≤ 0,3 ml NaOH (0,01 M) oder ≤ 0,8 ml HCl (0,01 M)	entspricht
<i>Absorption</i>	≤ 0,2 AU zw. 220-360 nm	0,1 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 3,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	1,1 ml
<i>Extrahierbare Schwermetalle</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Ammonium</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 5,0 mg/l	0,66 mg/l
<i>Flüchtige Sulfide</i>	Färbung _{Probe} ≤ Färbung _{Standard}	entspricht

Die Gummistopfen BB3 und BB4 fielen zusätzlich noch bei einem weiteren Parameter gemäß JP durch, nämlich bei der Prüfung der *Reduzierenden Substanzen*. Da dieser Parameter jedoch auch gemäß Ph. Eur. und USP gefordert wurde, war in diesem Fall ein

Ergebnisse

direkter Vergleich der Ergebnisse möglich und zeigte, dass dieselben Gummistopfen die Prüfung gemäß Ph. Eur. und USP bestanden hatten.

Auch bei der Prüfung des Parameters *Extrahierbares Zink* mittels AAS-Technik fiel auf, dass bei den Gummistopfen BB3 und BB4 das Ergebnis der Prüfung gemäß JP immer deutlich höher ausfiel als bei der parallelen Prüfung gemäß Ph. Eur./USP. Beide AAS-Methoden waren aufgrund einiger methodischer Unterschiede unabhängig voneinander validiert worden und für ihren Zweck geeignet (siehe hierzu Kapitel 11.2 im Anhang).

Tabelle 4.6: Prüfung des Bromobutylstopfens BB4 nach JP. ¹ Der Gummistopfen BB4 entspricht nicht JP hinsichtlich der Transparenz bei 430 nm und der reduzierenden Substanzen.

Parameter	Spezifikation JP	Ergebnis BB4
<i>Klarheit</i>	klar	entspricht
<i>Farbe</i>	farblos	entspricht
<i>Transparenz (430nm, 650nm)</i>	≥ 99,0 %	98,0 % (430 nm) ¹ 99,3 % (650 nm)
<i>Absorption</i>	≤ 0,20 AU zw. 220-350 nm	0,16 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 2,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	2,9 ml ¹
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 10,0 mg/l	1,1 mg/l
<i>Verdampfungsrückstand</i>	2,0 mg/100 ml	-0,1 mg/100 ml
<i>Schaumtest</i>	innerhalb von 3 min fast kein Schaum mehr	entspricht
<i>pH-Wert</i>	Δ pH ≤ 1,0	Δ pH = 0,8
<i>Cadmium</i>	≤ 0,5 mg/l	nicht geprüft
<i>Blei</i>	≤ 1,0 mg/l	nicht geprüft

Tabelle 4.7: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB1 nach JP. ¹ Der Gummistopfen CB1 entspricht nicht JP hinsichtlich der Transparenz bei 430 nm.

Parameter	Spezifikation JP	Ergebnis CB1
<i>Klarheit</i>	klar	entspricht
<i>Farbe</i>	farblos	entspricht
<i>Transparenz (430nm,650nm)</i>	≥ 99,0 %	98,7 % (430 nm) ¹ 100,2 % (650 nm)
<i>Absorption</i>	≤ 0,20 AU zw. 220-350 nm	0,06 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 2,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	1,0 ml

Ergebnisse

<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 10,0 mg/l	0,23 mg/l
<i>Verdampfungsrückstand</i>	2,0 mg/100 ml	-1,2 mg/100 ml
<i>Schaumtest</i>	innerhalb von 3 min fast kein Schaum mehr	entspricht
<i>pH-Wert</i>	Δ pH ≤ 1,0	Δ pH = 0,4
<i>Cadmium</i>	≤ 0,5 mg/l	nicht geprüft
<i>Blei</i>	≤ 1,0 mg/l	nicht geprüft

Tabelle 4.8: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB2 nach USP

Parameter	Spezifikation USP	Ergebnis CB2
<i>Opaleszenz</i>	≤ Referenzsuspension B	entspricht
<i>Farbe</i>	≤ Farbstandard	entspricht
<i>Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen</i>	≤ 0,3 ml NaOH (0,01 M) oder ≤ 0,8 ml HCl (0,01 M)	entspricht
<i>Absorption</i>	≤ 0,2 AU zw. 220-360 nm	0,0 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 3,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	-0,05 ml (bezogen auf Blank)
<i>Schwermetalle</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Ammonium</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 5,0 mg/l	< Nachweisgrenze
<i>Flüchtige Sulfide</i>	Färbung _{Probe} ≤ Färbung _{Standard}	entspricht

Tabelle 4.9: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB2 nach Ph. Eur.

Parameter	Spezifikation Ph. Eur.	Ergebnis CB2
<i>Opaleszenz</i>	≤ Referenzsuspension II	entspricht
<i>Farbe</i>	≤ Farbvergleichslösung GG ₅	entspricht
<i>Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen</i>	≤ 0,3 ml NaOH (0,01 M) oder ≤ 0,8 ml HCl (0,01 M)	0,13 ml NaOH (0,01 M)
<i>Absorption</i>	≤ 0,2 AU zw. 220-360 nm	0,0 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 3,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	-0,05 ml (bezogen auf Blank)
<i>Ammonium</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 5,0 mg/l	< Nachweisgrenze
<i>Extrahierbare Schwermetalle</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l

Ergebnisse

<i>Verdampfungsrückstand</i>	2,0 mg / 100 ml	0,1 mg / 100 ml
<i>Flüchtige Sulfide</i>	Färbung _{Probe} ≤ Färbung _{Standard}	entspricht

Tabelle 4.10: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB2 nach JP. ¹ Der Gummistopfen CB2 entspricht nicht JP hinsichtlich der Transparenz bei 430 nm.

Parameter	Spezifikation JP	Ergebnis CB2
<i>Klarheit</i>	klar	entspricht
<i>Farbe</i>	farblos	entspricht
<i>Transparenz (430nm, 650nm)</i>	≥ 99,0 %	98,9 % (430 nm) ¹ 99,8 % (650 nm)
<i>Absorption</i>	≤ 0,20 AU zw. 220-350 nm	0,02 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 2,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	0,73 ml
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 10,0 mg/l	< Nachweisgrenze
<i>Verdampfungsrückstand</i>	2,0 mg/100 ml	-0,1 mg/100 ml
<i>Schaumtest</i>	innerhalb von 3 min fast kein Schaum mehr	entspricht
<i>pH-Wert</i>	Δ pH ≤ 1,0	Δ pH = 1,0
<i>Cadmium</i>	≤ 0,5 mg/l	nicht geprüft
<i>Blei</i>	≤ 1,0 mg/l	nicht geprüft

Tabelle 4.11: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB3 nach USP

Parameter	Spezifikation USP	Ergebnis CB3
<i>Opaleszenz</i>	≤ Referenzsuspension B	entspricht
<i>Farbe</i>	≤ Farbstandard	entspricht
<i>Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen</i>	≤ 0,3 ml NaOH (0,01 M) oder ≤ 0,8 ml HCl (0,01 M)	entspricht
<i>Absorption</i>	≤ 0,2 AU zw. 220-360 nm	0,0 AU
<i>Reduzierende Substanzen</i>	≤ 3,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	0,12 ml
<i>Schwermetalle</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Ammonium</i>	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
<i>Extrahierbares Zink</i>	≤ 5,0 mg/l	< Nachweisgrenze
<i>Flüchtige Sulfide</i>	Färbung _{Probe} ≤ Färbung _{Standard}	entspricht

Ergebnisse

Tabelle 4.12: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB3 nach Ph. Eur.

Parameter	Spezifikation Ph. Eur.	Ergebnis CB3
Opaleszenz	≤ Referenzsuspension II	entspricht
Farbe	≤ Farbvergleichslösung GG ₅	entspricht
Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen	≤ 0,3 ml NaOH (0,01 M) oder ≤ 0,8 ml HCl (0,01 M)	0,05 ml NaOH (0,01 M)
Absorption	≤ 0,2 AU zw. 220-360 nm	0,0 AU
Reduzierende Substanzen	≤ 3,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	0,12 ml
Ammonium	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
Extrahierbares Zink	≤ 5,0 mg/l	< Nachweisgrenze
Extrahierbare Schwermetalle	≤ 2,0 mg/l	< 2,0 mg/l
Verdampfungsrückstand	2,0 mg/100 ml	-0,3 mg/100 ml
Flüchtige Sulfide	Färbung _{Probe} ≤ Färbung _{Standard}	entspricht

Tabelle 4.13: Prüfung des Chlorobutylstopfens CB3 nach JP

Parameter	Spezifikation JP	Ergebnis CB3
Klarheit	klar	entspricht
Farbe	farblos	entspricht
Transparenz (430nm, 650nm)	≥ 99,0 %	99,0 % (430 nm) 99,6 % (650 nm)
Absorption	≤ 0,20 AU zw. 220-350 nm	0,04 AU
Reduzierende Substanzen	≤ 2,0 ml Natriumthiosulfat (0,01 M)	0,55 ml
Extrahierbares Zink	≤ 10,0 mg/l	< Nachweisgrenze
Verdampfungsrückstand	2,0 mg/100 ml	-0,3 mg/100 ml
Schaumtest	innerhalb von 3 min fast kein Schaum mehr	entspricht
pH-Wert	Δ pH ≤ 1,0	Δ pH = 0,3
Cadmium	≤ 0,5 mg/l	nicht geprüft
Blei	≤ 1,0 mg/l	nicht geprüft

4.3 Extraktionsversuche

4.3.1 Aufnahme der Extraktionsprofile

Von den verschiedenen Gummistopfen (siehe Tabelle 9.1) wurden Extraktionsprofile aufgenommen, die in Abbildung 4.4 dargestellt sind. Obwohl es sich bei allen Gummistopfen ausschließlich um Bromobutyl- oder Chlorobutylstopfen handelte, wies jeder Gummistopfen ein individuelles Extraktionsprofil auf, d. h. aus jedem Gummistopfen ließen sich mit Isopropanol (IPA) unterschiedliche *Extractables* verschiedenster Polarität extrahieren. Aufgrund des eingestellten Gradienten eluierten zuerst die *Extractables* mit der höchsten Polarität, eher unpolare *Extractables* eluierten später.

Der Gummistopfen CB1 zeigte von allen Gummistopfen das Extraktionsprofil mit der höchsten Anzahl und Konzentration an detektierten *Extractables*. Mit IPA als Extraktionsmittel wurden aus diesem Gummistopfen *Extractables* verschiedenster Polaritäten extrahiert. Diese lagen auch in weitaus höheren Konzentrationen vor, als dies bei den anderen Gummistopfen der Fall war. Aus der Vielzahl der detektierten *Extractables* wurden die prägnantesten neun Peaks ausgewählt und anhand von diesen eine Quantifizierung vorgenommen. Dabei resultierte eine Konzentration an *Extractables* von 5,6 mg pro Gummistopfen CB1, ausgedrückt als Trimellitat (für nähere Informationen zur Berechnung siehe Kapitel 11.3 im Anhang).

Zu Vergleichszwecken wurde zusätzlich eine Quantifizierung des Gummistopfens BB6 vorgenommen, da dieser ein eher unauffälliges Extraktionsprofil aufwies (siehe Abbildung 4.4, Graph I). Für diesen Gummistopfen wurden alle detektierten *Extractables* zur Auswertung herangezogen, wodurch sich eine Konzentration an *Extractables* von 0,03 mg pro Gummistopfen BB6 ausgedrückt als Trimellitat ergab.

Von den Bromobutylstopfen wies BB2 das Extraktionsprofil mit der höchsten Anzahl und Konzentration an *Extractables* auf (siehe Abbildung 4.4, Graph F). Dieser Gummistopfen wurde daher neben dem Chlorobutylstopfen CB1 auch für die anschließenden Interaktionsstudien (siehe hierzu Kapitel 4.5) verwendet.

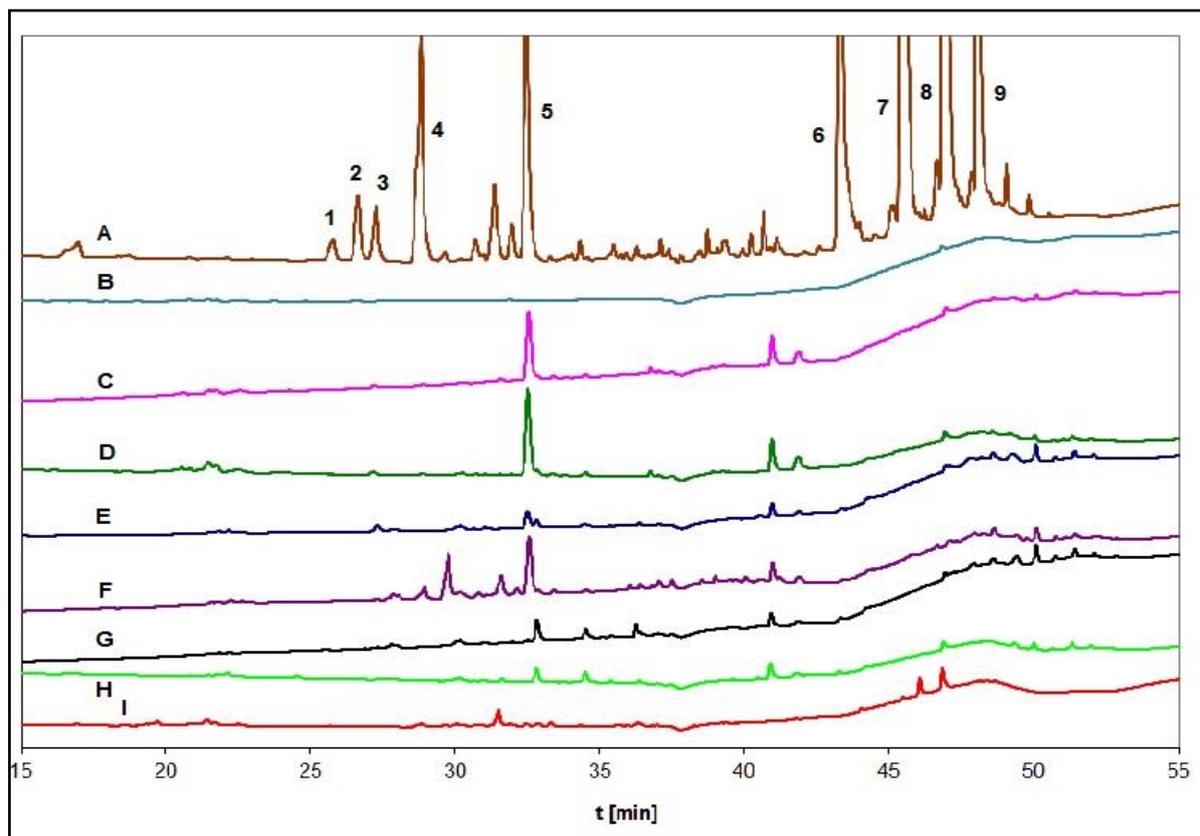


Abbildung 4.4: Extraktionsprofile der verschiedenen Gummistopfen. Die Extraktionsprofile wurden durch Extraktion mit IPA (A, C-I) und Wasser (B) für 3 h unter reflux-Bedingungen erzeugt. A, B, Chlorobutylstopfen CB1; C, Chlorobutylstopfen CB2; D, Chlorobutylstopfen CB3; E, Bromobutylstopfen BB1; F, Bromobutylstopfen BB2; G, Bromobutylstopfen BB3; H, Bromobutylstopfen BB4; I, Bromobutylstopfen BB6. Charakteristische Signale: t_R (Extractable 1) = 26,0 min, t_R (Extractable 2) = 26,8 min, t_R (Extractable 3) = 27,5 min, t_R (Extractable 4) = 29,1 min, t_R (Extractable 5) = 32,4 min, t_R (Extractable 6) = 43,4 min, t_R (Extractable 7) = 45,7 min, t_R (Extractable 8) = 47,3 min, t_R (Extractable 9) = 48,5 min, Wellenlänge: 220 nm

Mit dem Gummistopfen CB1 wurde auch der Einfluss der Extraktionszeit auf die Vollständigkeit der Extraktion untersucht, indem jeweils ein Gummistopfen für 1 – 3 – 6 Stunde/n unter reflux-Bedingungen mit IPA extrahiert wurde (siehe Abbildung 11.12 im Anhang). In Abhängigkeit von der angewandten Extraktionszeit nahm die Konzentration an *Extractables* zu. Nach drei Stunden Extraktion stieg die gemessene Konzentration um 75 %, verglichen mit dem Ergebnis nach einer Stunde Extraktion. Weitere drei Stunden Extraktion führten zu einer weiteren Konzentrationszunahme von 40 %, aus qualitativer Sicht wurden jedoch keine zusätzlichen *Extractables* detektiert. Daraus wurde geschlossen, dass drei Stunden Extraktionszeit ausreichen, um ein qualitativ vollständiges Extraktionsprofil zu erhalten.

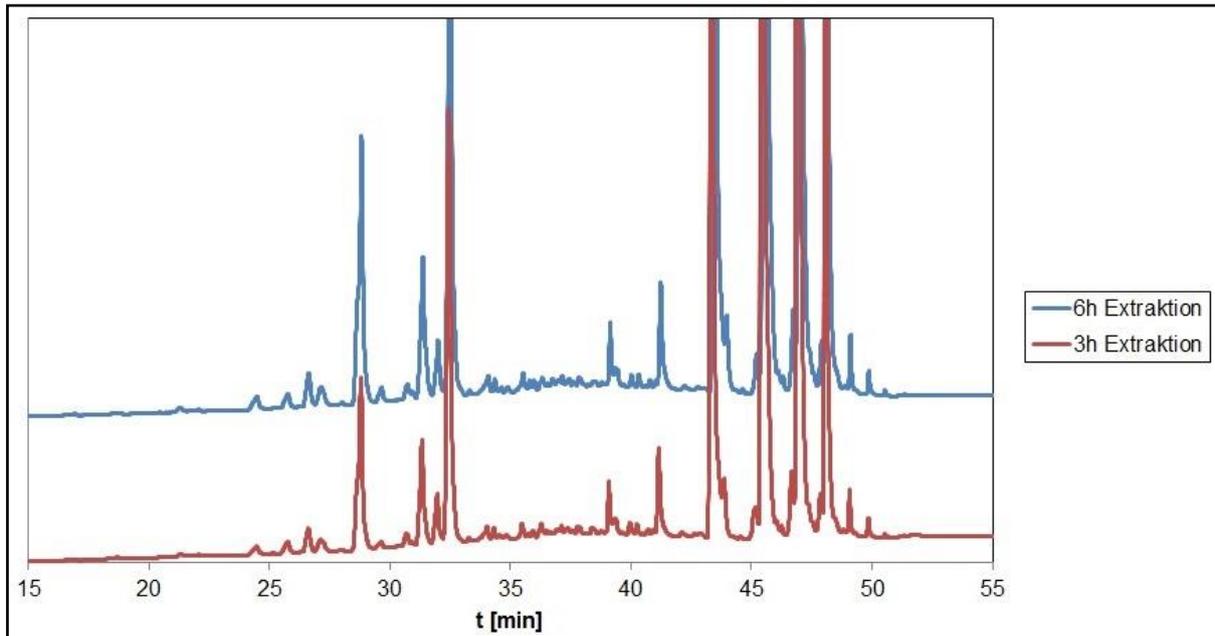


Abbildung 4.5: Extraktionsprofil von Gummistopfen CB1 unter reflux-Bedingungen in Abhängigkeit von der Extraktionszeit. Der blaue Graph zeigt das Extraktionsprofil nach 6 h Extraktion unter reflux-Bedingungen, der rote Graph entspricht dem Extraktionsprofil nach 3 h Extraktion. Wellenlänge: 220 nm

Um den Einfluss des verwendeten Extraktionsmittels näher zu untersuchen, wurde Gummistopfen CB1 unter denselben Versuchsbedingungen auch mit Wasser extrahiert (siehe Abbildung 4.4, Graph B). Unter identischen Versuchsbedingungen ließen sich demnach mit Wasser als Extraktionsmittel keine *Extractables* aus Gummistopfen CB1 extrahieren, während mit IPA aus demselben Gummistopfen 5,6 mg *Extractables* extrahiert werden konnten. Die vorliegenden Extraktionsprofile boten einen ersten Überblick bezüglich der Unterschiede, aber auch der Gemeinsamkeiten der verschiedenen Gummistopfen. So wiesen die Gummistopfen CB2 und CB3 sowohl qualitativ als auch quantitativ betrachtet ein nahezu identisches Extraktionsprofil auf (siehe Abbildung 4.6). Besonders prägnant waren hierbei die Peaks bei 32,6 min und im Bereich zwischen 41-43 min, wobei sich der Peak bei 32,6 min auch in dem Extraktionsprofil von Gummistopfen CB1 wiederfand (siehe Abbildung 4.4, Graph A, gekennzeichnet als *Extractable 5*).

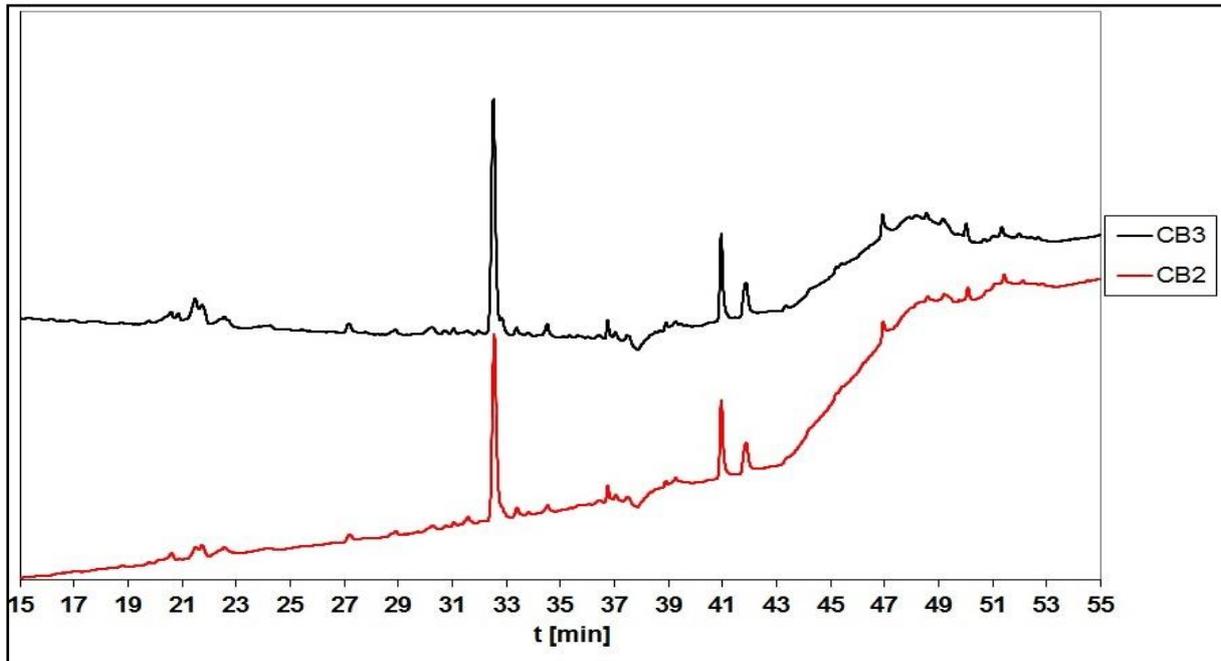


Abbildung 4.6: Vergleich der Extraktionsprofile von Gummistopfen CB2 und CB3. Beide Chromatogramme weisen einen Peak bei 32,6 min und zwei Peaks im Bereich von 41-43 min auf. Wellenlänge: 220 nm

4.3.2 Extraktionsstudien

Parallel zu der Aufnahme der Extraktionsprofile der verschiedenen Gummistopfen und der Untersuchung der Vollständigkeit der Extraktion unter reflux-Bedingungen in Abhängigkeit von der angewandten Extraktionszeit anhand von Gummistopfen CB1 wurde ebenfalls mit diesem Gummistopfen die Extraktionskinetik unter forcierten Lagerbedingungen bei 40 °C und 75 % r. F. und IPA als Extraktionsmittel untersucht (Einzelheiten zur Durchführung siehe Kapitel 9.1.7.2). In Abbildung 4.7 sind die Chromatogramme nach einem Tag Lagerung und 56 Tagen (acht Wochen) Lagerung dargestellt. Schon nach einem Tag Lagerung wurden alle neun *Extractables* detektiert, die anhand des Extraktionsprofils von Gummistopfen CB1 bereits bekannt waren. Hierbei waren wieder die *Extractables* 6, 7, 8 und 9 besonders prägnant, während die *Extractables* 1-4 nur sehr schwach ausgeprägt waren. *Extractable* 5 war ebenfalls gut detektierbar.

Nach 56 Tagen Lagerung waren dann alle neun *Extractables* gut detektierbar. Abbildung 4.8 stellt die Ergebnisse der Extraktionsstudie von Gummistopfen CB1 unter Lagerbedingungen den Ergebnissen der Extraktion unter reflux-Bedingungen in Abhängigkeit von der Extraktionszeit gegenüber. Mit fortschreitender Lagerung nahm die Konzentration an *Extractables* kontinuierlich zu, ohne ein konstantes Konzentrationsniveau zu erreichen. Nach

56 Tagen Lagerung resultierte mit 1057 $\mu\text{g/ml}$ eine vergleichbare Konzentration an *Extractables* zu den Ergebnissen nach 3 h Extraktion unter reflux-Bedingungen (1144 $\mu\text{g/ml}$). Aufgrund der kontinuierlichen Zunahme der Konzentration an *Extractables* während der Lagerung kann angenommen werden, dass sich auch nach 56-tägiger Lagerung bei 40 °C und 75 % r. F. noch kein Gleichgewicht zwischen Gummistopfen und Extraktionsmittel eingestellt hatte und eine fortgesetzte Lagerung zu einer weiteren Konzentrationszunahme geführt hätte. Der Vergleich der aufgenommenen Chromatogramme unter Lagerbedingungen mit dem Extraktionsprofil von Gummistopfen CB1 zeigte zudem, dass die angewandten Lagerbedingungen zu einer qualitativ vollständigen Extraktion führten, d. h. alle im Extraktionsprofil vorhandenen *Extractables* wurden auch nach 56 Tagen Lagerung detektiert.

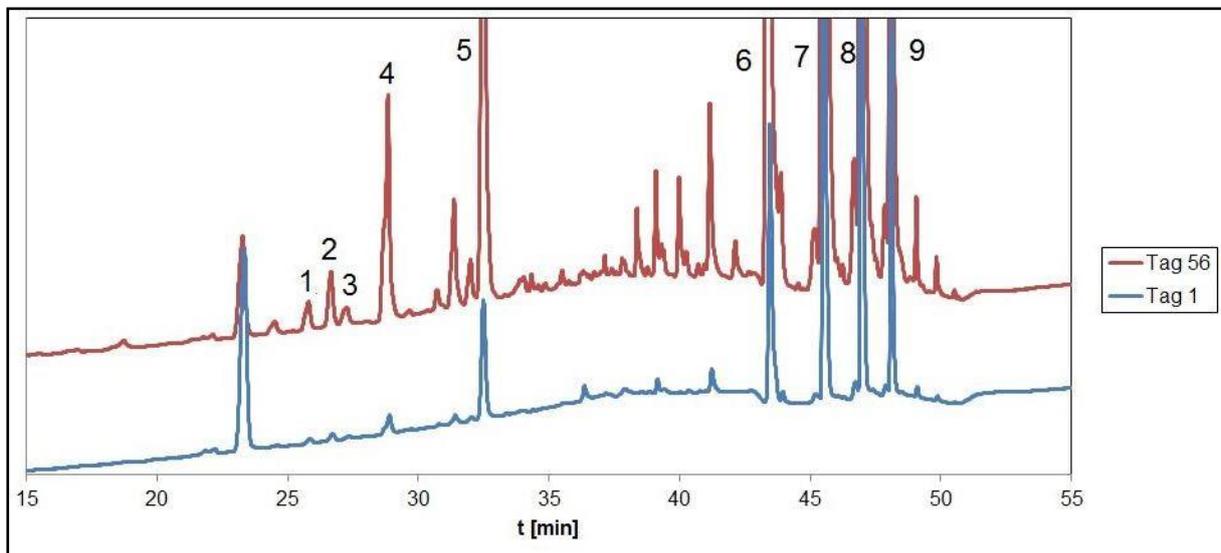


Abbildung 4.7: Chromatogramme von Gummistopfen CB1 in Abhängigkeit von der Lagerdauer. Bereits nach einem Tag Lagerung in Isopropanol (IPA) unter forcierten Bedingungen waren alle *Extractables* 1-9 in geringen Konzentrationen nachweisbar. Nach 56 Tagen Lagerung hatte die Konzentration aller *Extractables* merklich zugenommen. Wellenlänge: 220 nm

Zu Vergleichszwecken wurde mit dem beschichteten Gummistopfen CB4 ebenfalls eine Extraktionsstudie unter forcierten Bedingungen bei 40 °C und 75 % r. F. mit IPA und Wasser als Extraktionsmittel durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog zu der mit dem Gummistopfen CB1 durchgeführten Extraktionsstudie. Beide Gummistopfen CB1 und CB4 stammten von demselben Hersteller, basierten auf Chlorobutyl und wurden mittels unkonventioneller Vulkanisation, d. h. ohne Schwefel, hergestellt. Weitere Informationen zur genauen Zusammensetzung der beiden Gummistopfen-Typen waren nicht zugänglich. Da es

sich bei CB1 um den Gummistopfen mit der höchsten Konzentration an extrahierbaren *Extractables* handelte, sollte mit dem laminierten Gummistopfen CB4 (für nähere Informationen siehe Kapitel 4.2) der Einfluss seiner Fluoropolymer-Laminierung auf die Migration von *Extractables* untersucht werden. Nach 56 Tagen Lagerung bei 40 °C und 75 % r. F. wurde bei der Verwendung von IPA als Extraktionsmittel lediglich ein *Extractable* mit nur sehr geringer Signalintensität detektiert (siehe Graph D in Abbildung 4.9). Bei der Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel wurden auch nach 56 Tagen Lagerung keine *Extractables* detektiert (siehe Graph B in Abbildung 4.9). Der Gummistopfen CB4 reagierte demnach nahezu inert auf die angewandten Extraktionsbedingungen und wies dadurch die niedrigste Konzentration an *Extractables* von allen geprüften Chlorobutylstopfen auf.

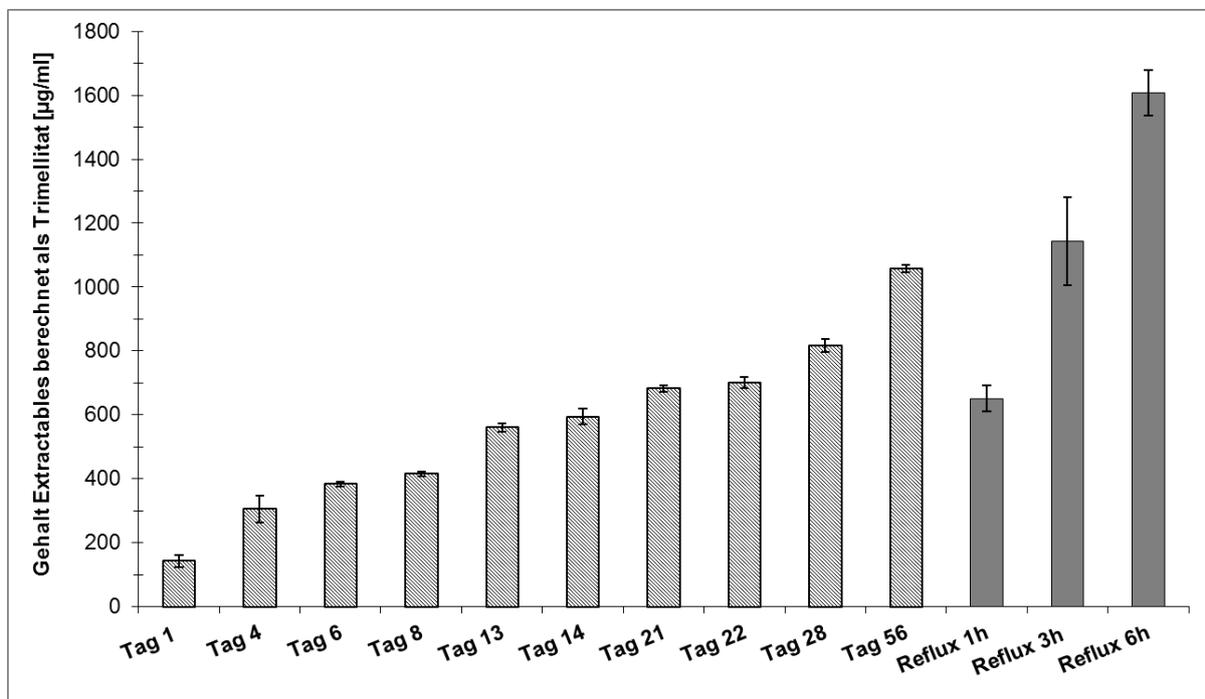


Abbildung 4.8: Vergleich der *Extractables*-Konzentration bei Extraktion unter forcierten Lagerbedingungen und unter reflux-Bedingungen von Gummistopfen CB1 (ausgedrückt als Trimellitat in [µg/ml] ± SD). Unter reflux-Bedingungen resultierte nach 6 h eine Konzentration von 1607 ± 72 µg/ml an *Extractables*. Unter Lagerbedingungen wurde nach 56 Tagen eine Konzentration an *Extractables* (1057 ± 12 µg/ml) gemessen, welche vergleichbar mit dem Ergebnis nach 3 h unter reflux-Bedingungen ist (1144 ± 138 µg/ml).

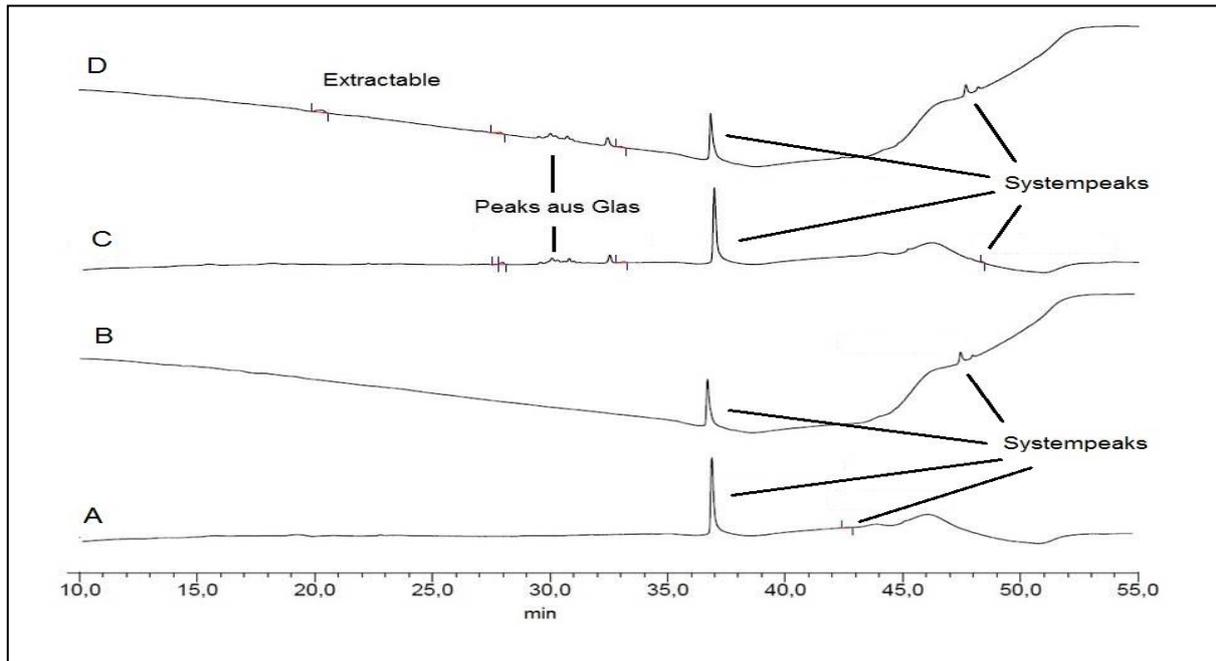


Abbildung 4.9: Extraktionsstudie von Gummistopfen CB4 mit Wasser und IPA als Extraktionsmittel. Bei einer Lagerung in Wasser resultiert nach 4 Tagen Graph A, nach 56 Tagen Graph B. Bei der Lagerung in IPA resultiert nach 4 Tagen Graph C und nach 56 Tagen Graph D. Wellenlänge: 220 nm

4.4 Strukturelle Identifikation der Extractables 6-9

Die aufgenommenen UV-Spektren (siehe Abbildung 4.10) zeigten, dass es sich bei den *Extractables* 6-9 (RT: 43,3 – 45,7 – 47,3 – 48,5 min) um strukturell sehr ähnliche Verbindungen handelte. Diese wiesen bei den vier Substanzen jeweils drei Absorptionsmaxima bei etwa 207, 232 und 283 nm auf. Diese drei Absorptionsmaxima sind ein Indiz für ein aromatisches System, wobei es sich bei 207 nm um die β -Bande handelt, einem erlaubten Übergang, während die Absorptionsmaxima bei 232 und 283 nm die weniger intensiven p - und α -Bande darstellen, bei welchen es sich um verbotene Übergänge handelt [62].

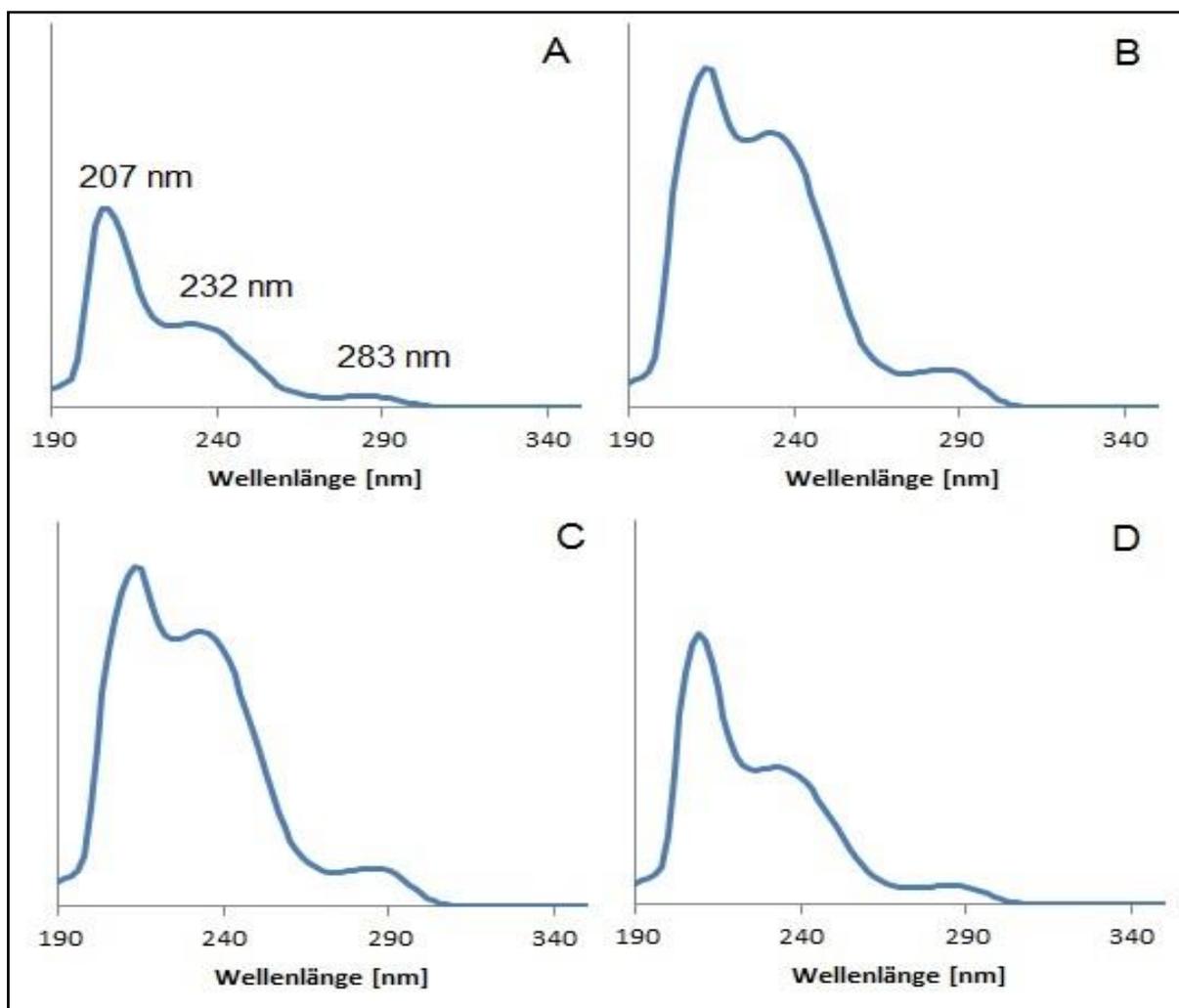


Abbildung 4.10: UV-Spektren der *Extractables* 6-9. A: *Extractable* 6, B: *Extractable* 7, C: *Extractable* 8, D: *Extractable* 9. Alle UV-Spektren wiesen jeweils drei Maxima bei 207, 232 und 283 nm auf.

Die aromatische Struktur wurde auch durch die resultierenden NMR-Spektren bestätigt: Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *Extractable* 6 wies drei Signale im aromatischen Bereich auf (ein Dublett: mit dem Integral 1,0 und der Verschiebung δ 8,4; ein Dublett: mit dem Integral 1,1 und der Verschiebung δ 8,2; ein Singulett mit dem Integral 1,1 und der Verschiebung δ 7,7). Die Aufspaltung der Signale deutete auf einen Aromaten mit Substitution an den Positionen 1, 2 und 4 hin (siehe Abbildung 4.11). Weitere Signalgruppen (ein Multipllett mit dem Integral 6,6 und der Verschiebung δ 4,31; ein Multipllett mit dem Integral 6,9 und der Verschiebung δ 1,73, ein weiteres Multipllett mit den Integralen 37,8 (*Extractable* 6) – 42,2 (*Extractable* 7) – 47,0 (*Extractable* 8) – 54,6 (*Extractable* 9) und der Verschiebung δ 1,30) im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigten, dass es sich bei den drei Substituenten um Ester-Reste des Typs $-(\text{CO})-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ handelte. Das zusätzlich aufgenommene $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (siehe

Abbildung 11.20 im Anhang) sowie das ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum (siehe Abbildung 11.21 im Anhang) waren in Einklang mit der angenommenen Struktur von *Extractable 6*.

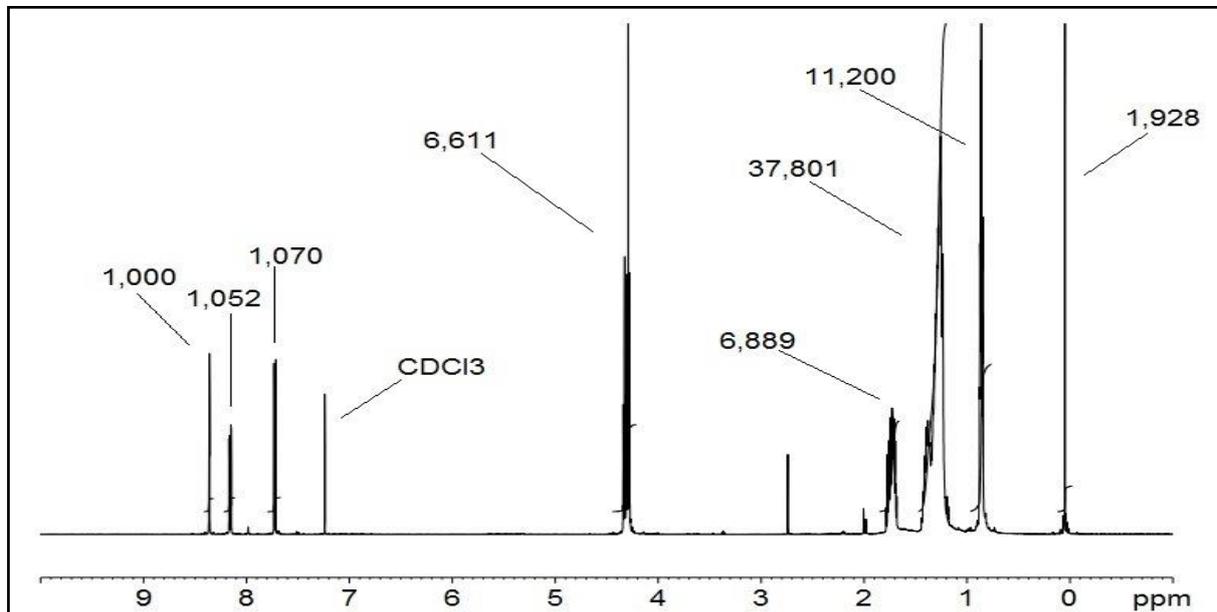


Abbildung 4.11: ^1H -NMR-Spektrum von *Extractable 6*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet. CDCl_3 = Deuteriochloroform

Die Kettenlänge der Ester-Reste ließ sich durch die aufgenommenen MS-Spektren herleiten. Von *Extractable 6-9* nahm das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal jeweils um 28 m/z zu, wobei dies bedeutete, dass die Molmasse des Moleküls von *Extractable 6-9* jeweils um eine C_2H_4 -Einheit zunahm. Das MS-Spektrum von *Extractable 6* wies neben dem $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal der Molmasse drei weitere Fragmente mit $[\text{M}-129]^+$: $417,4 \text{ m/z}$, $[\text{M}-241,2]^+$: $305,2 \text{ m/z}$ und $[\text{M}-353,2]^+$: $193,2 \text{ m/z}$ auf (siehe Abbildung 4.12). $417,4 \text{ m/z}$ resultierte bei der Abspaltung des Fragments $-\text{O}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$, nacheinander wurden auch die beiden anderen $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ Reste abgespalten, wodurch sich die Fragmente $305,2$ und $193,2 \text{ m/z}$ ergaben. Dasselbe Abspaltungsschema wurde auch für die *Extractables 7-9* beobachtet, sodass jedes MS-Spektrum (siehe Abbildung 11.17 bis Abbildung 11.19 im Anhang) das charakteristische Fragment $193,2 \text{ m/z}$ aufwies. Alle angewendeten Techniken und damit erzeugten Spektren (siehe hierzu auch Kapitel 11.11 im Anhang) bestätigten, dass es sich bei den vier *Extractables* um Substanzen derselben Substanzklasse handelte, die sich strukturell nur geringfügig voneinander unterschieden.

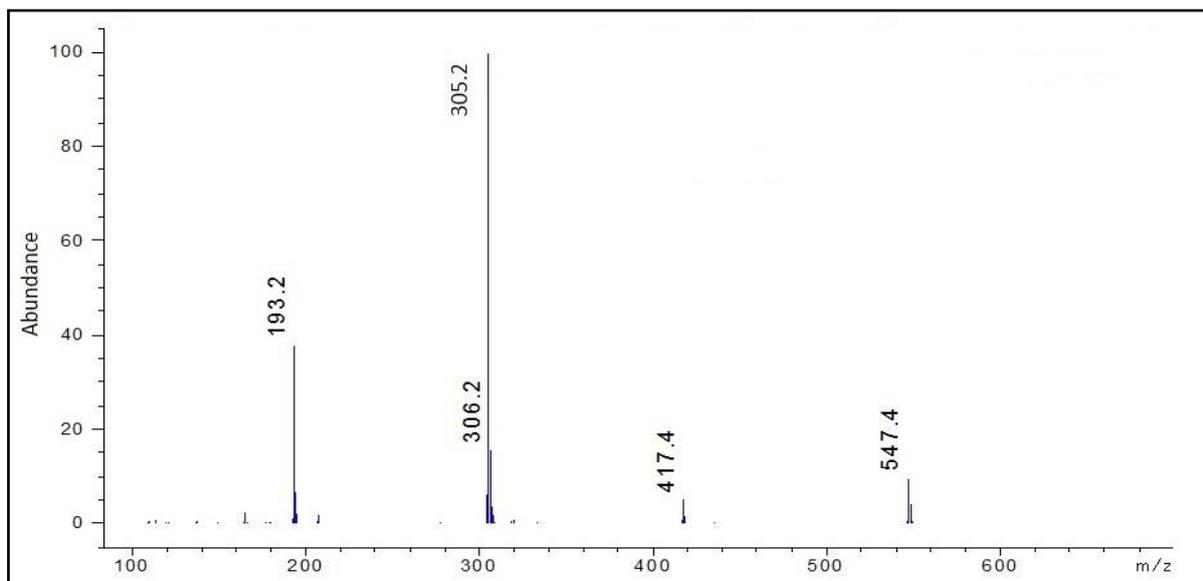


Abbildung 4.12: MS-Spektrum von *Extractable* 6. Das MS-Spektrum beinhaltet das $[M+H]^+$ -Signal 547,4 m/z sowie Fragmente mit 417,4 – 305,2 / 306,2 – 193,2 m/z.

Die gesammelten strukturellen Informationen ließen auf die Substanzklasse der Trimellitate schließen. Während jedoch die Strukturen der *Extractables* 6 und 9 eindeutig aufgeklärt wurden, konnte aufgrund der nur geringfügigen Unterschiede in den Verschiebungen in den NMR-Spektren nicht eindeutig aufgeklärt werden, an welcher Position der $-(CH_2)_9-CH_3$ -Rest bei *Extractable* 7 und der $-(CH_2)_7-CH_3$ -Rest bei *Extractable* 8 gebunden ist.

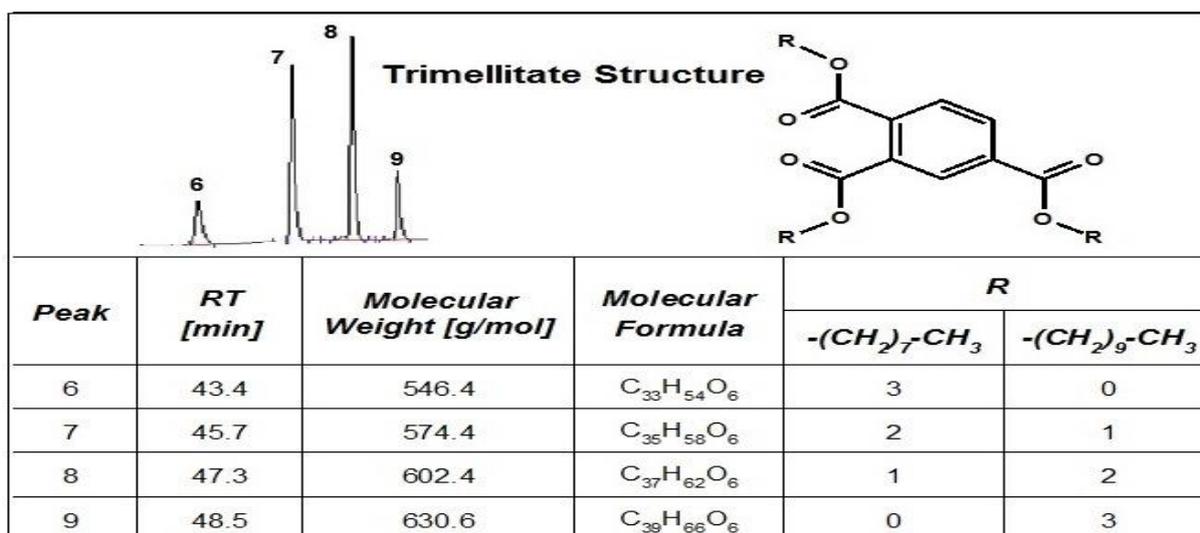


Abbildung 4.13: Angenommene Molekülstruktur der *Extractables* 6, 7, 8, 9. Basierend auf den Daten der MS- und NMR-Messungen. Für die *Extractables* 7 und 8 war es nicht möglich, die Substitutionsposition am Aromaten für die Reste $-(CH_2)_7-CH_3$ und $-(CH_2)_9-CH_3$ eindeutig zu bestimmen

4.5 Ergebnisse der Interaktionsstudien

In den Modellformulierungen 1 und 6 ohne jeglichen Zusatz von Polysorbat (PS) 20 oder 80 (siehe Kapitel 9.1.7.3) wurde auch nach sechs Monaten Lagerung keinerlei Migration der *Extractables* 1-9 aus dem Gummistopfen CB1 heraus beobachtet, während in den Modellformulierungen mit Zusatz von PS 20 oder PS 80 (Formulierungen 2, 3, 4, 5 und 7) eine Migration von diesen detektiert wurde (siehe Abbildung 4.14).

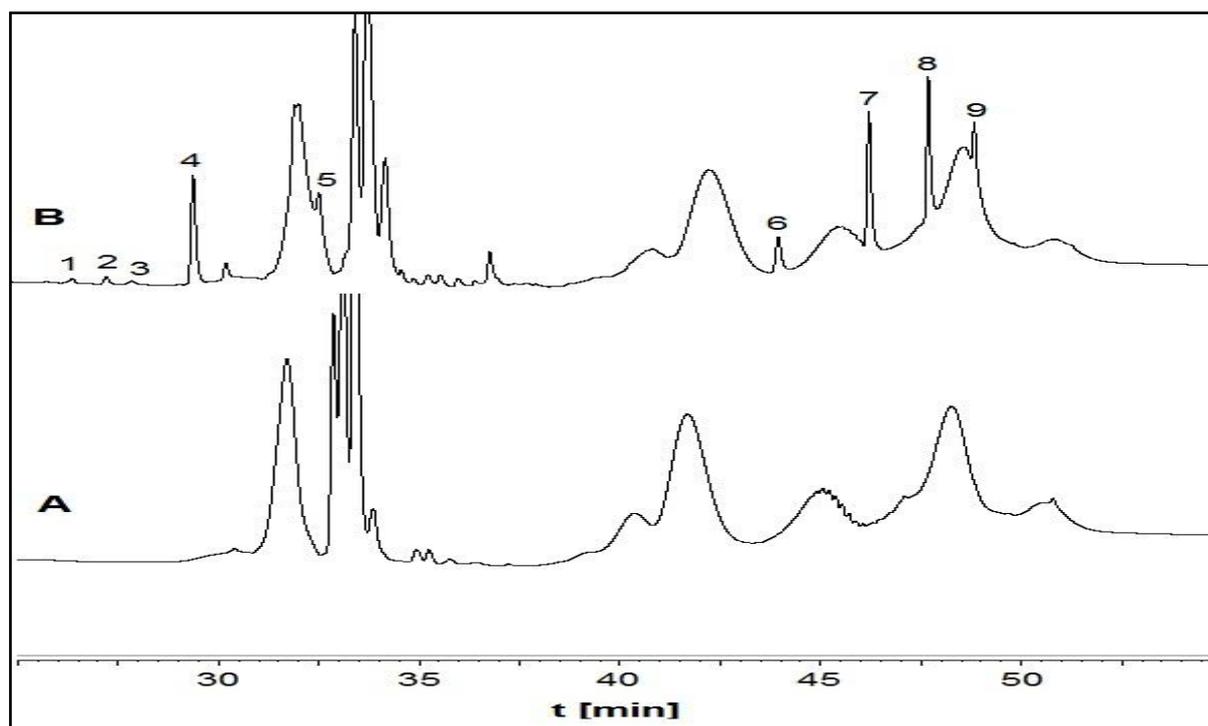


Abbildung 4.14: Migration der *Extractables* 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 3 nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C / 75 % r. F. Bei Modellformulierung 5 handelte es sich um 1,0 % PS 80 in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3. Im Chromatogramm des Blindwerts (Graph A) sind intensive Signale zu erkennen, die auf das PS 80 selbst zurückzuführen sind. Das Chromatogramm der Probe (Graph B) zeigt zusätzlich die Peaks der bekannten *Extractables* 1-9. Wellenlänge: 220 nm

Die gemessene Konzentration an *Extractables* variierte in Abhängigkeit von der eingesetzten Polysorbat-Konzentration (0,1 bzw. 1,0 %) und von dem verwendeten Polysorbat-Typ (PS 20 bzw. 80). Auch der pH-Wert der Modellformulierung (pH 6,3 bzw. 3,0) beeinflusste die Migration und damit die finale Konzentration an *Extractables*. Eine Zusammenfassung der nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C / 75 % r.F. resultierenden Ergebnisse ist in Tabelle 4.14 dargestellt (die numerischen Ergebnisse zu allen Prüfzeitpunkten befinden sich für alle Modellformulierungen im Anhang, siehe Tabelle 11.39 bis Tabelle 11.43). Nach sechs

Ergebnisse

Monaten Lagerung resultierte bei Einsatz von 0,1 % PS 20 eine Konzentration von 3,44 µg/ml, während unter analogen Bedingungen bei 1,0 % PS 20 eine Konzentration von 23,51 µg/ml resultierte. Analog dazu verhielt es sich bei der Verwendung von PS 80. Hierbei resultierte nach sechs Monaten Lagerung bei Verwendung von 0,1 % PS 80 eine Konzentration von 4,30 µg/ml, während die 10-fache Konzentration an PS 80 zu einer Erhöhung der Migration etwa um den Faktor 10 führte (44,38 µg/ml).

Tabelle 4.14: Konzentration der *Extractables* 1-9 in den verschiedenen Modellformulierungen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C / 75 % r. F. als mittlere Konzentration (n = 3) ± SD.

Modellformulierung		Summe <i>Extractables</i> 1-9 [µg/ml]
1	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3	Nicht detektiert
2	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 0,1 % PS 80	4,30 ± 0,59
3	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1,0 % PS 80	44,38 ± 4,50
4	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 0,1 % PS 20	3,44 ± 0,18
5	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1,0 % PS 20	23,51 ± 1,11
6	50 mM Citratpuffer pH 3,0	Nicht detektiert
7	50 mM Citratpuffer pH 3,0 mit 1,0 % PS 80	23,88 ± 2,72

Unter Verwendung derselben Konzentration führte PS 80 zu einer stärkeren Migration als PS 20, da dieses aufgrund seiner Struktur einen stärkeren Löslichkeitsvermittler darstellt. In Gegenwart von 1,0 % PS 80 wurde im Citratpuffer bei pH 3,0 eine niedrigere Migration festgestellt als im Phosphatpuffer mit pH 6,3. Bei Betrachtung der detektierten Konzentration der einzelnen *Extractables* (siehe Tabelle 11.39 bis Tabelle 11.43) wurde festgestellt, dass bei Einsatz von 1,0 % PS 80 bzw. 20 in den drei Modellformulierungen 3, 5, 7 eine ähnliche Konzentration der hydrophilen *Extractables* 1-5 resultierte. Die resultierende Konzentration der hydrophoben *Extractables* 6-9 wurde hingegen stärker durch die Variation des Polysorbat-Typs und des Puffers beeinflusst. So resultierte die höchste Konzentration der *Extractables* 6-9 in der Modellformulierung 3 während die Verwendung von 1,0 % PS 20 (Modellformulierung 5) genauso wie die Verwendung des Citratpuffers (Modellformulierung 7) zu einer reduzierten Migration der *Extractables* 6-9 führte. Hinsichtlich des

Ergebnisse

Migrationsverlaufs fiel auf, dass im Phosphatpuffer pH 6,3 in Gegenwart von 0,1 % PS 20 bereits nach einem Monat Lagerung die detektierte Konzentration an *Extractables* stagnierte und auch nach sechs Monaten Lagerung keine weitere Migration festgestellt werden konnte (siehe Graph B, Abbildung 4.15). Ein ähnlicher Migrationsverlauf zeigte sich im Phosphatpuffer pH 6,3 auch in Gegenwart von 0,1 % PS 80, wenn auch auf einem etwas höheren Konzentrationsniveau (siehe Graph A, Abbildung 4.15). In Gegenwart von 1,0 % PS 20 bzw. 80 wurde hingegen auch nach sechs Monaten Lagerung keine Stagnation der *Extractables*-Konzentration im Phosphatpuffer pH 6,3 beobachtet (siehe Abbildung 4.16).

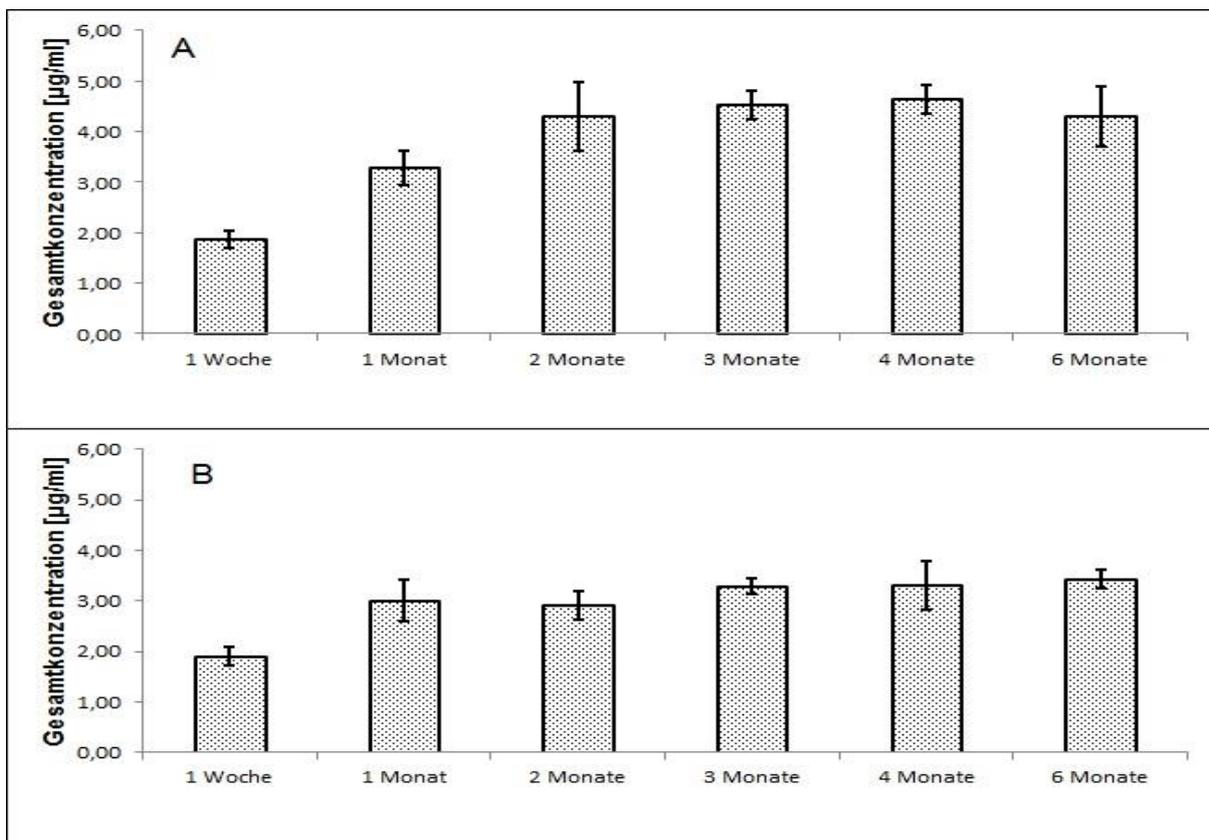


Abbildung 4.15: Migrationsverlauf in Gegenwart von 0,1 % PS 80 bzw. 20. Dargestellt ist die detektierte Gesamtkonzentration der *Extractables* 1-9 in Phosphatpuffer pH 6,3 in Gegenwart von 0,1 % PS 80 (Modellformulierung 2, Graph A) bzw. PS 20 (Modellformulierung 4, Graph B) als mittlere Konzentration ($n = 3$) \pm SD.

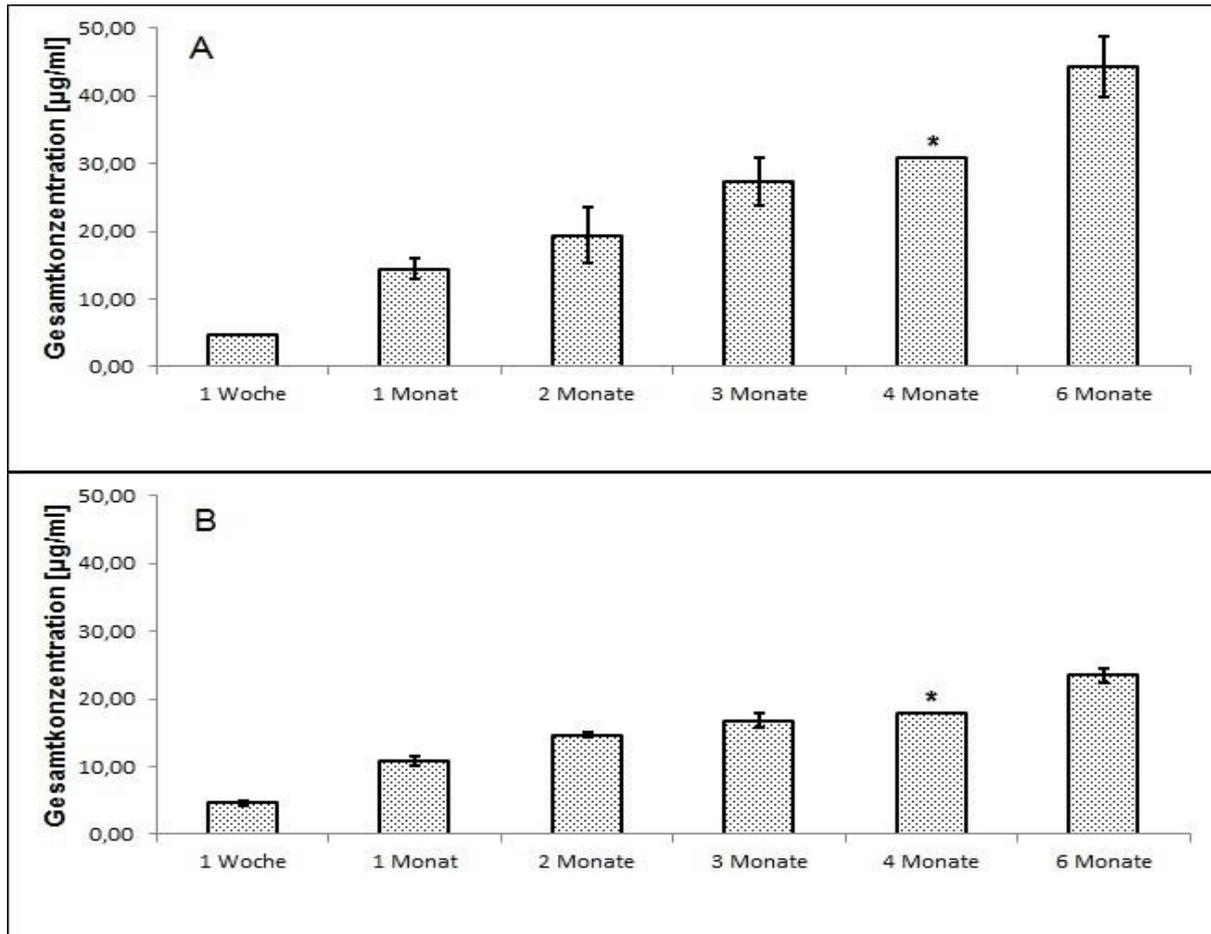


Abbildung 4.16: Migrationsverlauf in Gegenwart von 1,0 % PS 80 bzw. 20. Dargestellt ist die detektierte Gesamtkonzentration der *Extractables* 1-9 in Phosphatpuffer pH 6,3 in Gegenwart von 1,0 % PS 80 (Modellformulierung 3, Graph A) bzw. PS 20 (Modellformulierung 5, Graph B) als mittlere Konzentration ($n = 3$) \pm SD. * keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da $n < 3$

4.6 Qualität des hergestellten Gummistopfenextrakts

Ziel war es, einen Gummistopfenextrakt herzustellen, welcher einerseits die *Extractables* 1-9 mit verschiedenster Polarität aus dem Gummistopfen des Typs CB1 in gelöster Form enthalten würde und andererseits aufgrund der verwendeten Lösungsmittel nicht selbst das Aggregationsverhalten der eingesetzten Modellproteine zu stark beeinflussen und dadurch die Beobachtung eines möglichen Einflusses der *Extractables* verdecken würde. Die Herstellung des Gummistopfenextraktes erfolgte analog zu Kapitel 9.5. Dieser Gummistopfenextrakt wurde für die Proteinversuchsreihen in 0,1 % m/v PS 20 eingetroppt (nähere Informationen in den Kapiteln 9.1.7.9 und 9.1.7.10). Dieser resultierende

Ergebnisse

Gummistopfenextrakt in PS wurde vor jeder Versuchsreihe mittels HPLC-DAD (gemäß Kapitel 9.1.7.1) qualitativ hinsichtlich des Vorhandenseins der *Extractables* 1-9 analysiert.

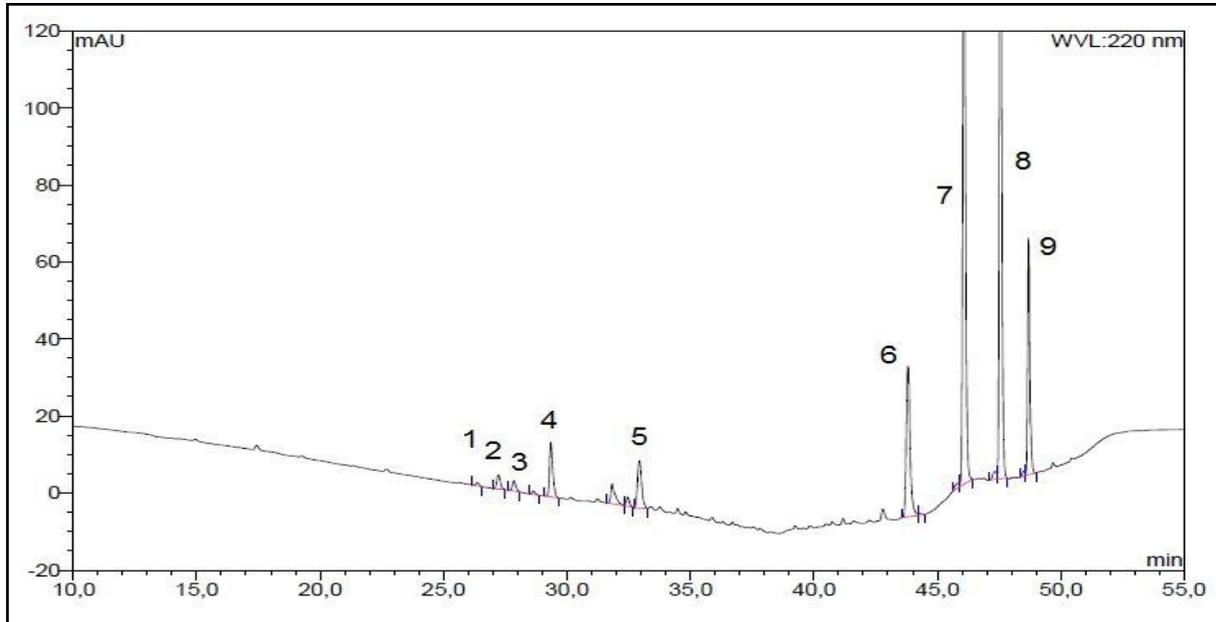


Abbildung 4.17: Chromatogramm des Gummistopfenextraktes des Typs CB1. Der Gummistopfenextrakt enthielt alle *Extractables* 1-9, Wellenlänge: 220 nm

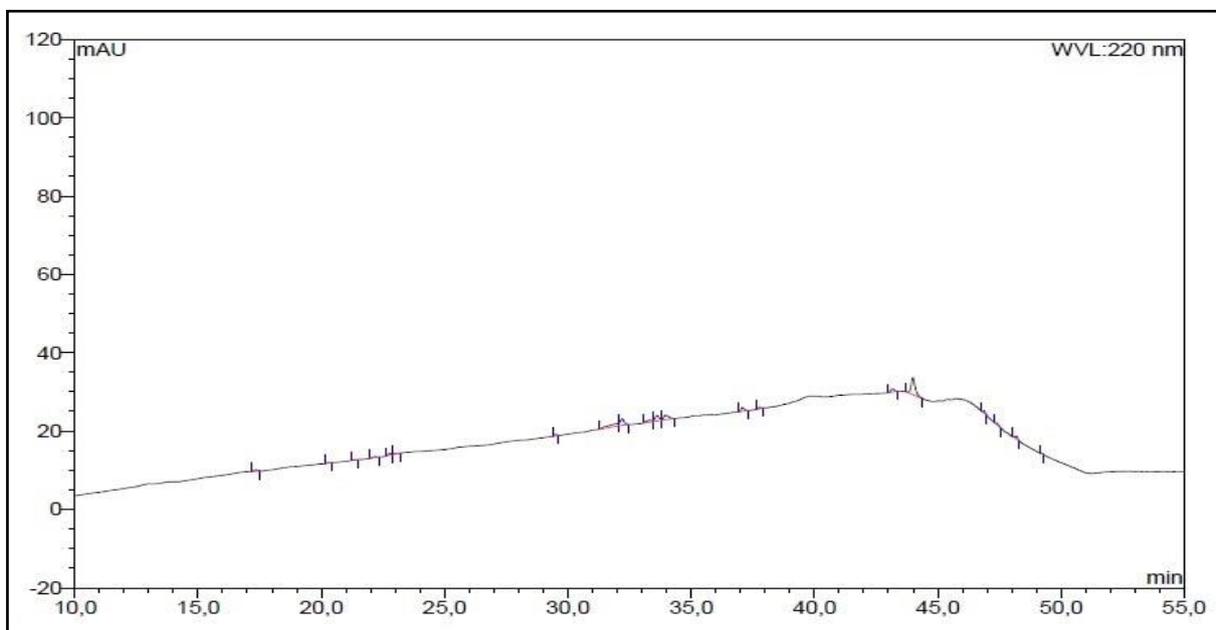


Abbildung 4.18: Chromatogramm des Gummistopfenextraktes des Typs BB6. In dem Gummistopfenextrakt wurde nur eine geringe Konzentration an *Extractables* festgestellt. Wellenlänge: 220 nm

Alle neun *Extractables* wurden im Gummistopfenextrakt detektiert (siehe Abbildung 4.17). Dabei ließ sich eine Abschätzung der tatsächlichen *Extractables*-Konzentration mit 61,3 µg/ml (berechnet als Trimellitat) vornehmen, was aufgrund des Versuchsaufbaus einer effektiven *Extractables*-Konzentration von 30,7 µg/ml bei den Studien mit Immunglobulin entsprach (siehe 9.1.7.9). Für diese Abschätzung waren die neun *Extractables* bei 254 nm ausgewertet worden. Die abgeschätzte Konzentration entsprach etwa der Konzentration an *Extractables*, welche während der Interaktionsstudien nach sechs Monaten in der Modellformulierung *Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1,0 % Polysorbat 80* detektiert worden waren (44,38 µg/ml).

Für den Gummistopfen des Typs BB6 wurde in analoger Weise ein Gummistopfenextrakt hergestellt. Aufgrund der geringen Anzahl und Konzentration an *Extractables* konnte für diesen jedoch keine Konzentration berechnet werden (siehe Abbildung 4.18).

4.7 Einfluss des Gummistopfenextrakts auf IgG

Die frisch hergestellten Probelösungen enthielten bereits vor Versuchsbeginn, d. h. zum Zeitpunkt T_{min} , geringe Konzentrationen an löslichen IgG-Aggregaten (siehe Abbildung 4.19), weshalb neben dem monomeren IgG mit der Retentionszeit (RT) 14,1 min zwei weitere Peaks mit wesentlich niedrigerer Intensität erkennbar waren. Das Signal bei etwa 12,2 min (relative Retentionszeit (RRT) 0,87) entsprach dem dimeren IgG, während das Signal bei etwa 10,9 min (RRT 0,78) einer höher aggregierten Spezies zugeordnet wurde. Zur Identifizierung von dieser wurde der Proteinmix zur SEC-Kalibrierung verwendet und eine molare Masse von etwa 638 kDa für das IgG-Aggregat ermittelt. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich um ein Agglomerat von vier IgG-Monomeren (150 kDa) handeln musste.

Die anschließend angewendeten Versuchsbedingungen waren bereits im Vorfeld ermittelt und dahingehend optimiert worden, zu der Bildung von löslichen IgG-Aggregaten zu führen und diesen Prozess mittels SEC-Analyse verfolgen zu können. So nahm mit fortschreitender Versuchsdauer die Konzentration des IgG-Aggregats in den Probelösungen, die keinen Gummistopfenextrakt enthielten, kontinuierlich zu, wie die SEC-Analyse zeigte (siehe Tabelle 4.15). Die gleichzeitig erfolgende photometrische Bestimmung der Trübung lieferte keinen Hinweis auf die Bildung unlöslicher IgG-Aggregate (siehe Tabelle 4.16), da diese zu einer Zunahme der Trübung geführt hätten.

In Gegenwart des Gummistopfenextrakts von CB1 veränderte sich der Aggregationsverlauf in der Probelösung jedoch. Zunächst erfolgte ein kurzer Konzentrationsanstieg des löslichen IgG-Aggregats, mit fortschreitender Versuchsdauer sank diese dann aber ab und verblieb auf niedrigem Niveau. Dadurch resultierte in der Probelösung mit Gummistopfenextrakt nach 130 min nur etwa $\frac{1}{4}$ der in demselben Zeitraum erzeugten Aggregat-Konzentration ohne Gummistopfenextrakt. Bei Betrachtung der Gesamtpeakfläche, bestehend aus Monomer-, Dimer-, und Aggregatfläche, fiel auf, dass diese im Laufe des Versuchs in Gegenwart des Gummistopfenextrakts merklich abgenommen hatte (1305 ± 8 FE vs. 997 ± 57 FE), obwohl keine Zunahme an löslichem Aggregat festgestellt worden war. Dies ließ auf die Bildung unlöslicher IgG-Aggregate schließen, welche mittels SEC-Analyse nicht gemessen werden konnten. Da die Trübungsmessung eine Zunahme der Trübung in Gegenwart des Gummistopfenextrakts ergab (siehe Abbildung 4.20), konnte diese Vermutung bestätigt werden.

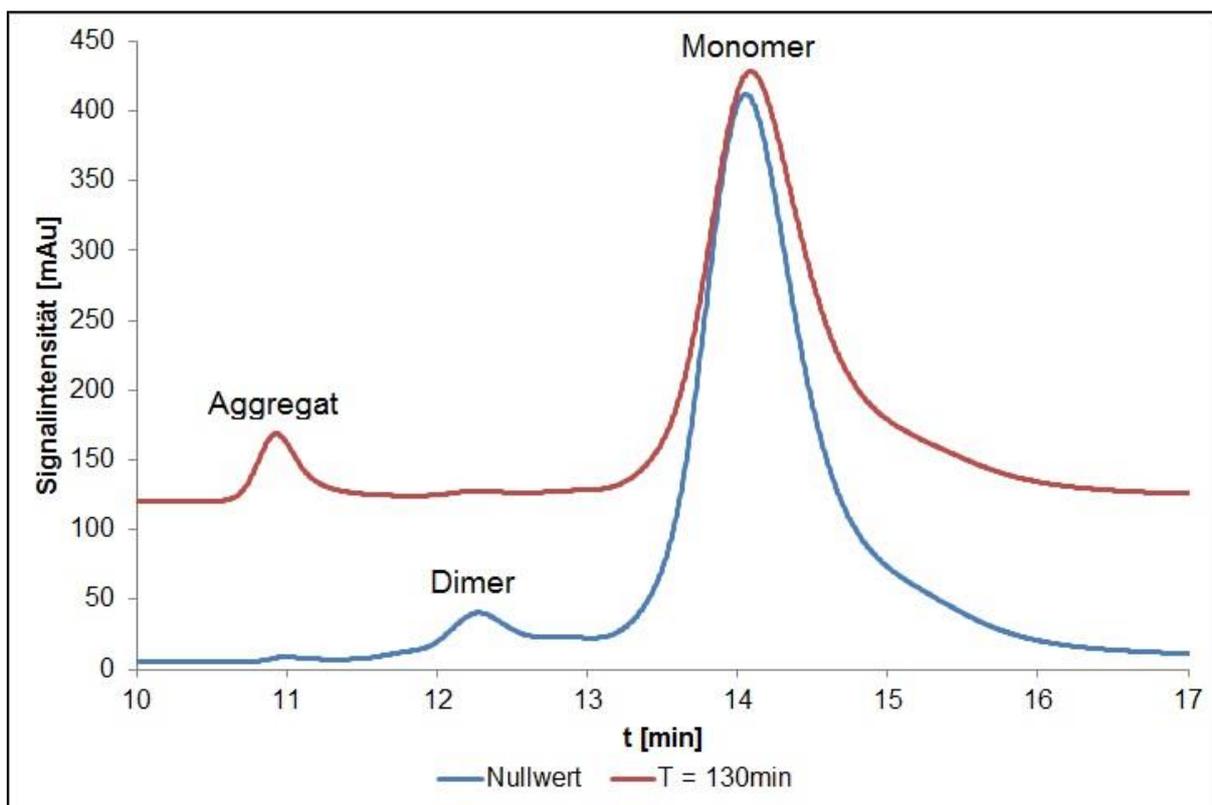


Abbildung 4.19: Chromatogramme der IgG-Probelösung. Zum Zeitpunkt T₀ wurden das IgG-Monomer und seine dimere Form detektiert. Nach 130 min zeigte das Chromatogramm neben dem IgG-Monomer ein IgG-Aggregat, die dimere Form wurde nicht mehr detektiert, Wellenlänge: 210 nm

Ergebnisse

Eine analoge Versuchsreihe wurde mit dem Gummistopfenextrakt von BB6 durchgeführt, da dieser Gummistopfen verglichen mit CB1 nur eine geringe Anzahl und Konzentration an *Extractables* aufwies (siehe hierzu die entsprechenden Extraktionsprofile in Abbildung 4.4). Die Versuchsreihe zeigte, dass dieser Gummistopfenextrakt die Aggregation von IgG nur in geringem Maße beeinflusste und daher eine ähnliche Peakfläche (140 ± 5 FE vs. 187 ± 15 FE) an löslichem IgG-Aggregat unabhängig von An- oder Abwesenheit des Gummistopfenextrakts mittels SEC-Analyse detektiert wurde (siehe Tabelle 4.17). Da auch die photometrische Messung keine Trübungszunahme zeigte (siehe Tabelle 4.18), ist anzunehmen, dass dieser Gummistopfenextrakt aufgrund der nur geringen Konzentration an *Extractables* die Bildung von löslichen und unlöslichen IgG-Aggregaten nicht beeinflusste.

Tabelle 4.15: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 unbehandelt. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD ($n = 3$), ¹ keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da $n = 1$

Ansatz 1: Probelösung mit Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	7 ¹	100 \pm 11	99 \pm 13	79 \pm 8	56 \pm 9	50 \pm 1	55 \pm 6
Monomer	1250 ¹	961 \pm 50	952 \pm 63	952 \pm 65	936 \pm 42	919 \pm 42	918 \pm 49
Ansatz 2: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	8 ¹	107 \pm 14	148 \pm 23	176 \pm 16	187 \pm 19	211 \pm 24	217 \pm 21
Monomer	1225 ¹	1026 \pm 40	1034 \pm 34	1047 \pm 25	1035 \pm 24	1048 \pm 17	1051 \pm 31

Tabelle 4.16: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 unbehandelt. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Extinktion in A ($n = 2$), ¹ Die Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 1 und Ansatz 3, ² Die Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 2 und Ansatz 4

Ansatz 1: Probelösung mit Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung¹	0,0168	0,1012	0,1919	0,2480	0,2979	0,3121	0,3137
Ansatz 2: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung²	0,0054	0,0062	0,0090	0,0089	0,0111	0,0084	0,0107

Für beide Gummistopfen führte die vorherige Entfettung, d. h. die Entfernung von anhaftendem Silikonöl, zu keinen signifikanten Unterschieden verglichen mit den

unbehandelten Gummistopfen (siehe Kapitel 11.7 im Anhang). So verlief die Bildung der löslichen IgG-Aggregate genauso wie die Abnahme der Konzentration an monomerem IgG nahezu analog. Auch die Ergebnisse der Trübungsmessung bestätigten, dass die Entfettung keinen Einfluss auf die IgG-Aggregation hatte.

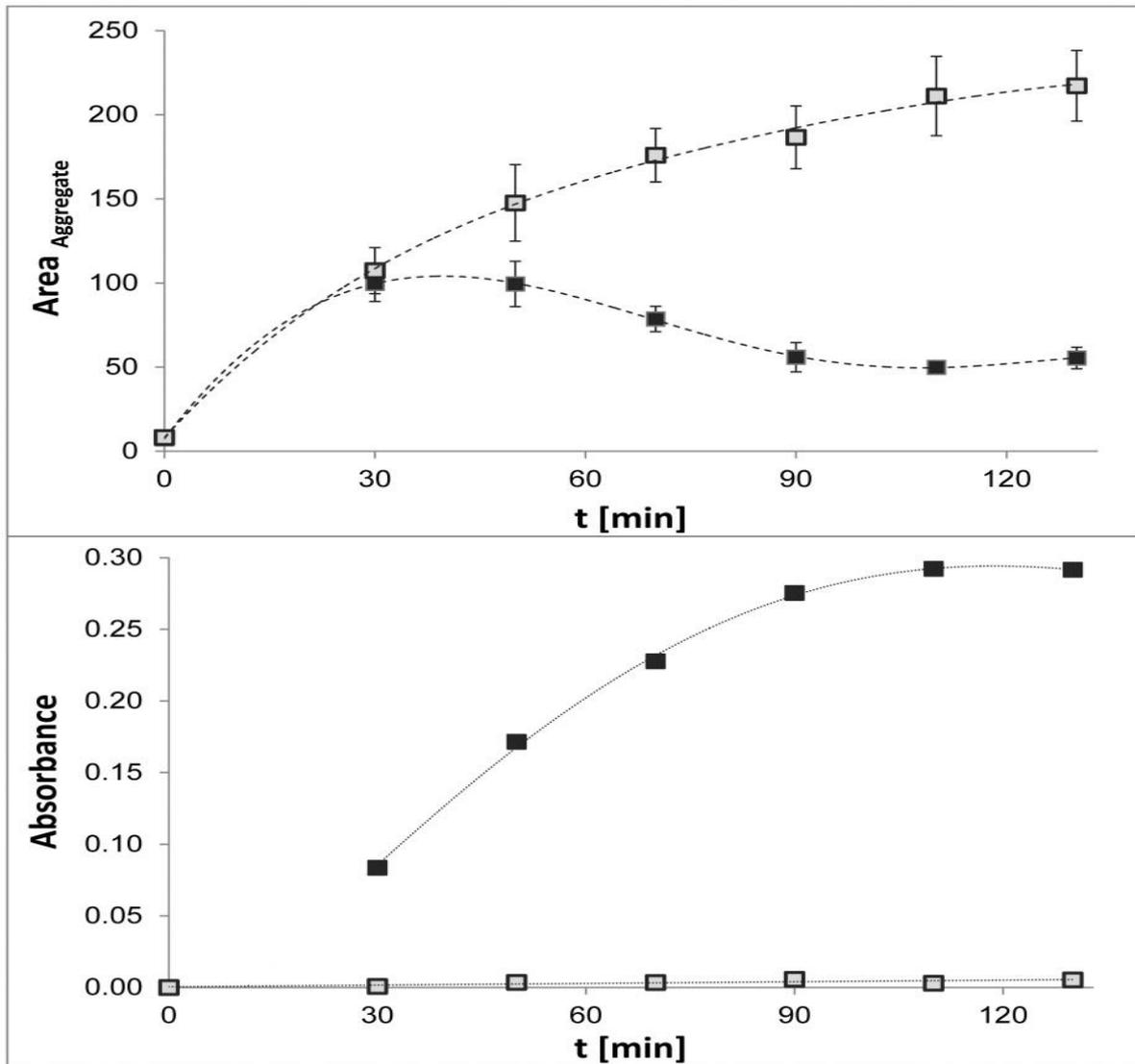


Abbildung 4.20: Messung der löslichen und unlöslichen IgG-Aggregate in Abhängigkeit von Gummistopfenextrakt CB1. Der obere Graph zeigt die Messung der löslichen Aggregate mittels SEC-Analyse bei 280 nm in Gegenwart (schwarze Quadrate) und in Abwesenheit (graue Quadrate) des Gummistopfenextrakts von CB1 mit Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Der untere Graph zeigt die Messung der unlöslichen IgG-Aggregate mittels Trübungsmessung photometrisch bei 350 nm in Gegenwart (schwarze Quadrate) und Abwesenheit (graue Quadrate mit Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ($n = 2$)).

Ergebnisse

In einer weiteren Versuchsreihe wurde dann auch mit dem von Gummistopfen CB1 entfernten Silikonöl eine weitere Versuchsreihe durchgeführt (siehe Kapitel 11.8 im Anhang). Nach 30 min resultierte zwar zunächst eine verglichen mit Ansatz 2 reduzierte Bildung der löslichen IgG-Aggregate, mit fortschreitender Versuchsdauer stieg die detektierte Aggregatfläche in Gegenwart von Silikonöl jedoch an, sodass nach 130 min annähernd dieselbe Konzentration wie bei Ansatz 2 resultierte. Auch die Abnahme der monomeren IgG-Spezies wurde durch das Silikonöl nicht signifikant beeinflusst. Da die gemessene Trübung in Gegenwart des Silikonöls verglichen mit Ansatz 2 ebenfalls keine Zunahme aufwies, kann eine erhöhte Bildung an unlöslichen IgG-Aggregaten ebenfalls ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.17: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 unbehandelt. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 3). ¹ n.d. = nicht detektiert, ² keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n = 1

Ansatz 1: Probeflösung mit Gummistopfenextrakt BB6							
	T _{0 min}	T _{30 min}	T _{50 min}	T _{70 min}	T _{90 min}	T _{110 min}	T _{130 min}
Aggregat	n.d. ¹	95 \pm 5	117 \pm 1	124 \pm 4	130 \pm 6	130 \pm 8	140 \pm 5
Monomer	1253 ²	995 \pm 82	1030 \pm 14	1023 \pm 7	1001 \pm 16	1003 \pm 25	1021 \pm 4
Ansatz 2: Probeflösung ohne Gummistopfenextrakt BB6							
	T _{0 min}	T _{30 min}	T _{50 min}	T _{70 min}	T _{90 min}	T _{110 min}	T _{130 min}
Aggregat	n.d. ¹	124 \pm 11	153 \pm 12	171 \pm 10	168 \pm 12	174 \pm 12	187 \pm 15
Monomer	1251 ²	1005 \pm 21	1018 \pm 20	1025 \pm 25	985 \pm 36	1009 \pm 35	1034 \pm 20

Tabelle 4.18: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 unbehandelt. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Extinktion in A (n = 2), ¹ Die Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 1 und Ansatz 3. ² Die Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 2 und Ansatz 4.

Ansatz 1: Probeflösung mit Gummistopfenextrakt BB6							
	T _{0 min}	T _{30 min}	T _{50 min}	T _{70 min}	T _{90 min}	T _{110 min}	T _{130 min}
Trübung¹	0,0009	0,0044	0,0091	0,0092	0,0111	0,0142	0,0143
Ansatz 2: Probeflösung ohne Gummistopfenextrakt BB6							
	T _{0 min}	T _{30 min}	T _{50 min}	T _{70 min}	T _{90 min}	T _{110 min}	T _{130 min}
Trübung²	0,0041	0,0090	0,0080	0,0086	0,0110	0,0126	0,0130

In einer letzten Versuchsreihe wurde schließlich auch die Aggregatbildung von IgG in Gegenwart von TOTM als Vertreter der Substanzklasse der Trimellitate untersucht. In Gegenwart von TOTM wurde verglichen mit Ansatz 2 allenfalls eine leichte Reduktion der

Bildung der löslichen IgG-Aggregate beobachtet, auch die detektierte Konzentration der monomeren IgG-Spezies wies keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen in Ansatz 2 auf (siehe Tabelle 4.19). Die Gegenwart von TOTM führte nur zu einer leichten Erhöhung der gemessenen Trübung (siehe Tabelle 4.20), weshalb lediglich von einer leichten Zunahme an unlöslichen IgG-Aggregaten ausgegangen wurde.

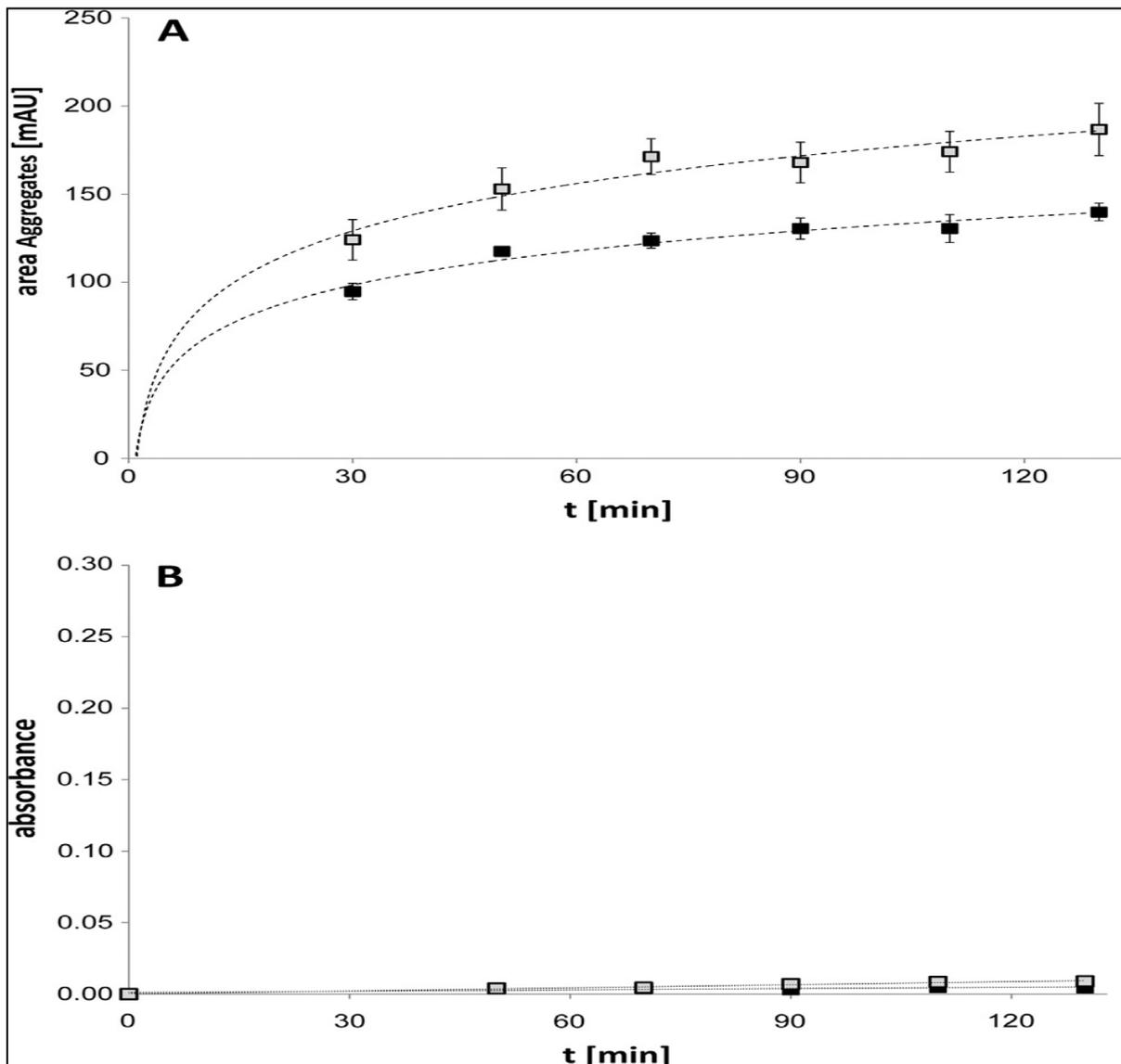


Abbildung 4.21: Messung der löslichen und unlöslichen IgG-Aggregate in Abhängigkeit von Gummistopfenextrakt BB6. Graph A zeigt die Messung der löslichen Aggregate mittels SEC-Analyse bei 280 nm in Gegenwart (schwarze Quadrate) und in Abwesenheit (graue Quadrate) des Gummistopfenextrakts von BB6 mit Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Graph B zeigt die Messung der unlöslichen IgG-Aggregate mittels Trübungsmessung photometrisch bei 350 nm in Gegenwart (schwarze Quadrate) und Abwesenheit (graue Quadrate) mit Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ($n = 2$).

Ergebnisse

Tabelle 4.19: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG mit TOTM. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 3). ¹ keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n = 1

Ansatz 1: Probelösung mit TOTM							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	6 ¹	107 \pm 7	144 \pm 11	157 \pm 3	179 \pm 7	187 \pm 6	196 \pm 9
Monomer	1216 ¹	1089 \pm 2	1076 \pm 9	1063 \pm 21	1065 \pm 27	1055 \pm 24	1056 \pm 21
Ansatz 2: Probelösung ohne TOTM							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	10 ¹	151 \pm 21	184 \pm 9	206 \pm 18	193 \pm 21	226 \pm 14	240 \pm 16
Monomer	1222 ¹	1041 \pm 33	1032 \pm 40	1021 \pm 31	1021 \pm 65	1007 \pm 44	1002 \pm 45

Tabelle 4.20: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG mit TOTM. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Extinktion in A (n = 2), die Trübung wurde nur für T_{0 min} und T_{130 min} zusammen mit Ansatz 3 gemessen. ¹ Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 1 und Ansatz 3, ² Trübung ist die gemessene Extinktion von Ansatz 2, zu dieser Messreihe wurde kein Ansatz 4 präpariert

Ansatz 1: Probelösung mit TOTM							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung¹	0,0023	-	-	-	-	-	0,0421
Ansatz 2: Probelösung ohne TOTM							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung²	0,0051	-	-	-	-	-	0,0138

Zusammenfassend führte nur der Gummistopfenextrakt des Typs CB1 zu einer erhöhten Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten, die mit einer Reduktion sowohl der löslichen IgG-Aggregate als auch der monomeren Spezies einherging. Anhand der erzeugten HPLC-DAD-Daten wurde gezeigt, dass dieser Gummistopfenextrakt eine relativ hohe Konzentration verschiedener polarer und unpolarer *Extractables* aufwies. Weil mit der angewandten Methode lediglich UV-aktive Substanzen erfasst wurden, ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Konzentration an *Extractables* im Gummistopfenextrakt noch höher lag als die mit Hilfe der *Extractables* 1-9 berechnete Konzentration.

Ergebnisse

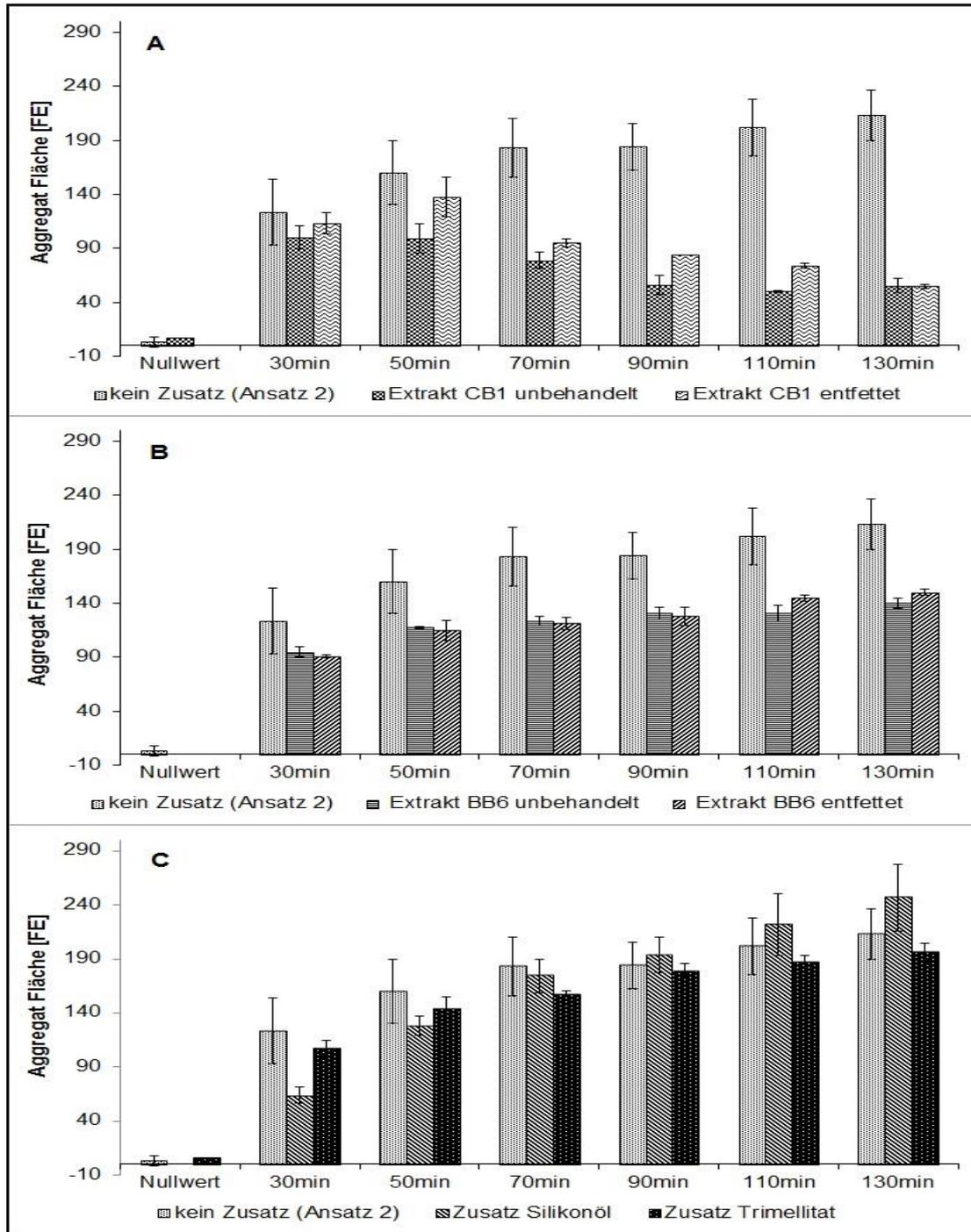


Abbildung 4.22: Entwicklung des IgG-Aggregats in Gegenwart der Gummistopfenextrakte (unbehandelt und entfettet) sowie Silikonöl und Trimellitat. Diagramm A zeigt die Aggregat-Entwicklung in Gegenwart des CB1-Extrakts aus dem unbehandelten Gummistopfen sowie aus den vorher entfetteten Gummistopfen. Diagramm B stellt in analoger Weise die Aggregat-Entwicklung in Gegenwart des BB6-Extrakts dar, in Diagramm C ist die Aggregat-Entwicklung in Gegenwart von Silikonöl sowie Trimellitat dargestellt. Ansatz 2 entspricht IgG in ACN-PS20-Lösung ohne Zugabe von Extrakt.

Ergebnisse

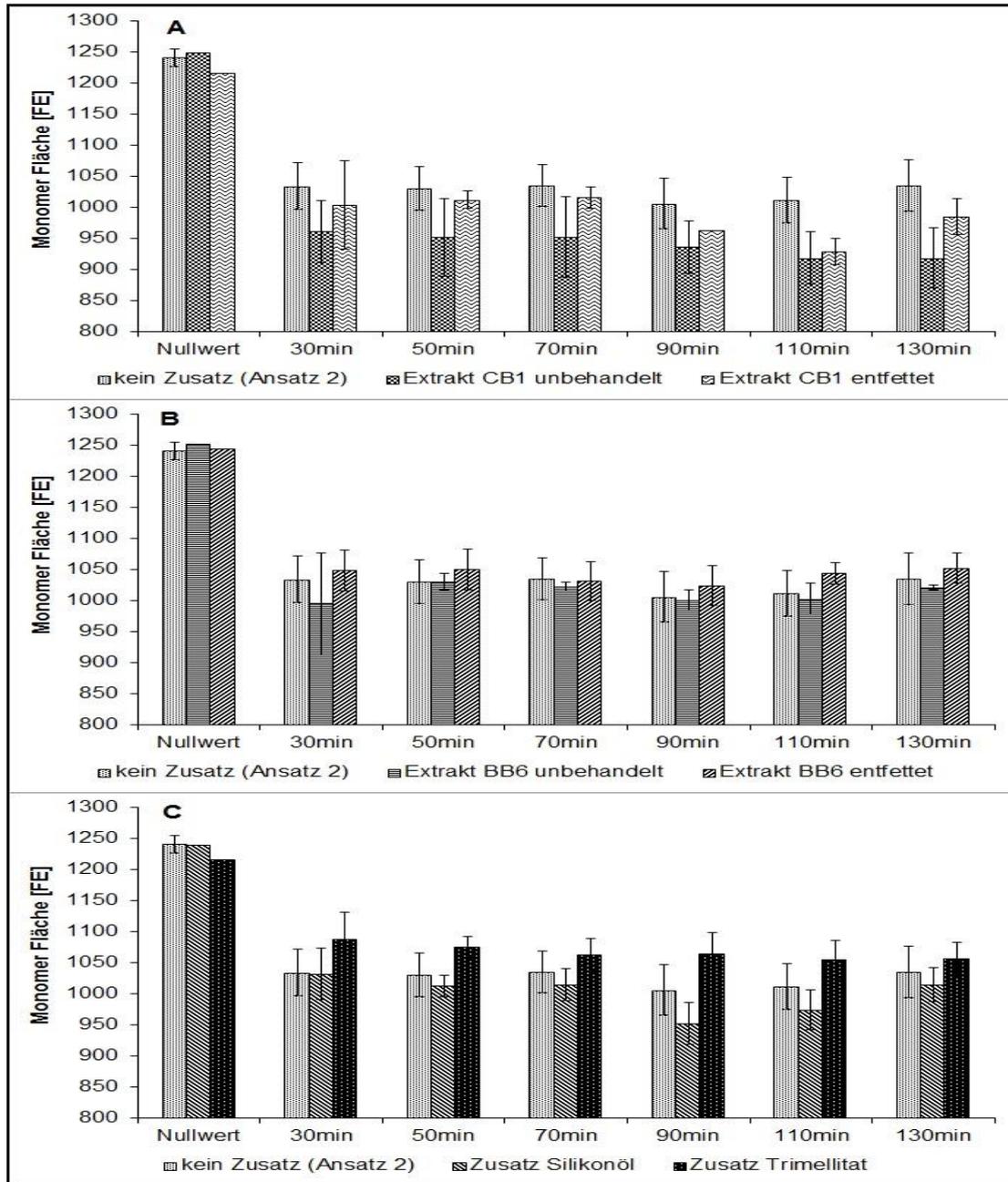


Abbildung 4.23: Entwicklung des IgG-Monomers in Gegenwart der Gummistopfenextrakte (unbehandelt und entfettet) sowie Silikonöl und Trimellitat. Diagramm A zeigt die Monomer-Entwicklung in Gegenwart des CB1-Extrakts aus dem unbehandelten Gummistopfen sowie aus dem vorher entfetteten Gummistopfen. Diagramm B stellt in analoger Weise die Monomer-Entwicklung in Gegenwart des BB6-Extrakts dar, in Diagramm C ist die Monomer-Entwicklung in Gegenwart von Silikonöl sowie Trimellitat dargestellt. Ansatz 2 entspricht IgG in ACN-PS20-Lösung ohne Zugabe von Extrakt.

Ergebnisse

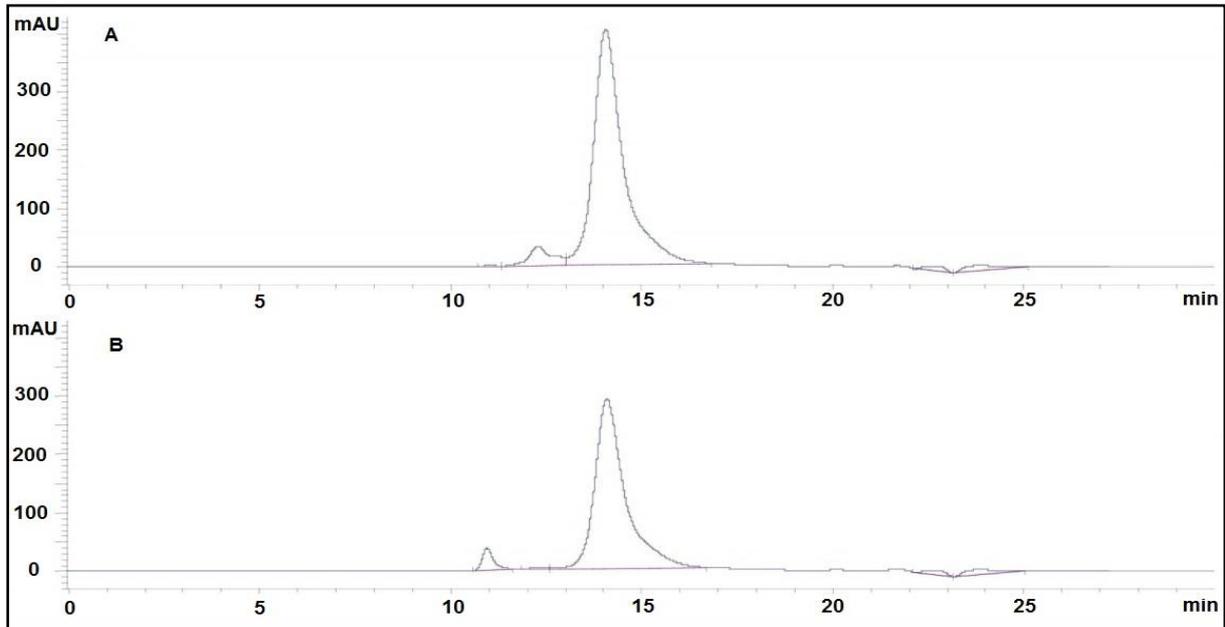


Abbildung 4.24: SEC-Chromatogramm von IgG in Gegenwart des Gummistopfenextrakts CB1 (unbehandelt). Graph A: IgG in Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung (Ansatz 1) zu Beginn der Lagerung (Nullwert), Graph B: IgG in Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung (Ansatz 1) nach 130 min Lagerung bei 60-64 °C, Wellenlänge: 210 nm

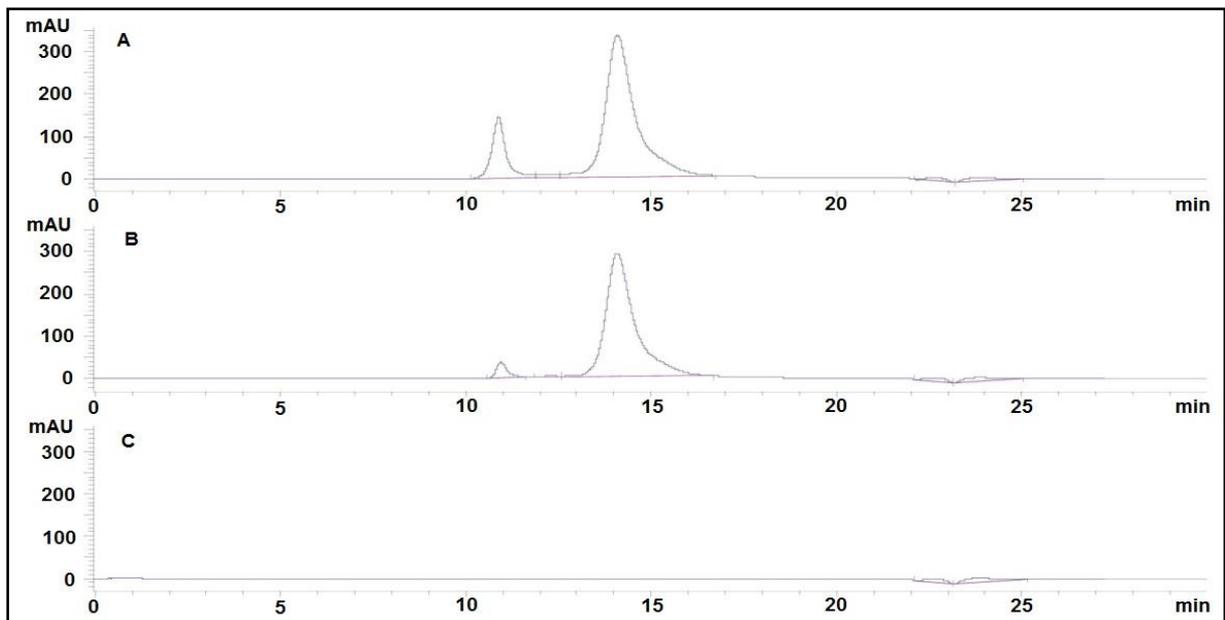


Abbildung 4.25: SEC-Chromatogramme von IgG in Anwesenheit und Abwesenheit des Gummistopfenextrakts CB1 (unbehandelt). Graph A: IgG in ACN-PS20-Lösung ohne Gummistopfenextrakt CB1 (Ansatz 2), Graph B: IgG in ACN-PS20-Lösung mit Gummistopfenextrakt CB1 (Ansatz 1), Graph C: ACN-PS20-Lösung ohne Zusatz von IgG und Gummistopfenextrakt. Alle Chromatogramme wurden nach 130 min Lagerung bei 60-64 °C aufgenommen. Wellenlänge: 210 nm

4.8 Einfluss des Gummistopfenextrakts auf EPO

Die frisch hergestellten Probelösungen enthielten bei der Versuchsreihe mit 0,1 % m/v PS 20 zum Zeitpunkt T0, d. h. vor Anwendung der Stressbedingungen (siehe Kapitel 9.1.7.10), das Modellprotein ausschließlich in seiner monomeren Form, sodass weder eine dimere noch eine höher aggregierte EPO-Spezies detektiert werden konnten (siehe Abbildung 4.26, Graph A). Nach vier Tagen hatten sich in allen Versuchsansätzen sowohl das EPO-Dimer als auch eine höher aggregierte Form gebildet, deren Flächen zusammengefasst und als HMWPs (*High Molecular Weight Proteins*, siehe Abbildung 4.26, Graph B) bezeichnet wurden.

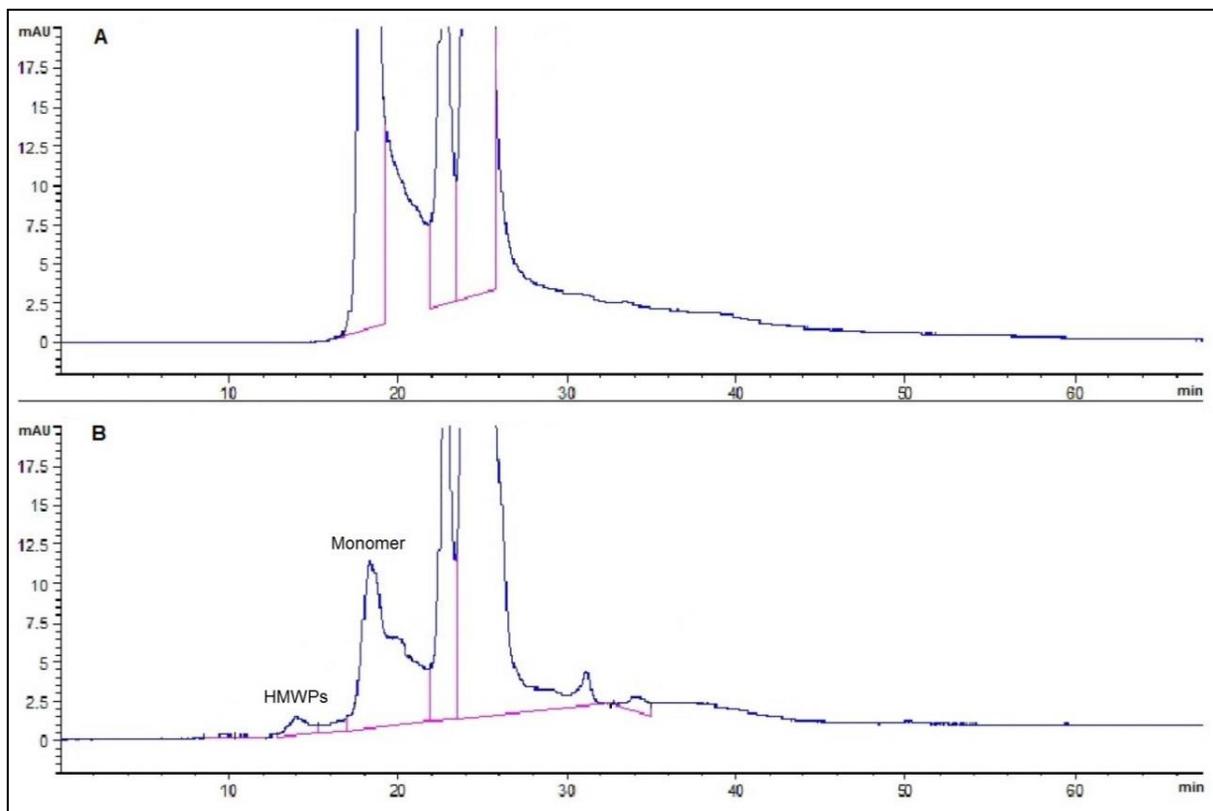


Abbildung 4.26: SEC-Chromatogramme von EPO in Gegenwart von Gummistopfenextrakt CB1 (Versuchsreihe 1). Graph A: EPO in ACN-PS20-Lösung mit Gummistopfenextrakt CB1 zu Beginn der Lagerung (Nullwert), Graph B: EPO in ACN-PS20-Lösung mit Gummistopfenextrakt CB1 nach 8 Tagen Lagerung bei 55 °C, Wellenlänge: 214 nm, HMWPs = *High Molecular Weight Proteins*

Gleichzeitig hatte die Fläche von monomerem EPO in allen Versuchsansätzen abgenommen. In Gegenwart des Gummistopfenextrakts wurde eine höhere Konzentration an HMWPs detektiert als in dem vergleichbaren Versuchsansatz, der keinen

Ergebnisse

Gummistopfenextrakt enthielt (161 ± 69 FE vs. 35 ± 23 FE). Auch die Abnahme des monomeren EPO fiel in Gegenwart des Gummistopfenextrakts stärker aus (1804 ± 633 FE vs. 3891 ± 337 FE). Nach acht Tagen Lagerung war die Konzentration an HMWPs in Gegenwart des Gummistopfenextrakts weiter angestiegen (260 ± 33 FE), während in dem Versuchsansatz ohne Gummistopfenextrakt die Konzentration an HMWPs verglichen mit den Ergebnissen nach vier Tagen Lagerung stagnierte (49 ± 26 FE). Die Konzentration an monomerem EPO blieb in beiden Versuchsansätzen unverändert auf demselben Konzentrationsniveau (siehe zu den einzelnen Ergebnissen auch Tabelle 4.21 und Abbildung 11.14 im Anhang).

Tabelle 4.21: SEC-Ergebnisse von EPO-Gummistopfenextrakt CB1 in 0,1 % m/v Polysorbat 20. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 4). ¹ n.d. = nicht detektiert, HMWPs = *High Molecular Weight Proteins*

Ansatz 1: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt			
	T₀ Tage	T₄ Tage	T₈ Tage
HMWPs	n.d. ¹	35 ± 23	49 ± 26
Monomer	9082 ± 2605	3891 ± 337	3257 ± 703
Ansatz 2: Probelösung mit Gummistopfenextrakt			
	T₀ Tage	T₄ Tage	T₈ Tage
HMWPs	n.d. ¹	161 ± 69	260 ± 33
Monomer	9316 ± 2965	1804 ± 633	1743 ± 136

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Konzentration der verwendeten PS 20-Lösung untersucht. Dementsprechend wurde statt einer 0,1 % m/v PS 20-Lösung mit eine Lösung mit der 10-fachen Konzentration, d. h. 1,0 % m/v eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27, Graph B dargestellt sowie in Tabelle 4.22. In Gegenwart der 1,0 % m/v PS 20-Lösung verlief die Bildung der HMWPs in beiden Versuchsansätzen analog und führte auch nach acht Tagen Lagerung in Gegenwart des Gummistopfenextrakts zu keiner erhöhten Konzentration verglichen mit dem Versuchsansatz ohne Gummistopfenextrakt. Die Konzentration an monomerem EPO nahm jedoch auch in diesem Versuchsansatz in Gegenwart des Gummistopfenextrakts stärker ab als in der analogen Probelösung ohne Gummistopfenextrakt (7095 ± 5668 FE vs. 8164 ± 5023 FE).

Ergebnisse

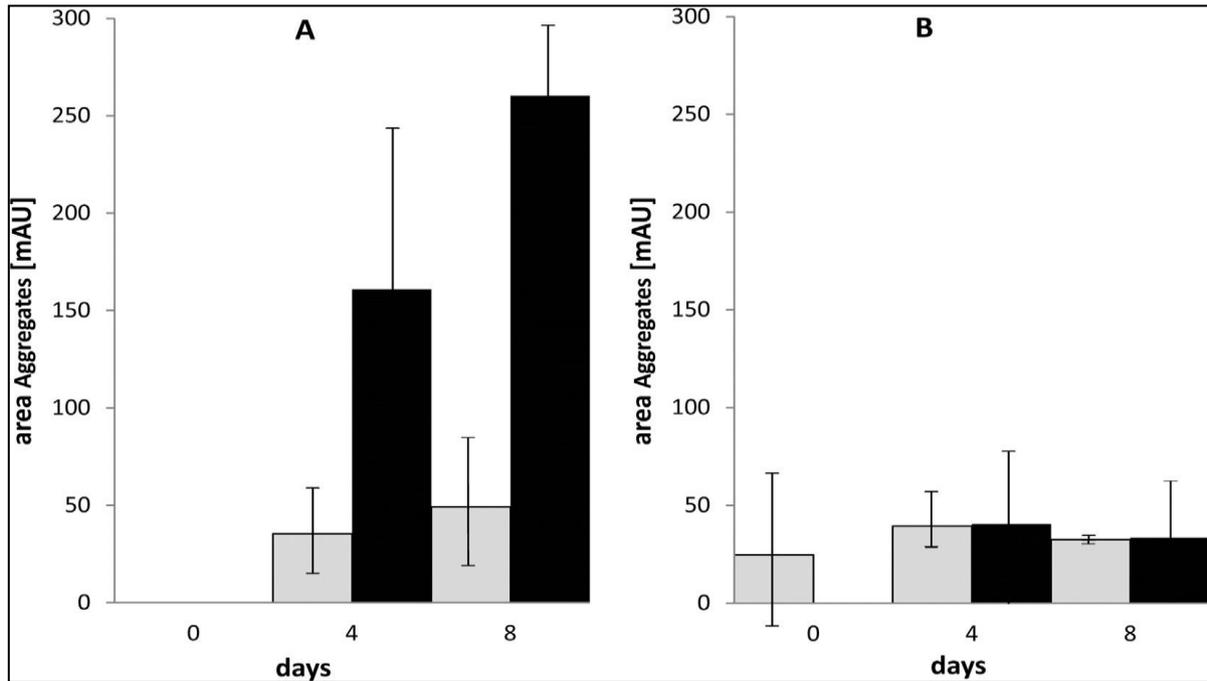


Abbildung 4.27: Aggregatbildung von EPO in Gegenwart des Gummistopfenextraktes CB1 (schwarze Balken) oder ohne Gummistopfenextrakt (graue Balken) als Mittelwert \pm SD (n = 4). Diagramm A zeigt die Aggregatbildung in 0,1 % m/v PS 20-Lösung, während Diagramm B die Aggregatbildung in 1,0 % m/v PS 20-Lösung bei 55 °C für acht Tage zeigt. Wellenlänge: 214 nm

Tabelle 4.22: SEC-Ergebnisse von EPO-Gummistopfenextrakt CB1 in 1,0 % m/v PS 20. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 4). ¹ n.d. = nicht detektiert, ² Es wurden zwar Peaks mit den entsprechenden Retentionszeiten detektiert, es ist jedoch nicht plausibel, dass es sich tatsächlich um HMWPs handelte. HMWPs = *High Molecular Weight Proteins*

Ansatz 1: Probeflösung ohne Gummistopfenextrakt			
	T₀ Tage	T₄ Tage	T₈ Tage
HMWPs	25 \pm 32 ²	39 \pm 12	33 \pm 5
Monomer	14096 \pm 8231	9669 \pm 8092	8164 \pm 5023
Ansatz 2: Probeflösung mit Gummistopfenextrakt			
	T₀ Tage	T₄ Tage	T₈ Tage
HMWPs	n.d. ¹	41 \pm 36	34 \pm 25
Monomer	12877 \pm 5347	7913 \pm 4860	7095 \pm 5668
Ansatz 3: EPO in Puffer			
	T₀ Tage	T₄ Tage	T₈ Tage
HMWPs	n. d. ¹	76 \pm 46	178 \pm 130
Monomer	7851 \pm 2156	4280 \pm 224	3917 \pm 634

5 Diskussion

Alle im Rahmen dieser Arbeit geprüften Gummistopfen, d. h. die Bromobutylstopfen BB1-BB6 und die Chlorobutylstopfen CB1-CB3, entsprachen zwar dem in Ph. Eur. 3.2.9 und USP <381> definierten Qualitätsstandard für Gummistopfen Typ 1, gleichzeitig hielten jedoch die Gummistopfen BB3, BB4, CB1 und CB2 nicht die Anforderungen gemäß JP 7.03 ein.

Grund hierfür war vermutlich die unterschiedliche Herstellung der Prüflösung sowie die vorherige Reinigung der Gummistopfen (siehe hierzu auch Kapitel 2.1). Bei der oberflächenabhängigen Einwaage der Gummistopfen gemäß Ph. Eur./USP resultierte ein niedrigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis als bei der gewichtsabhängigen Einwaage gemäß JP. Für denselben Gummistopfen ergab sich demnach ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von $0,50 \text{ cm}^2/\text{ml}$ gemäß Ph. Eur./USP und $0,57 \text{ cm}^2/\text{ml}$ gemäß JP, wodurch in der gemäß JP hergestellten Prüflösung wahrscheinlich eine höhere Konzentration an extrahierbaren Substanzen vorhanden war. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit steigendem Oberflächen-Volumen-Verhältnis die Konzentration an *Extractables* zunimmt, sofern es sich um Substanzen handelt, die gut löslich im Extraktionsmittel sind. Grund hierfür ist, dass sowohl der Verteilungskoeffizient als auch die Oberfläche in die Berechnung eingehen (siehe Kapitel 2.2, Abbildung 2.5). Die eingesetzte Temperatur beeinflusst die Extraktionsrate ebenfalls, da der Stofftransport gemäß dem 2. Fick'schen Gesetz (siehe Kapitel 2.2, Abbildung 2.3) stattfindet, in welches der Diffusionskoeffizient D einfließt. Da dieser proportional zur Temperatur T ist, nimmt mit steigender Temperatur die Diffusion zu. Indirekt beeinflusst die Temperatur aber auch die Viskosität des Extraktionsmediums und damit auch den Verteilungskoeffizienten zwischen Gummistopfen und Extraktionsmedium. Zusätzlich kann ein möglicher Einfluss des vorhergehenden Reinigungsschritts der Gummistopfen auf die später vorliegende Prüflösung nicht ausgeschlossen werden, da sich dieser ebenfalls bei Ph. Eur./USP und JP unterschied. Gemäß Ph. Eur./USP wurden die Gummistopfen vor Herstellung der eigentlichen Prüflösung durch 5-minütiges Kochen in Wasser gereinigt, während die Reinigung gemäß JP lediglich durch Spülen mit kaltem Wasser erfolgte. In beiden Fällen wurde das resultierende Spülwasser entfernt und mit den gereinigten Gummistopfen weitergearbeitet. Möglicherweise hatte jedoch das 5-minütige Kochen der Gummistopfen bereits zu einer Extraktion von Substanzen geführt und damit deren spätere Konzentration in der finalen Prüflösung reduziert.

Mit der Veröffentlichung des JP 17 (Publikationsdatum: 01.04.2016) wurde die Probenpräparation jedoch weitestgehend mit Ph. Eur./USP harmonisiert und erfolgt seitdem ebenfalls oberflächenabhängig. Ein Vorteil dieser Harmonisierung ist, dass nun die Prüfergebnisse gemäß Ph. Eur./USP und JP besser miteinander verglichen werden können. Ein weiterer Vorteil der Harmonisierung ist, dass unterschiedliche Ausführungen derselben Gummistopfenformulierung nun auch zu vergleichbaren Prüfergebnissen gemäß JP führen, da die unterschiedliche Oberfläche kleinerer und größerer Gummistopfen berücksichtigt wird. Der vorhergehende Reinigungsschritt wurde bei der Revision jedoch nicht berücksichtigt, sodass dieser Unterschied weiterhin besteht.

Obwohl alle geprüften Gummistopfen dem gemäß Ph. Eur. 3.2.9 und USP <381> definierten Qualitätsstandard entsprachen, wiesen die mittels HPLC-DAD aufgenommenen Extraktionsprofile dieser Gummistopfen teilweise große Unterschiede bezüglich der detektierten *Extractables* auf. So resultierte für den Chlorobutylstopfen CB1 das Extraktionsprofil mit der höchsten Anzahl an *Extractables*, während der Bromobutylstopfen BB6 die niedrigste Anzahl an *Extractables* zeigte. Durch den Vergleich der Extraktionsprofile der verschiedenen Gummistopfen konnten jedoch auch Ähnlichkeiten festgestellt werden: Für die Chlorobutylstopfen CB2 und CB3 resultierten Extraktionsprofile mit einem nahezu identischen Peakmuster und einer sehr ähnlichen Peakintensität. Da für diese Gummistopfen keine Zertifikate bezüglich der Kompatibilität mit Ph. Eur., USP und JP vorgelegt werden konnten, waren auch die entsprechenden Prüfungen selbst durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Prüfungen (siehe Tabelle 4.8 bis Tabelle 4.13) lagen bei beiden Gummistopfen ebenfalls in derselben Größenordnung. Es ist daher denkbar, dass es sich bei den Gummistopfen CB2 und CB3 um eigentlich identische Gummistopfen handelte, auch wenn diese von unterschiedlichen Lieferanten bezogen worden waren. Da von den Lieferanten jedoch keinerlei Angaben zu den jeweiligen Herstellern gemacht wurden, konnte diese These nicht final bestätigt werden.

Die Extraktionsprofile der Chlorobutylstopfen CB1, CB2 und CB3 zeigten zudem übereinstimmend ein Signal bei etwa 32,6 min. Für den Gummistopfen CB1 wurde dieses Signal als *Extractable* 5 benannt und bei den anschließenden Analysen in die quantitative Auswertung miteinbezogen. Da dieses *Extractable* jedoch nicht Teil der späteren strukturellen Identifikationsarbeiten war, konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich letztendlich bei allen drei Chlorobutylstopfen um das gleiche *Extractable* handelte.

Aus dem Gummistopfen CB1 konnte mit IPA als Extraktionsmittel die höchste Anzahl an *Extractables* in der höchsten Konzentration extrahiert werden. Ein direkter Vergleich von IPA mit Wasser zeigte bei dem Gummistopfen CB1, dass Wasser als alleiniges Extraktionsmittel unzureichend ist, da eine Extraktion mit Wasser zu keinen detektierten *Extractables* führte. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Empfehlungen der PQRI Arbeitsgruppe [63], die den Einsatz mehrerer Extraktionsmittel verschiedener Polaritäten und pH-Werte zur Durchführung kontrollierter Extraktionsstudien empfiehlt. Die Ergebnisse der verschiedenen Extraktionsprofile zeigten, dass aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Gummistopfen *Extractables* verschiedenster Polaritäten aus diesen herausmigrieren können. Die Präsenz von *Extractables* verschiedenster Polarität ist nicht verwunderlich, da zur Herstellung der Gummistopfen mittels Vulkanisation eine Vielzahl an unterschiedlichsten Chemikalien eingesetzt werden muss, um die geforderten Materialeigenschaften zu erhalten (siehe Kapitel 2.1).

Möchte man ein qualitativ nahezu vollständiges Extraktionsprofil von einem Gummistopfen erhalten, ist Wasser als Extraktionsmittel ungeeignet, da insbesondere eher unpolare organische *Extractables* eine weitaus bessere Löslichkeit in IPA aufweisen als in wässrigen Extraktionsmitteln. Dies wurde auch durch die unpolaren *Extractables* 6-9 bestätigt, die genauso wie TOTM zu der Stoffgruppe der Trimellitate gehören. Der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log K_{ow}$) beträgt für TOTM 5,94 [64], die *Extractables* 6-9 weisen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit vermutlich einen ähnlichen $\log K_{ow}$ auf. Folglich konnten diese *Extractables* selbst bei hoher Temperatur nicht mit Wasser allein extrahiert werden.

Bei der Bewertung der Extraktionsprofile hinsichtlich Vollständigkeit ist neben der Wahl der Extraktionsbedingungen auch die gewählte Analysentechnik entscheidend. Im Rahmen der vorliegenden Promotion wurden die Extraktionsprofile mittels HPLC-DAD-Technik aufgenommen, mit welcher jedoch lediglich UV-aktive Substanzen mit verhältnismäßig hohem Siedepunkt detektiert werden können, während leichtflüchtige organische Substanzen und anorganische Salze nicht zugänglich sind. Es wird daher angenommen, dass die tatsächliche Anzahl an *Extractables* der untersuchten Gummistopfen höher war als die in den Extraktionsprofilen sichtbare Anzahl.

Die Vielfalt der Extraktionsprofile zeigte, dass die gemäß der Arzneibücher geforderten Prüfungen nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf die Menge und Konzentration später zu erwartender *Extractables* zulassen. Jedoch zielen diese Prüfungen auch primär auf

anorganische Verunreinigungen durch das eingesetzte Vulkanisationssystem (Vulkanisatoren, Beschleuniger, etc.) und den verwendeten Elastomeren ab. Zusätzlich liegt der Verwendung einer wässrigen Prüflösung die Überlegung zugrunde, dass die geprüften Gummistopfen später für wässrige Parenteralia eingesetzt werden und demnach eine wässrige Extraktion ausreichend sein sollte. Dieser Ansatz vernachlässigt jedoch, dass insbesondere Biopharmazeutika neben Wasser normalerweise eine Vielzahl von Inhaltsstoffen enthalten, welche unter Umständen das Extraktionsvermögen des Arzneimittels beeinflussen können.

Als Beispiel für einen beschichteten Gummistopfen wurden auch analoge Extraktionsstudien mit dem laminierten Gummistopfen CB4 durchgeführt, welcher sich als nahezu inert gegenüber IPA als Extraktionsmittel herausstellte. Da jedoch von keinem der geprüften Gummistopfen die exakte Formulierung bekannt war, kann dieses Ergebnis nicht eindeutig der Fluoropolymer-Beschichtung zugeschrieben werden. Aus dem gut dokumentierten Eprex®-Vorfall ist aber bekannt, dass eine Fluoropolymer-Beschichtung tatsächlich als physikalische Barriere wirken und die Migration aus dem Stopfen heraus unterbinden kann [26].

Aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung sind Gummistopfen eine Quelle verschiedenster organischer und anorganischer *Extractables*. Da das Ziel von Extraktionsstudien sowohl die Quantifizierung als auch die Identifikation der möglichen *Extractables* und damit späteren *Leachables* ist, werden bevorzugt chromatographische Analysetechniken eingesetzt [65]. Ziel der entwickelten HPLC-DAD-Methode war es nun, einen möglichst vollständigen Überblick über mögliche organische *Extractables* zu erhalten. Hierfür war eine robuste Methode notwendig, mit welcher organische *Extractables* verschiedenster Polaritäten zufriedenstellend aufgetrennt werden konnten. Die anschließende Methodvalidierung in Anlehnung an ICH Q2 (R1) bewies, dass die entwickelte Methode diesem Anspruch gerecht wurde.

Die vier dominanten *Extractables* im hinteren Bereich des Extraktionsprofils von Gummistopfen CB1 (bezeichnet als *Extractables* 6-9, Abbildung 4.4) wurden mittels HPLC-MS und verschiedener NMR-Techniken identifiziert, mit dem Resultat, dass alle vier Substanzen der Substanzklasse der Trimellitate zuzuordnen sind (siehe Abbildung 4.13). Trimellitate, speziell TOTM, wurden in den vergangenen Jahren zunehmend als alternative Weichmacher bei der Herstellung von Polyvinylchlorid eingesetzt [66], da konventionelle Weichmacher im Verdacht stehen gesundheitsgefährdend zu sein. Insbesondere Phthalate

sind reproduktionstoxisch, weshalb ihr Austausch durch Alternativen empfohlen wird [5] [67] [68]. Die vorliegenden Daten zu TOTM deuten hingegen auf eine nur geringe Toxizität hin, zusätzlich wird TOTM nur schlecht absorbiert und metabolisiert [69]. Um den Herstellern den Umstieg von Phthalaten auf Alternativen zu erleichtern, publizierte das Ph. Eur. das vollständig überarbeitete Kapitel 3.1.13, in welchem neben anderen Weichmachern nun auch TOTM als Kunststoffadditiv 26 gelistet ist.

Bei den anschließenden Interaktionsstudien stellte sich heraus, dass insbesondere der Einsatz von Polysorbaten als Löslichkeitsvermittler zu der Migration aller neun bereits aus den Extraktionsstudien bekannten *Extractables* führte. Es wurde hierbei ausschließlich die Migration betrachtet, die Adsorption/Absorption und Permeation wurden nicht berücksichtigt. Ohne Zusatz von Polysorbat wurde nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C / 75 % r. F. weder in Phosphatpuffer pH 6,3 noch in Citratpuffer pH 3,0 eine Migration der bekannten *Extractables* beobachtet. In Gegenwart von 1,0 % Polysorbat 80 wurden hingegen die *Extractables* 1-9 in einer Konzentration detektiert, die verglichen mit den Ergebnissen nach 56 Tagen Extraktion mit IPA als Extraktionsmittel etwa 4,2 % entsprach. Bei Verwendung von 0,1 % Polysorbat 80 resultierten immerhin noch 0,41 % der *Extractables* 1-9.

Neben der eingesetzten Polysorbat-Konzentration beeinflusste indirekt auch der pH-Wert der Modellformulierungen die resultierende Konzentration an *Extractables*, weshalb bei pH 3,0 eine niedrigere Migration beobachtet wurde als bei pH 6,3. Hierfür ursächlich ist die Anfälligkeit von Polysorbaten für verschiedene Zersetzungsprozesse wie Autooxidations- und Hydrolysereaktionen in wässrigem Medium. Insbesondere die Hydrolyse des Fettsäureesters wird durch den pH-Wert beeinflusst, da diese Reaktion sowohl sauer als auch basisch katalysiert werden kann [33]. Aufgrund dieser Zersetzungsreaktionen wurde die tatsächliche Polysorbat-Konzentration höchstwahrscheinlich bei pH 3,0 reduziert und damit auch dessen Extraktionsvermögen. Die Reduktion der Polysorbat-Konzentration führte zu einer verminderten Migration der eher hydrophoben Trimellitate (*Extractables* 6-9), während die Migration der eher hydrophilen *Extractables* 1-5 nur wenig beeinflusst wurde.

Neben dem pH-Wert beeinflusste erwartungsgemäß auch der Typ des eingesetzten Polysorbats das Migrationsverhalten, da sich Polysorbat 20 und 80 strukturell voneinander unterscheiden. Die dominierende Fettsäure in Polysorbat 80 ist die Ölsäure, während bei Polysorbat 20 die Laurinsäure dominiert, wodurch Polysorbat 80 (HLB-Wert 15,0) eine höhere Lipophilie als Polysorbat 20 (HLB-Wert 16,7) aufweist und daher den stärkeren Löslichkeitsvermittler darstellt [70]. So führte der Einsatz von 1,0 % Polysorbat 80 nach

sechs Monaten Lagerung zu einer detektierten Konzentration an *Extractables* von 44,38 µg/ml während bei Einsatz von Polysorbat 20 in derselben Konzentration unter analogen Lagerbedingungen nur 23,51 µg/ml an *Extractables* resultierten.

Die tatsächlich verwendete Polysorbat-Konzentration liegt jedoch bei realen proteinhaltigen Arzneimittelformulierungen in einem Bereich von etwa 0,01-0,1 % [32], weshalb besonders die Modellformulierungen mit 1,0 % Polysorbat nicht dazu dienen können, die Realität abzubilden. Zusätzlich ist es unüblich diese Arzneimittel bei 40 °C / 75 % r. F. zu lagern, weshalb in diesem Zusammenhang davon abgesehen wird, von „Migrationsstudien unter beschleunigten Lagerbedingungen“ zu sprechen, da für Arzneimittel, die Kühlung erfordern, üblicherweise 25 °C / 60 % r. F. als beschleunigte Lagerbedingungen gewählt werden würden. Die gewählten Bedingungen veranschaulichen jedoch eindrücklich, dass der Einsatz von Polysorbaten als Löslichkeitsvermittler das Extraktionsvermögen einer eigentlich wässrigen Arzneimittelformulierung entscheidend verändern kann. Dies steht auch im Einklang mit der Literatur, da verschiedene Untersuchungen darauf hinweisen, dass zugesetztes Polysorbat die Migration von *Extractables* in eine Arzneiformulierung auslösen oder zumindest beschleunigen kann [26] [71].

Nachdem festgestellt worden war, dass die in den Extraktionsstudien detektierten *Extractables* 1-9 auch im Rahmen der Interaktionsstudien in Modellformulierungen mit verschiedenen Konzentrationen an Polysorbat 20 und 80 detektiert werden konnten, sollte der mögliche Einfluss von diesen auf verschiedene Modellproteine untersucht werden. Da sich der Gummistopfen CB1 in allen vorhergehenden Studien als der Gummistopfen mit der höchsten Anzahl und Konzentration an *Extractables* erwiesen hatte, war anzunehmen, dass auch der entsprechende Gummistopfenextrakt eine hohe Konzentration an *Extractables* enthalten würde und daher für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen diesen und den Modellproteinen geeignet sein würde.

Da Wechselwirkungen zwischen *Leachables* und Proteinen in Arzneimittelformulierungen in der Realität aufgrund der niedrigen Konzentration an *Leachables* sehr langsam stattfinden und negative Konsequenzen meist erst nach längerer Lagerdauer sichtbar werden (beispielsweise in Form von Verfärbungen, Ausfällungen, etc.), wurde ein Versuchsansatz gewählt, bei welchem eine möglichst hohe Konzentration an *Extractables* mit dem jeweiligen Modellprotein unter aggregationsinduzierenden Bedingungen in Kontakt gebracht werden sollten. Die Herausforderung bei der Herstellung des Gummistopfenextrakts lag in der niedrigen Polarität der vier Trimellitate (*Extractables* 6-9), was es unmöglich machte einen

rein wässrigen Gummistopfenextrakt herzustellen, während Wasser jedoch das bevorzugte Lösungsmittel für Proteine darstellt. Das gewählte Herstellungsverfahren und die Zusammensetzung des Gummistopfenextrakts sollten daher diese Gegensätze miteinander vereinen, was final gelang. Alle neun *Extractables* konnten im Extrakt in befriedigender Konzentration gelöst werden, bei gleichzeitig stabil vorliegenden Modellproteinen.

Die vorliegenden Ergebnisse der anschließenden Studien zur Wechselwirkung des Gummistopfenextrakts mit dem Modellprotein IgG lassen den Schluss zu, dass das Aggregationsverhalten von IgG in Gegenwart des Gummistopfenextrakts von CB1 beeinflusst wurde und zu einer vermehrten Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten führte. Unter Standardbedingungen wiesen die SEC-Chromatogramme neben dem IgG-Monomer auch dimeres IgG auf, was den Literaturangaben entsprach [72]. Unter den gewählten Stressbedingungen bildete sich ohne Zugabe von Gummistopfenextrakt ein lösliches IgG-Aggregat, bei welchem es sich um ein Agglomerat aus vier IgG-Monomeren handelte. In Gegenwart des Gummistopfenextrakts verschob sich die Bildung jedoch von löslichen IgG-Aggregaten hin zu unlöslichen Aggregat-Spezies.

Da bei der Produktion von Gummistopfen bevorzugt Silikonöl als Formtrennmittel verwendet wird und dieses an den Gummistopfen anhaftet, wurde untersucht, ob eine Entfernung von diesem die Ergebnisse beeinflussen würde. Die Gummistopfenextrakte der entfetteten Gummistopfen wiesen keine merklich reduzierte *Extractables*-Konzentration verglichen mit den unbehandelten Stopfen auf, und auch die Resultate bezüglich des Aggregatverhaltens von IgG der entsprechenden Versuchsreihen verliefen analog zueinander.

Der Silikonöl-Extrakt wurde ebenfalls mittels HPLC-DAD-Methode qualitativ überprüft. Da es sich bei Silikonöl um keine UV-aktive Substanz handelt, diente die Analyse mittels HPLC-DAD nicht dazu, die Konzentration an entferntem Silikonöl festzustellen. Die Methode wurde stattdessen dazu genutzt, qualitativ zu bestätigen, dass bei der Entfernung des Silikonöls die *Extractables* aus dem Gummistopfen CB1 nur in vernachlässigbarer Konzentration in den Silikonöl-Extrakt übergegangen waren. Silikonöl zeigte keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von IgG, was durchaus der Literatur entspricht, da unter anderem Britt *et al.* den Einfluss von Silikonöl auf die Aggregation von monoklonalen Antikörpern untersucht hatten und keinen Einfluss feststellen konnten [73]. Jones *et al.* hingegen halten eine durch Silikonöl ausgelöste Proteinaggregation für möglich, hierbei war jedoch mit den Modellproteinen Ribonuclease A, Lysozym, bovines Serumalbumin und Concanavalin A gearbeitet worden [74].

Auch TOTM allein zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Aggregation von IgG. Dies ist insofern erstaunlich, da die Konzentration im Versuchsansatz mit 0,03 mg/ml analog zu der effektiven Konzentration des Gummistopfenextrakts (siehe Kapitel 4.6) ausgewählt worden war.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die thermische Stressung von IgG zu einer Veränderung der Sekundärstruktur führt, da die eigentlich im Inneren verborgenen hydrophoben Aminosäurereste des Proteins nach außen in die hydrophile Umgebung gekehrt werden und aufgrund des thermodynamisch ungünstigen Zustands untereinander aggregieren. Es wird angenommen, dass sich an den dadurch entstehenden Grenzflächen weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptideinheiten ausbilden, welche wiederum die Bildung zusätzlicher α -Helices zur Folge haben [75]. Fincke *et al.* konnten zeigen, dass auch die tertiäre Struktur von IgG durch thermischen Stress beeinflusst wird, da sich durch Umfaltungsprozesse des Proteins schließlich hochgeordnete amyloide Fibrillen ausbilden, welche dann als unlösliche Aggregate präzipitieren [76].

Es ist nicht zweifelsfrei geklärt, über welchen Mechanismus Polysorbate eine stabilisierende Wirkung auf IgG ausüben, jedoch gibt es verschiedene Untersuchungen hierzu, die mehrheitlich zu dem Schluss kommen, dass allenfalls schwache Wechselwirkungen zwischen IgG und Polysorbat herrschen, sodass eine direkte Bindung eher vernachlässigbar und daher vermutlich der Verdrängungsmechanismus an der hydrophoben Luft-Wasser-Grenzfläche entscheidend ist [35]. Im Rahmen der verschiedenen Versuchsreihen wurde festgestellt, dass weder eventuell anhaftendes Silikonöl noch die Anwesenheit von TOTM allein zu einer vermehrten Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten führte. Auch der Gummistopfenextrakt des Typs BB6 führte zwar zu einer reduzierten Bildung von löslichen IgG-Aggregaten, jedoch waren keine signifikante Reduktion der monomeren IgG-Spezies und auch keine vermehrte Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten erkennbar.

Zusammenfassend wird angenommen, dass der Gummistopfenextrakt des Typs CB1 das Aggregationsverhalten von IgG nicht durch eine direkte Wechselwirkung der vorhandenen *Extractables* mit IgG selbst beeinflusste. Es ist eher wahrscheinlich, dass die *Extractables* mit dem Polysorbat 20 wechselwirkten und damit die eingesetzte Polysorbat-Konzentration nicht mehr für eine vollständige Absättigung der hydrophoben Luft-Wasser-Grenzfläche ausreichend war. Die induzierten thermischen Stressbedingungen führten allein und ohne Zusatz des Gummistopfenextrakts CB1 bei einer Versuchsdauer von 130 min zu der Ausbildung von löslichen IgG-Aggregaten bei gleichzeitiger Konzentrationsabnahme von

monomerem IgG. Die Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten wurde hingegen nicht beobachtet. Bei einer fortgesetzten Versuchsdauer wäre unter diesen Versuchsbedingungen die allmähliche Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten wahrscheinlich beobachtet worden. Die Anwesenheit des Gummistopfenextrakts schien diesen Mechanismus jedoch zu beschleunigen. Es ist denkbar, dass bei den löslichen IgG-Aggregaten durch Kontakt mit der nicht vollständig abgesättigten hydrophoben Luft-Wasser-Grenzfläche weitere Veränderungen der Tertiärstruktur ausgelöst wurden, welche schließlich zu der Bildung von unlöslichen IgG-Aggregaten führten.

Für das Modellprotein EPO war anhand der SEC-Ergebnisse ersichtlich, dass die gewählten thermischen Stressbedingungen ausreichend gewählt worden waren, um die Bildung von aggregierten EPO-Spezies auszulösen, gleichzeitig bestätigte die nur geringe Aggregatbildung im Versuchsansatz ohne Gummistopfenextrakt, dass es sich bei EPO trotz des niedrigen Schmelzpunktes von 53 °C [56] um ein relativ stabiles Protein handelt.

Aufgrund des geringen verfügbaren Probevolumens war es für EPO nicht möglich, die Bildung unlöslicher EPO-Aggregate mittels Trübungsmessung zu verfolgen, sodass nur die Ergebnisse der SEC-Messung und damit die Bildung der löslichen Aggregatspezies und der monomeren Spezies ausgewertet werden konnten. Im Gegensatz zu dem Modellprotein IgG führte bei EPO die Anwesenheit des Gummistopfenextrakts des Typs CB1 zu einer erhöhten Bildung von löslichen Aggregat-Spezies. Aus der Literatur ist bekannt, dass EPO mit Polysorbat 80 wechselwirkt, indem sich 12 Polysorbat 80-Moleküle an die hydrophoben Bereiche von einem EPO-Molekül anlagern [37]. Unter der Annahme, dass ein ähnlicher Mechanismus zwischen EPO und Polysorbat 20 abläuft, ist es möglich, dass die thermischen Stressbedingungen zu einer Entfaltung des EPO-Moleküls führten, wobei die hydrophoben Aminosäurereste nach außen in die hydrophile Umgebung geklappt wurden und sich die Polysorbat 20-Moleküle an diese anlagerten. Es ist denkbar, dass hierdurch eine Stabilisierung des EPO-Moleküls auftrat, wodurch wiederum die Aggregation verlangsamt wurde. In Gegenwart des Gummistopfenextrakts konkurrierten die *Extractables* mit dem EPO um das vorhandene Polysorbat 20, sodass dieses nicht mehr in ausreichendem Maße zur Verfügung stand, um sowohl die hydrophoben Aminosäurereste des EPO-Moleküls als auch die hydrophobe Luft-Wasser-Grenzfläche abzusättigen.

Ein Resultat hiervon wäre die erhöhte Aggregation von EPO in Gegenwart des Gummistopfenextrakts. Bei der Versuchsreihe in 1,0 % m/v Polysorbat 20-Lösung zeigte die Gegenwart des Gummistopfenextrakts keine Wirkung auf die Aggregatbildung, d. h. der

Einsatz der 10-fachen Konzentration an Polysorbat 20 unterband die Aggregatbildung. Diese Beobachtung bestätigte die These, dass der Einfluss der *Extractables* aus dem Gummistopfenextrakt auf die Aggregatbildung des Modellproteins EPO nicht auf eine direkte Wechselwirkung zwischen *Extractables* und Modellprotein zurückzuführen war, vielmehr wechselwirkten die *Extractables* mit dem eingesetzten Polysorbat 20, wodurch dieses für eine stabilisierende Wirkung nicht mehr in ausreichendem Maße zur Verfügung stand.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass die Kompatibilität von Gummistopfen mit Ph. Eur. 3.2.9 nicht zwangsläufig ausschließt, dass aus diesen Gummistopfen später *Leachables* in eine Arzneimittelformulierung migrieren.

Nach dem aktuellen Kapitel Ph. Eur. 3.2.9 und USP <381> wird für die Prüfung der Gummistopfen nur Wasser als Extraktionsmittel eingesetzt und die daraus resultierende wässrige Prüflösung einer Reihe von Prüfungen unterzogen, bei denen primär Summenparameter erfasst werden. Dieser wässrige Extrakt enthält jedoch nicht das vollständige Spektrum an möglichen *Extractables*, da diese aufgrund ihrer großen strukturellen Vielfalt auch unterschiedlichste Polaritäten aufweisen können. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass IPA ein geeignetes Extraktionsmittel darstellt, um von Gummistopfen ein Extraktionsprofil zu erhalten, welches einen nahezu vollständigen Überblick über die möglichen organischen *Extractables* erlaubt.

Auch die Annahme, dass das Extraktionsvermögen von wässrigen proteinhaltigen Arzneimittelformulierungen dem von reinem Wasser entsprechen würde, muss kritisch betrachtet werden, da diese üblicherweise Löslichkeitsvermittler, beispielsweise Polysorbate, enthalten. Diese können aufgrund ihrer chemischen Struktur das Migrationsverhalten von potentiellen *Leachables* entscheidend verändern. Die für diese Untersuchung gewählten Versuchsbedingungen sind zwar hinsichtlich der eingesetzten Temperatur und Konzentration an Polysorbat extrem, jedoch wurden sie bewusst gewählt, um die Geschwindigkeit möglicher Extraktions- und Migrationsvorgänge zu beschleunigen, die unter Normalbedingungen nur sehr langsam ablaufen. Proteinhaltige Arzneimittelformulierungen werden normalerweise nicht Lagerbedingungen von 40 °C und 75 % r. F. ausgesetzt, da diese Bedingungen zu einer Degradation des Proteins führen würden. Jedoch beschleunigt diese Lagerung den Migrationsvorgang, sodass erkennbar wird, dass potentielle *Extractables* aus der Primärverpackung in eine geeignete Modellformulierung migrieren können.

Auch die niedrigste in den Modellformulierungen angewandte Konzentration an Polysorbat 20 bzw. 80 liegt mit 0,1 % über der kritischen Mizellbildungskonzentration von 0,007 bzw. 0,002 % m/v. Dies schmälert jedoch nicht die Aussagekraft der Ergebnisse, die zeigen, dass anwesendes Polysorbat das Extraktionsvermögen einer eigentlich wässrigen Formulierung

entscheidend verändern kann. Der angewandte Versuchsaufbau hat sich als geeignet erwiesen, um den Einfluss von möglichen *Extractables* auf Modellproteine in einer relativ kurzen Zeitspanne untersuchen zu können. Durch den Einsatz von Polysorbat 20 in den Konzentrationen 0,1 und 1,0 % m/v konnte im Falle von EPO gezeigt werden, dass die 10-fache Konzentration an Polysorbat 20 die Aggregation unter den gewählten Versuchsbedingungen unterband. Es ist daher plausibel, dass die *Extractables* aus dem Gummistopfenextrakt nicht unmittelbar mit dem Modellprotein wechselwirkten, sondern mit dem anwesenden Polysorbat 20, wodurch dieses nicht mehr ausreichend zur Verfügung stand, um die Proteinaggregation zu unterbinden. Es bleibt hierbei jedoch unklar, nach welchem Reaktionsmechanismus die anschließende Proteinaggregation abläuft.

Da aufgrund der Versuchsreihen des Modellproteins IgG mit Trimellitat allein festgestellt werden konnte, dass dieses verglichen mit dem Gummistopfenextrakt des Typs CB1 nicht denselben Effekt auf die Proteinaggregation hatte, ist höchstwahrscheinlich - zumindest in dieser Untersuchung - die Konzentration an *Extractables* ausschlaggebend und nicht deren chemische Struktur. Dies wird auch durch die Versuchsreihen mit dem Gummistopfenextrakt des Typs BB6 bestätigt.

Insbesondere bei dem Gummistopfen des Typs CB1 zeigten sich die Schwächen bei der Beurteilung der Gummistopfenqualität gemäß Ph. Eur. 3.2.9 bzw. USP <381>, da dieser Gummistopfen trotz Kompatibilität mit den genannten Monographien ein Extraktionsprofil mit einer Vielzahl an *Extractables* verschiedenster Polaritäten in unterschiedlichen Konzentrationen aufwies. Die Kompatibilität eines Gummistopfens mit Ph. Eur. 3.2.9 bzw. USP <381> lässt demnach keine Rückschlüsse darauf zu, ob unter bestimmten Lagerbedingungen *Extractables* aus diesem Gummistopfen in das Arzneimittel gelangen könnten.

Ein Vergleich der Extraktionsprofile der Gummistopfen zeigte jedoch auch, dass von den neun geprüften Gummistopfen lediglich Gummistopfen CB1 ein auffälliges Extraktionsprofil bzgl. Anzahl und Konzentration der detektierten *Extractables* aufwies, während bei den restlichen Gummistopfen nur wenige *Extractables* detektiert werden konnten, was auf eine eher gute Qualität der geprüften Gummistopfen hindeutete. Ebenfalls positiv zu bewerten waren die Ergebnisse für den laminierten Gummistopfen CB4, da dieser erwartungsgemäß von allen geprüften Gummistopfen die niedrigste Anzahl und Konzentration an detektierten *Extractables* aufwies.

7 Ausblick

Die Prüfung von Gummistopfen gemäß Ph. Eur., USP und JP basiert hauptsächlich auf der Analyse von einzelnen Substanzklassen, die Rückschlüsse auf das verwendete Vulkanisationssystem zulassen und im Falle von Ph. Eur. und USP dadurch eine Unterscheidung zwischen Gummistopfen des Typs 1 und 2 ermöglichen. Die bestätigte Kompatibilität eines Gummistopfens mit diesen Monographien lässt jedoch aufgrund der fehlenden Spezifität der Prüfungen keine Rückschlüsse darauf zu, ob und in welchem Ausmaß aus diesem später *Extractables* in das Arzneimittel migrieren können.

Die Ergänzung dieser Monographien um spezifischere Prüfungen der Gummistopfen wäre daher wünschenswert. Denkbar wäre hierbei die routinemäßige Aufnahme eines Extraktionsprofils nach vorheriger Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, da die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Etablierung einer geeigneten robusten HPLC-Methode möglich ist.

8 Veröffentlichungen

Artikel/Poster

Richter C., Lipperheide C., Lipke U., Lamprecht A. Impact of Extractables from Rubber Closures on Protein Stability under Heat Stress. *Eur J Pharm Biopharm.* **2018** 130, 22-29, DOI: [10.1016/j.ejpb.2018.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.009)

Richter C., Lipke U., Zapf T., Lamprecht A., Lipperheide C. Evaluation of Interactions between Extractables of Elastomeric Closures and Protein Therapeutics. *DPhG-Doktorandentagung*, Greifswald, 10.-13. Oktober **2012**

9 Experimenteller Teil

9.1 Materialien, Geräte und Methoden

9.1.1 Geräte

9.1.1.1 Verwendete HPLC-DAD Systeme

Hersteller / Komponenten	System 1	System 2	System 3
Hersteller	<i>Dionex</i> (Germering, Deutschland)	<i>Agilent Technologies</i> (Böblingen, Deutschland)	
Quaternäre Pumpe	P 680A LPG-4	G1311A	G1315B
Degasser	-	G1379A	G1379A
Autosampler	ASI-100 T, 250µl- Probenschleife	G1329A, G1330B (Thermostat)	
Säulenofen	STH 585 ¹	G1316A	G1316A
Säule	Prodigy 3u ODS (3), 100A, 150 x 3.00 mm ²	Säule 1: Biosep-SEC-s2000, 300 x 7.80 mm + Security Guard Cartridges GFC-2000, 4 x 3.00 mm ² Säule 2: TSKgel G3000PWXL, 300 x 7.80 mm + TSKgel PWXL Guardcolumn, 40 x 6.00 mm ³	
DAD	Ultimate 3000 DAD	G1315B	G1315B
Software	Chromeleon Client 6.80 SR7 Build 2528 (148369)	Chemstation Version B.03.02	Chemstation Version 10.02 A

¹ von *GynkoteK*, Germering, Deutschland

² von *Phenomenex*, Aschaffenburg, Deutschland

³ von *Tosoh Bioscience*, Griesheim, Deutschland

9.1.1.2 Verwendetes präparatives HPLC-DAD-System

Hersteller	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)
Binäre Pumpe	G1361A
Degasser	-
Autosampler	G2260A
Säulenofen	-
Säule	Prodigy 5u ODS (3), 100A, 250 x 10.00 mm ¹
DAD	G1315B
Fraktionensammler	G1364B
Software	Chemstation Version B.03.01-SR1.1

¹ von Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

9.1.1.3 Verwendetes HPLC-DAD-MSD-System

Hersteller	Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)
Quaternäre Pumpe	G1311A
Degasser	G1311A
Autosampler	G1329A, G1330B (Thermostat)
Säulenofen	G1316A
Säule	Prodigy 3u ODS (3), 100A, 150 x 3.00 mm ¹
DAD	G1315A
MS	G6120
Software	Chemstation

¹ von Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

9.1.1.4 Weitere Geräte

AAS-Gerät	iCE 3500 AA DUAL Flammen-Graphitrohrofen AAS-Spektrometer mit der Software iCE Solaar™. (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, USA)
Autoklav	Kleinautoklav KL-12-2 (SANOKlav, Bad Überkingen-Hausen, Deutschland)
Gerät für Farbmessung	Lico 400 (HACH LANGE, Düsseldorf, Deutschland)
Klimaschränke	Konstant-Klimaprüfstand VC 0033 (Vötsch-Industrietechnik, Balingen-Frommern, Deutschland)
Kühl-Gefrierkombination	KSV 3321/05 (Robert-Bosch Haustechnik, Gerlingen-Schillerhöhle, Deutschland)

Experimenteller Teil

Magnetrührer	IKA-Combimag RCT (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland)
Microplate Reader	Safire2 (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
pH-Messgerät	pH-Meter 780 (Metrohm, Herisau, Schweiz)
Photometer	Uvikon-XL (Biotek Instruments GmbH, Friedrichshall, Deutschland)
Micro spectrosil® Quarzküvetten (Weglänge 10 mm)	Rotilabo (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe Deutschland)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-200, Vacuum Controller V-800, Pumpe V-500, Heating Bath B-490 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz)
Trockenschrank	Heraeus kelvitron t (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)
Vakuumkonzentrator	S-concentrator BA-VC-300H mit Rotor ähnlich Typ 16-120 (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland)
Waagen	PG 603-S (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) AX 205 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) AE 163 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)

9.1.2 Chemikalien

9.1.2.1 Solvenzien

Acetonitril	gradient grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Essigsäure 100% wasserfrei	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolut	reinst (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Isobutylmethylketon	for extraction analysis (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Methanol	für HPLC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
2-Propanol	gradient grade (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Gereinigtes Wasser (Aqua Purificata)	wurde bedarfsabhängig über eine Mili-Q gradient-Anlage (Milipore, Molsheim, Frankreich) hergestellt

9.1.2.2 Sonstige Chemikalien

Ameisensäure	p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumacetat	Ph Eur (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumchlorid	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumformiat	99,995+ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Blei-Standardlösung	1000 mg/l Pb Certipur (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Blei(II)-acetat-Trihydrat	Reag. Ph. Eur. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Blei(II)-nitrat	Reag. Ph. Eur. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Experimenteller Teil

Bromthymolblau	Indikator (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Citronensäure wasserfrei	≥ 99,5 %, Ph. Eur. (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin etwa 87 %	reinst (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Hexamethylentetramin	zur Analyse (Merck, Hohenbrunn, Deutschland)
Hydrazinsulfat	purum p. a. (Fluka, Buchs, Schweiz)
Methylisobutylketon	for extraction analysis (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumbromat	zur Analyse, ACS, ISO (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumiodid	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumpermanganat	zur Analyse, ACS, ISO (Merck, Darmstadt, Deutschland)
D(-)-Mannitol	reinst (Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland)
Natriumchlorid	p.a. (Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Plätzchen zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriummonohydrogenphosphat	wasserfrei zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumsulfid Nonahydrat	98+ % ACS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Natriumthiosulfatlösung 0,1 mol/l	Titrisol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Polysorbat 20	Ph. Eur. (Caesar & Loretz, Hilden, Deutschland)
Polysorbat 80	Ph. Eur. (Caesar & Loretz, Hilden, Deutschland)
Quecksilberiodid	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure rauchend 37 %	for analysis (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure 95-98 %	suitable for use as excipient (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Stärke löslich	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Thioacetamid	zur Analyse (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Zink-Standardlösung	1000 mg/l Zn Certipur (Merck, Darmstadt, Deutschland)

9.1.3 Reagenzien

9.1.3.1 Reagenzien nach Ph. Eur./USP

Reagenz	Abweichung gegenüber Ph. Eur. / USP
Farbvergleichslösung GG5	mit Gerät (siehe Kapitel 9.1.1.4) gemessen
Referenzsuspension I bis IV (Ph. Eur. 2.2.1)	-
Bromthymolblau-Lösung R1	-
verdünnte Schwefelsäure R	-
verdünnte Natriumhydroxid-Lösung R	-
Kaliumpermanganat-Lösung (0,002 mol/l)	-
Natriumhydroxid-Lösung (0,01 mol/l)	durch Verdünnung aus 0,02 mol/l Natriumhydroxid-Lösung hergestellt
Natriumthiosulfat-Lösung (0,01 mol/l)	durch Verdünnung von 0,1 mol/l Natriumthiosulfat-Lösung (siehe Kapitel 9.1.2.2) hergestellt
Stärke-Lösung R	es wurde auf die Zugabe von HgI ₂ verzichtet
Neßlers Reagenz R	-
Ammonium-Lösung (1 ppm NH₄) R	-
Salzsäure (0,1 mol/l)	-
Salzsäure 6 N	-
Ammoniak 6 N	-
Blei(II)nitrat-Stammlösung	-
Blei(II)nitrat-Standardlösung	-
Zink-Lösung (10 ppm Zn) R	aus der Zink-Standardlösung 1000 mg/l Zn hergestellt (siehe Kapitel 9.1.2.2)
Blei-Lösung (2 ppm Pb) R	aus der Blei-Standardlösung 1000 mg/l Pb hergestellt (siehe Kapitel 9.1.2.2)
Lösung von Citronensäure R (20 g/l)	-
Blei(II)-acetat-Papier R	die Blei(II)-acetat-Lösung R wurde statt in CO ₂ -freiem Wasser mit gereinigtem Wasser (siehe Kapitel 9.1.2.2) hergestellt
Pufferlösung pH 3,5 R	der pH-Wert wurde erst nach dem Auffüllen auf 100 ml eingestellt
Thioacetamid-Reagenz R	-

9.1.3.2 Reagenzien nach JP

Reagenz	Abweichung gegenüber JP
Kaliumchlorid-Lösung (0,01 mol/l)	-
verdünnte Salpetersäure (1 in 3)	-
Standard Zink-Stammlösung	wurde durch die Zink-Standardlösung 1000 mg/l Zn ersetzt (siehe Kapitel 9.1.2.2)
Kaliumpermanganat-Lösung VS (0,002 mol/l)	-
verdünnte Schwefelsäure	-
Natriumthiosulfat-Lösung (0,01 mol/l)	wurde durch Verdünnung von 0,1 mol/l Natriumthiosulfat-Lösung (siehe Kapitel 9.1.2.2) hergestellt
Stärke-Lösung TS	-

9.1.4 Referenzsubstanzen sowie Stammlösungen aus diesen

Human Immunoglobulin BRP	Katalog-Nr. Y0001512 (EDQM, Straßburg, Frankreich)
IgG Stammlsg.	Human Immunoglobulin BRP wird mit Puffer (4,87 g Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat und 1,74 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat werden mit Wasser zu 1 L gelöst) rekonstituiert und auf eine Konzentration von 50 mg/ml verdünnt. Aliquote dieser Stammlsg. werden in Reaktionsgefäßen eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.
Erythropoietin BRP	Katalog-Nr. E1515000 (EDQM, Straßburg, Frankreich)
EPO Stammlsg.	4 Vials Erythropoietin BRP werden mit Puffer (1,15 g Dinatriumhydrogenphosphat , 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat und 23,4 g Natriumchlorid werden mit Wasser zu 1 l gelöst) rekonstituiert und auf eine Konzentration von 0,4 mg/ml verdünnt.
Pyren	Zur Analyse (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Triocetyltrimellitat	99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Mix-Standard für SEC-Analytik	<i>Bestandteile: Bovines Thyroglobulin 670 kDa, IgA 300 kDa, IgG 150 kDa, Ovalbumin 44 kDa, Myoglobin 17 kDa, Uridin 0,244 kDa</i> Katalog-Nr. AL0-3042 (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Silikonöl DC200	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, ein Gehalt kann nicht angegeben werden

9.1.5 Verbrauchsmaterial

Filter	Chromafil PET-45/15 MS (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
Spritzen	Injekt 2 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) Omnifix 5 ml und 10 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Kunststoffpipetten	Pasteur-Plast Pipetten 3 ml makro, 150 mm (Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland)
Glaspipetten	Pasteurpipetten 150 mm (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)
HPLC-Vials + Verschlüsse	2 ml klare Bördelverschluss-Vials mit 11 mm Aluminium Bördelkappen (Agilent Technologies, Deutschland)
Vials	5 ml Injektionsflaschen Kl.1 mit 20er Hals (Zscheile & Klinger GmbH, Hamburg, Deutschland)
Aluminiumverschlüsse	20 mm Headspace-Bördelkappen ohne Septum (Wheaton, Millville, USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

9.1.6 Gummistopfen und deren Prüfung gemäß Ph. Eur./USP/JP

Es wurden sechs Gummistopfen aus Bromobutylgummi (BB1-BB6) und vier Gummistopfen aus Chlorobutylgummi (CB1-CB4) von sieben verschiedenen Lieferanten bezogen. Bei Gummistopfen CB4 handelte es sich um einen laminierten Stopfen mit einer Beschichtung aus Ethylentetrafluoroethylen (ETFE), weshalb dieser nicht den Prüfungen unterzogen wurde.

Für die restlichen Gummistopfen wurden von allen Lieferanten Zertifikate bezüglich der Kompatibilität gemäß Ph. Eur. 3.2.9, USP <381> und JP 7.03 angefragt. Lagten die entsprechenden Zertifikate vor, wurde auf eigene Prüfungen verzichtet, ansonsten wurden diese durchgeführt (siehe Tabelle 9.1). Der geforderte Prüfumfang variierte zwischen den Arzneibüchern, wobei sich der Prüfumfang gemäß Ph. Eur. und USP weitestgehend entsprach (siehe Tabelle 9.2). Das JP hingegen unterschied sich erheblich von Ph. Eur. und USP, sowohl hinsichtlich des Prüfumfanges als auch in der Herstellung der Prüflösung. Für die Prüfung nach Ph. Eur. und USP wurde die Prüflösung mit jeweils 10 Gummistopfen hergestellt, da diese Anzahl der geforderten Gesamtoberfläche von 100 cm² entsprach (alle gekauften Gummistopfen hatten 13 mm Zapfendurchmesser und eigneten sich als

Verschluss für Injektionsflaschen mit 20 mm Bördelranddurchmesser). Die Prüflösung nach JP wurde mit jeweils 20 Gummistopfen hergestellt, da nach damaligem Stand gemäß JP das Gewicht der Gummistopfen ausschlaggebend war. Auch der Reinigungsschritt vor der Herstellung der eigentlichen Prüflösung unterschied sich wesentlich: Während die Gummistopfen gemäß Ph. Eur. und USP vorher durch 5-minütiges Kochen in Wasser gereinigt wurden, forderte das JP lediglich die Reinigung der Gummistopfen mit kaltem Wasser ohne definierte Anzahl an Spülschritten. Alle nach Ph. Eur., USP und JP erforderlichen Prüfungen in wässriger Prüflösung wurden durchgeführt.

Prüfungen am Gummistopfen oder dem Gummimaterial selbst sowie die gemäß JP geforderten Parameter *Systemische Toxizität*, *Pyrogen Test* und *Haemolyse Test* waren nicht Teil des aktuellen Promotionsvorhabens.

Tabelle 9.1: Aufschlüsselung der bestellten Gummistopfen anhand von Lieferant, Material und vorliegenden Zertifikaten zur Übereinstimmung mit Ph. Eur., USP und JP. Lag ein entsprechendes Zertifikat vor (+), wurde auf eine zusätzliche Prüfung verzichtet, lag kein Zertifikat vor (-), wurden die entsprechenden Prüfungen durchgeführt. ¹ Der Hersteller ist der Autorin bekannt, ² Der Hersteller ist der Autorin unbekannt, ³ Der Hersteller ist der Autorin bekannt. Da es sich hierbei jedoch um einen Lyostopfen mit abweichender Oberfläche handelte, wurde dieser für die weiteren Untersuchungen nicht herangezogen.

Bezeichnung	Lieferant	Material	Ph. Eur.	USP	JP
BB1 ¹	A	Bromobutylgummi	+	+	-
CB1 ¹	A	Chlorobutylgummi	+	+	-
BB2 ¹	A	Bromobutylgummi	+	+	-
BB3 ²	B	Bromobutylgummi	+	-	-
BB4 ²	C	Bromobutylgummi	-	-	-
CB2 ²	D	Chlorobutylgummi	-	-	-
CB3 ²	E	Chlorobutylgummi	-	-	-
BB5 ³	F	Bromobutylgummi	+	+	+
BB6 ¹	F	Bromobutylgummi	+	+	+
CB4 ¹	G	Chlorobutylgummi	Gummistopfen mit Flurotec®-Coating		

Tabelle 9.2: Gegenüberstellung der geforderten Prüfungen gemäß Ph. Eur., USP und JP. Während die Prüfungen gemäß Ph. Eur. und USP weitestgehend übereinstimmten, unterschied sich der Prüfumfang gemäß JP erheblich. (x): geforderte Prüfung, (-) nicht gefordert. Stand zum Zeitpunkt der praktischen Prüfungen: Ph. Eur. 6. Edition, JP 15. Edition, USP 33.

Prüfung	Ph. Eur.	USP	JP
Aussehen der Lösung	x	x	x
Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen	x	x	-
Absorption	x	x	x
Reduzierende Substanzen	x	x	x
Ammonium	x	x	-
Extrahierbares Zink	x	x	x
Extrahierbare Schwermetalle	x	x	-
Verdampfungsrückstand	x	-	x
Flüchtige Sulfide	x	x	-
Cadmium	-	-	x
Blei	-	-	x
Schaumtest	-	-	x
pH-Wert	-	-	x

9.1.7 Methoden

9.1.7.1 HPLC-Methode für die Extraktions- und Interaktionsstudien

Die HPLC-Methode wurde von Andrikopoulos [77] übernommen und modifiziert und die HPLC-DAD-Systeme 1 oder 2 verwendet.

Tabelle 9.3: Eluentenherstellung für die Durchführung der Extraktions- und Interaktionsstudien

Eluent	Herstellung
A – Ammoniumformiat-Puffer pH 3,0	110 mg Ammoniumformiat wurden in 1 l-Messkolben eingewogen und in 200 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 400 µl konz. Ameisensäure wurde mit Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt und der pH-Wert mit konz. Ameisensäure auf pH 3,0 eingestellt.
B – ACN/MeOH	Acetonitril und Methanol wurden im Verhältnis 6:4 v/v gemischt und 400 µl konz. Ameisensäure hinzugefügt.
C – Isopropanol	Zu 500 ml Isopropanol wurden 200 µl konz. Ameisensäure hinzugefügt.

Tabelle 9.4: Methodenparameter für die Durchführung der Extraktions- und Interaktionsstudien

Parameter	Einstellung																																								
Injektionsvolumen	20 µl																																								
Temperatur Autosampler	5 °C																																								
Temperatur Säulenofen	40 °C																																								
Detektoreinstellungen	220 nm, 254 nm (Bandweite 1 nm, Referenzwellenlänge 480 nm, Referenzbandweite 1 nm ¹) 3D-Feld: 190-800 nm Bandweite: 1 nm, Referenzwellenlänge: 800nm, Bunch Width: 1 nm ¹ Response time: 2 s ¹ Data collection rate: 5 Hz ¹																																								
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>Fluss [ml/min]</th> <th>Anteil B [%]</th> <th>Anteil C [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0,5</td> <td>52</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>0,5</td> <td>52</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0,5</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>0,6</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>0,6</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>48</td> <td>0,6</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>0,6</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>56</td> <td>0,6</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>0,5</td> <td>52</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Anteil B [%]	Anteil C [%]	0	0,5	52	0	5	0,5	52	0	35	0,5	100	0	36	0,6	100	0	40	0,6	100	0	48	0,6	40	60	55	0,6	40	60	56	0,6	100	0	60	0,5	52	0
	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Anteil B [%]	Anteil C [%]																																					
	0	0,5	52	0																																					
	5	0,5	52	0																																					
	35	0,5	100	0																																					
	36	0,6	100	0																																					
	40	0,6	100	0																																					
	48	0,6	40	60																																					
	55	0,6	40	60																																					
	56	0,6	100	0																																					
60	0,5	52	0																																						

¹ bezieht sich auf HPLC-DAD System 1

9.1.7.2 Durchführung der Extraktionsstudien

Die anschließende Analyse erfolgte mittels HPLC-DAD (System 1 und 2, siehe Kapitel 9.1.1.1) wahlweise als Einfach- oder Doppelinjektion. Aufgrund der Ergebnisse der Methodvalidierung (siehe Kapitel 4.1) erfolgte die Auswertung der *Extractables* 1-5 bei 220 nm, der *Extractables* 6-9 hingegen bei 254 nm, zusätzlich führten die unterschiedlichen HPLC-DAD-Systeme zu einer Varianz der Ergebnisse um den Faktor 1,126. Um die Ergebnisse beider HPLC-Systeme verwenden und zusammenfassen zu können, wurden die Ergebnisse um diesen Faktor korrigiert.

Tabelle 9.5: Probenpräparation für die Extraktionsstudien mit Gummistopfen CB1 und CB4

Vorbereitung	<p>Proben: Glasvials wurden mit 5 ml des jeweiligen Extraktionsmittels befüllt, mit einem Gummistopfen verschlossen und einem Aluminiumring zugebördelt.</p> <p>Leerwert: Die Vorbereitung erfolgte analog zu den Proben, jedoch wurden die Glasvials mit Glasstopfen verschlossen und normalstehend gelagert.</p>
Verwendete Gummistopfen	CB1, CB4
Extraktionsmittel	IPA, Wasser
Lagerbedingungen	40 °C / 75 % r. F., kopfstehend mit Ausnahme vom Leerwert
Prüfzeitpunkte	1, 4, 6, 8, 13, 14, 21, 22, 28, 56 Tage
Entnahme	Jeweils drei Vials und ein Leerwert
Aufarbeitung der Proben für die HPLC-Analyse	
Gummistopfen CB1	
1 – IS 1	25 mg Pyren wurden mit IPA zu 100 ml verdünnt und für 5 min im Ultraschallbad gelöst (0,25 mg/ml).
2 – IS 2	1 ml von IS 1 wurde mit IPA zu 50 ml verdünnt (0,005 mg/ml).
3 – IS 3	1 ml von IS 1 wurde mit IPA zu 25 ml verdünnt (0,01 mg/ml)
Probenpräparation	Die Probe wurde mit einer 5 ml Einmalspritze aus dem Glasvial entnommen und über einen 0,45 µm PET-Filter in ein Becherglas filtriert. Es wurden jeweils 250 µl von IS 1, 2, 3 vorgelegt und mit Probe zu 1 ml aufgefüllt.
Gummistopfen CB4	
1 – IS 1	37 mg Pyren wurden mit IPA zu 100 ml verdünnt und für 5 min im Ultraschallbad gelöst (0,37 mg/ml).
2 – IS 2	1 ml von IS 1 wurde mit IPA zu 10 ml verdünnt (0,037 mg/ml).
Probenpräparation	Die Probelösung wurde mit einer 5 ml Einmalspritze aus dem Glasvial entnommen und über einen 0,45 µm PET-Filter in ein Becherglas filtriert. Es wurden jeweils 250 µl von IS 1, 2, 3 vorgelegt und mit Probelösung zu 1 ml aufgefüllt.

9.1.7.3 Durchführung der Interaktionsstudien

Tabelle 9.6: Probenpräparation für die Interaktionsstudien mit den Gummistopfen CB1 und BB2

Vorbereitung	<p>Proben: Glasvials wurden mit 5 ml der jeweiligen Modellformulierung befüllt, mit einem Gummistopfen CB1 verschlossen und einem Aluminiumring zugebördelt.</p> <p>Leerwert: Die entsprechenden Modellformulierungen wurden in Reagenzgläser mit Schliff gefüllt und mit einem Glasstopfen verschlossen. Die Lagerung erfolgte normalstehend, nach der jeweiligen Entnahme wurden die Reagenzgläser wieder eingelagert.</p>
Verwendete Gummistopfen	CB1, BB2 (zu Vergleichszwecken) ¹
Modellformulierungen	
1	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3
2	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 0,1 % PS 80
3	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1,0 % PS 80
4	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 0,1 % PS 20
5	50 mM Phosphatpuffer pH 6,3 mit 1,0 % PS 20
6	50 mM Citratpuffer pH 3,0
7	50 mM Citratpuffer pH 3,0 mit 1,0 % PS 80
Lagerbedingungen	40 °C / 75 % r. F., kopfstehend
Prüfzeitpunkte	1 Woche, 1, 2, 3, 4 und 6 Monate
Entnahme	Jeweils 3 Vials und ein Leerwert
Präparation des internen Standards	
1 – IS 1	37 mg Pyren wurden mit IPA in einem Messkolben zu 100 ml verdünnt und für 5 min im Ultraschallbad gelöst (0,37 mg/ml).
2 – IS 2	1 ml von IS 1 wurde mit IPA zu 10 ml verdünnt (0,037 mg/ml).
Probenpräparation	<p>Die Probelösung wurde mit einer 5 ml Einmalspritze aus dem Glasvial entnommen und über einen 0,45 µm PET-Filter in ein Becherglas filtriert.</p> <p>Es wurden jeweils 100 bzw. 200 µl von IS 2 vorgelegt und mit Probelösung zu 1 bzw. 2 ml aufgefüllt.</p>

¹ Zu Vergleichszwecken wurden zusätzliche Vials mit den Modellformulierungen 1, 3, 5 befüllt, jedoch mit dem Gummistopfen BB2 verschlossen und analog eingelagert und beprobt.

Die anschließende Analyse erfolgte mittels HPLC-DAD (System 1, siehe Kapitel 9.1.1.1) als Einfachinjektion. Aufgrund der Ergebnisse der Methodvalidierung (siehe Kapitel 4.1) erfolgte die Auswertung der *Extractables* 1-5 bei 220 nm, die *Extractables* 6-9 hingegen bei 254 nm. Da die Analyse ausschließlich am HPLC-DAD System 1 stattfand, war eine Anlagenkorrektur analog zu den Extraktionsstudien nicht notwendig.

9.1.7.4 Präparative HPLC-Methode für die Substanzidentifikation

Die ursprüngliche Methode (siehe Kapitel 9.1.1.1) musste an die Gegebenheiten der präparativen HPLC mit einer binären Pumpe angepasst werden.

Tabelle 9.7: Eluentenherstellung für die präparative HPLC-Methode

Eluent	Herstellung
A	ACN/MeOH-Mischung und Ammoniumformiat-Puffer pH 3,0 im Verhältnis 8:2 v/v
B	ACN/MeOH-Mischung und IPA im Verhältnis 8:2 v/v

Tabelle 9.8: Methodenparameter der präparativen HPLC-Methode

Parameter	Einstellung																		
Injektionsvolumen	variabel																		
Temperatur Autosampler	5 °C																		
Fluss	5,5 ml/min																		
Detektoreinstellungen	220 nm, 254 nm Bandweite 8 nm, Referenzwellenlänge 480 nm, Referenzbandweite 8 nm Spectrum range: 190-500 nm Spectrum step: 1 nm, Spectrum store: All in Peak, Spectrum threshold: 10 mAu																		
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>Anteil A [%]</th> <th>Anteil B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>34</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>65</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>67</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]	0	100	0	30	100	0	34	0	100	65	0	100	67	100	0
Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]																	
0	100	0																	
30	100	0																	
34	0	100																	
65	0	100																	
67	100	0																	
Fraction trigger mode	42-58min, jeweils 0,2min/Reagenzglas																		
Laufzeit	67 min																		

9.1.7.5 HPLC-MS-Methode für die Substanzidentifikation

Die ursprüngliche Methode (siehe Kapitel 9.1.1.1) wurde unter Beibehaltung der ursprünglichen Eluenten an die Gegebenheiten des HPLC-MS-Systems angepasst.

Tabelle 9.9: Methodenparameter der HPLC-MS-Methode zur Identifikation der Substanzstruktur

Parameter	Einstellung																																								
Injektionsvolumen	20 µl																																								
Temperatur Autosampler	4 °C																																								
Temperatur Säulenofen	40 °C																																								
DAD-Einstellungen	215 nm, 220 nm, 254 nm Bandweite 4 nm, Referenzwellenlänge 600 nm, Referenzbandweite 100 nm Spectrum range: 200-900 nm, Spectrum step: 2 nm, Spectrum store: All in peak, Spectrum threshold: 1 mAU																																								
MSD-Einstellungen	Signalaufzeichnung ab der 30. Minute Quelle: APCI SCAN-Modus: im positiven und negativen Modus, 100- 2000 m/z Fragmentor-Spannung: 200 V Trocknungsgas: 5,0 l/min, 325 °C Verneblerdruck: 60 psig Kapillarspannung: 4000 V Corona-Strom: positiv 4,0 µA, negativ 15 µA																																								
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit [min]</th> <th>Fluss [ml/min]</th> <th>Anteil B [%]</th> <th>Anteil C [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0,25</td> <td>52</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>0,25</td> <td>52</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0,25</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>0,30</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>0,30</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>48</td> <td>0,30</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>0,30</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>61</td> <td>0,30</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>62</td> <td>0,25</td> <td>52</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Anteil B [%]	Anteil C [%]	0	0,25	52	0	5	0,25	52	0	35	0,25	100	0	36	0,30	100	0	40	0,30	100	0	48	0,30	40	60	60	0,30	40	60	61	0,30	100	0	62	0,25	52	0
Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Anteil B [%]	Anteil C [%]																																						
0	0,25	52	0																																						
5	0,25	52	0																																						
35	0,25	100	0																																						
36	0,30	100	0																																						
40	0,30	100	0																																						
48	0,30	40	60																																						
60	0,30	40	60																																						
61	0,30	100	0																																						
62	0,25	52	0																																						

9.1.7.6 Flammen-AAS zur Bestimmung von Zink gemäß JP

Die nachfolgend beschriebene Methode wurde gemäß der Guideline ICH Q2 (R1) [61] validiert, die Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Kapitel 11.2.1 im Anhang).

Tabelle 9.10: Methodenparameter zur Bestimmung von Zink gemäß JP

Parameter	Einstellung
Element	Zink
Technik	Flamme
Wellenlänge	213,9 nm (Bandbreite 0,2 nm)
Untergrundkorrektur	D2
Messzeit	4,0 s
Flammentyp	Luft – C ₂ H ₂
Zerstäuber	4,0 s
Brennerhöhe	5,4 mm
Brenngasfluss	0,9 l/min
Kalibrierung	4-Punkt-Kalibrierung: Eine 1000 ppm Zink-Standard-Lösung wurde mit verd. Salpetersäure ¹ zu einer 1 ppm Zink-Standard-Lösung verdünnt. Von dieser wurden jeweils 1,0 – 1,5 – 2,5 – 3,5 ml mit verd. Salpetersäure ¹ zu 50 ml verdünnt (0,20 – 0,30 – 0,50 – 0,70 ppm Zink).
Probenpräparation	10 ml der nach JP hergestellten Prüflösung wurden mit verd. Salpetersäure ¹ zu 20 ml verdünnt.
Blank	10 ml der nach JP hergestellten Blank-Lösung wurden mit verd. Salpetersäure ¹ zu 20 ml verdünnt.

¹ 52,5 ml konzentrierte Salpetersäure wurden mit Wasser zu 500 ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden nochmals 334 ml mit Wasser zu 1000 ml verdünnt.

9.1.7.7 Flammen-AAS zur Bestimmung von Zink gemäß Ph. Eur., USP

Die nachfolgend beschriebene Methode wurde gemäß der Guideline ICH Q2 (R1) [61] validiert, die entsprechenden Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Kapitel 11.2.2).

Tabelle 9.11: Methodenparameter zur Bestimmung von Zink gemäß Ph. Eur., USP

Parameter	Einstellung
Element	Analog zu den Einstellungen in Tabelle 9.10
Technik	
Wellenlänge	
Untergrundkorrektur	
Messzeit	
Flammentyp	
Zerstäuber	
Brennerhöhe	
Brenngasfluss	1,0 l/min
Kalibrierung	4-Punkt-Kalibrierung: Eine 1000 ppm Zink-Standard-Lösung wurde mit 0,1 M Salzsäure ¹ zu einer 1 ppm Zink-Standard-Lösung verdünnt. Von dieser wurden jeweils 2,5 – 5,0 – 15 – 25 ml mit 0,1 M Salzsäure ¹ zu 50 ml verdünnt (0,05 – 0,10 – 0,30 – 0,50 ppm Zink)
Probenpräparation	5 ml der nach Ph. Eur. hergestellten Prüflösung wurden mit 0,1 M Salzsäure ¹ zu 50 ml verdünnt.
Blank	5 ml der nach Ph. Eur. hergestellten Blank-Lösung wurden mit 0,1 M Salzsäure ¹ zu 50 ml verdünnt.

¹ 20,64 g konzentrierte Salzsäure wurden mit Wasser zu 200 ml verdünnt, 50 ml von dieser Lösung wurden nochmals mit Wasser zu 500 ml verdünnt.

9.1.7.8 Flammen-AAS zur Bestimmung von Silikonöl

Tabelle 9.12: Methodenparameter zur Bestimmung von Silikonöl

Parameter	Einstellung
Element	Silicium
Technik	Flamme
Wellenlänge	251,6 nm (Bandbreite 0,5 nm)
Untergrundkorrektur	D2
Messzeit	2,0 s
Flammentyp	N ₂ O – C ₂ H ₂
Zerstäuber	2,0 s
Brennerhöhe	7,0 mm
Brenngasfluss	3,8 l/min

Kalibrierung	4-Punkt-Kalibrierung: 270 mg Silikonöl wurden mit MIBK zu 100 ml gelöst, wodurch sich eine Stammlösung mit 1020 ppm Silicium ergab. 1 ml Stammlösung wurden mit MIBK zu 100 ml verdünnt (10 ppm). Durch weitere Verdünnung wurden Standardlösungen mit 2 – 3 – 4 – 5 ppm Silicium hergestellt.
Probenpräparation	Jeweils 5 Gummistopfen des Typs CB1 wurden mit jeweils 50 ml IPA versetzt und für 1 h auf den Schüttler gestellt. Das IPA wurde dekantiert und die Gummistopfen nochmals mit 3 x 5 ml nachgespült und alle IPA-Phasen vereinigt. Die IPA-Phase wurde bis zur Trockne einrotiert und der Rückstand in 25 ml MIBK gelöst.
Blank	MIBK

9.1.7.9 Studie zur Proteinaggregation von Immunglobulin G (IgG)

9.1.7.9.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Um die Bildung von löslichen und unlöslichen Aggregaten von IgG in Gegenwart des Gummistopfenextrakts untersuchen zu können, wurde der in Tabelle 9.13 dargestellte Versuchsansatz gewählt.

Tabelle 9.13: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Aggregatbildung von IgG

Puffer	2,44 g Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat und 0,87 g Natriumdihydrogenphosphat wurden in 500 ml Wasser gelöst.
IgG-Stammlösung	Siehe Kapitel 9.1.4
IgG-Standardlösung	2 ml IgG-Stammlösung wurden mit Puffer zu 100 ml verdünnt (1,0 mg/ml).
Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung (aus unbehandelten Gummistopfen)	2 ml Gummistopfenextrakt (siehe Kapitel 4.6) und 2 ml ACN wurden miteinander gemischt. 2 ml dieser Lösung wurden unter leichtem Schwenken in 50 ml einer 0,1 % m/v PS20-Lösung hineingetropt.
Silikonöl-PS20-Lösung¹	2 ml Silikonölextrakt (siehe Kapitel 9.5) und 2 ml ACN wurden miteinander gemischt. 2 ml dieser Lösung wurden unter leichtem Schwenken in 50 ml einer 0,1 % m/v PS20-Lösung hineingetropt.
Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung (aus entfetteten Gummistopfen)²	Die Herstellung erfolgte analog zu der Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung aus unbehandelten Gummistopfen.
TOTM-PS20-Lösung	2 ml TOTM-Lsg. ³ wurden unter leichtem Schwenken in 50 ml einer 0,1 % m/v PS20-Lsg. hineingetropt.

Experimenteller Teil

ACN-PS20-Lösung	2 ml ACN wurden unter leichtem Schwenken in 50 ml einer 0,1 % m/v PS20-Lösung hineingetropt.
Kalibrierung	3-Punkt-Kalibrierung Durch weitere Verdünnung der IgG-Standardlösung mit Puffer wurden drei Standardlösungen mit den Konzentrationen 0,13 – 0,25 – 0,50 mg/ml hergestellt.
Probenpräparation	
Ansatz 1	20 ml der IgG-Standardlösung wurden mit 20 ml der Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung gemischt.
Ansatz 2	20 ml der IgG-Standardlösung wurden mit 20 ml der ACN-PS20-Lösung gemischt.
Ansatz 3	20 ml Puffer wurden mit 20 ml der Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung gemischt.
Ansatz 4	20 ml Puffer wurden mit 20 ml der ACN-PS20-Lösung gemischt.

¹ Die Gummistopfen CB1 und BB6 wurden gemäß Kapitel 9.5 entfettet, d. h. anhaftendes Silikonöl von den Gummistopfen entfernt und mit diesem der entsprechende Extrakt hergestellt.

² Die entfetteten Gummistopfen des Typs CB1 und BB6 bildeten die Grundlage für zwei weitere Versuchsreihen mit analogem Aufbau zu den Versuchsreihen mit den unbehandelten Gummistopfen.

³ Herstellung: 126,37 mg TOTM wurden in ACN gelöst und mit diesem zu 100 ml aufgefüllt.

Alle Versuchsansätze wurden gleichmäßig auf jeweils zwei gläserne Zentrifugengläser verteilt und anschließend für 130 min bei 60-64 °C im Trockenschrank inkubiert. Zu definierten Prüfzeitpunkten wurden Proben für die SEC-Messung und Trübungsmessung nach folgendem Schema entnommen:

Tabelle 9.14: Prüfschema mit Probeentnahme zu definierten Prüfzeitpunkten (X)

		Prüfzeitpunkt					
Versuchsansatz	Nullwert	30 min	50 min	70 min	90 min	110 min	130 min
1	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X
3	X	-	-	X	-	-	X
4	X	-	-	X	-	-	X
SEC-Messung	Die entnommene Probelösung wurde in jeweils drei HPLC-Vials filtriert und in einem Eisbad abgekühlt.						
Trübung	Es wurden jeweils 4 ml Probelösung entnommen und unfiltriert in einem Eisbad abgekühlt.						

9.1.7.9.2 Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von IgG

Die Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von IgG erfolgte in Anlehnung an die im Ph. Eur. beschriebene Methode [72].

Tabelle 9.15: Methodenparameter zur Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von IgG mittels SEC

Eluent	Herstellung
Puffer	4,87 g Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat, 1,74 g Natrium-dihydrogenphosphat Monohydrat und 11,69 g Natriumchlorid wurden in 1000 ml Wasser gelöst.
Parameter	Einstellung
Messsystem	HPLC-DAD-System 3
Injektionsvolumen	20 µl
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	Keine Temperaturkontrolle
Detektoreinstellungen	210 nm (Bandweite 8 nm, Referenzwellenlänge 360 nm, Referenzbandweite 100 nm) 280 nm (Bandweite 16 nm, Referenzwellenlänge 360 nm, Referenzbandweite 100 nm) 3D-Field: 190-800 nm Spectrum range: 190-400 nm, Spectrum step: 2 nm Spectrum store: All in Peak, Spectrum threshold: 1,0 mAU
Laufzeit	30 min

9.1.7.9.3 Photometrische Bestimmung der Trübung

Die Methode zur Detektion von unlöslichen Proteinaggregaten wurde von Eckhardt *et al.* [58] adaptiert. Hierfür wurden gemäß Ph. Eur. 2.2.1 *Klarheit und Opaleszenz von Flüssigkeiten* [78] die Referenzsuspensionen I-IV hergestellt und die Absorption von diesen zu Beginn jeder Messreihe photometrisch bei 350 nm als Doppelbestimmung in Mikroquarzküvetten gemessen. Diese Messung diente zur Überprüfung des photometrischen Systems und zur Abschätzung der Trübung der eigentlichen Probelösungen. Während jeder Versuchsreihe wurden von den Probelösungen zu definierten Prüfzeitpunkten jeweils 4 ml mit einer Glaspipette entnommen und unfiltriert als Doppelbestimmung analog zu den Referenzsuspensionen gemessen.

9.1.7.10 Studie zur Proteinaggregation von Erythropoietin (EPO)

9.1.7.10.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Tabelle 9.16: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Aggregatbildung von EPO

Puffer	1,15 g Natriummonohydrogenphosphat wasserfrei, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat und 23,4 g Natriumchlorid wurden in 1000 ml Wasser gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.
EPO-Standardlösung	Vier Vials Erythropoetin BRP wurden mit Puffer zu einer finalen Konzentration von 0,4 mg/ml gelöst.
Versuchsreihe 1 Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung (aus unbehandelten Gummistopfen)	2 ml Gummistopfenextrakt (siehe Kapitel 4.6) und 2 ml ACN wurden miteinander gemischt. 2 ml der Lösung wurden unter leichtem Schwenken in 50 ml einer 0,1 % m/v PS20-Lösung hineingetropt.
Versuchsreihe 2 Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung (aus unbehandelten Gummistopfen)	2 ml Gummistopfenextrakt (siehe Kapitel 4.6) und 2 ml ACN wurden miteinander gemischt. 2 ml der Lösung wurden unter leichtem Schwenken in 50 ml einer 1,0 % m/v PS20-Lösung hineingetropt.
Probenpräparation	
Ansatz 1	200 µl der EPO-Standardlösung wurden mit 200 µl der ACN-PS20-Lösung gemischt.
Ansatz 2	200 µl der EPO-Standardlösung wurden mit 200 µl der Gummistopfenextrakt-PS20-Lösung gemischt.
Ansatz 3	200 µl der EPO-Standardlösung wurden mit 200 µl Puffer gemischt.

Alle Versuchsansätze wurden gleichmäßig auf jeweils drei Mikrovials verteilt, wobei drei der Mikrovials als Nullwert direkt analysiert wurden. Die restlichen Mikrovials wurden bei 55 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach vier Tagen und acht Tagen wurden jeweils drei Mikrovials entnommen und entweder direkt analysiert oder im Kühlschrank bei 2-8 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Probevolumens wurde auf die photometrische Bestimmung der Trübung verzichtet und nur die Molekülgrößenverteilung mittels SEC-Chromatographie untersucht.

9.1.7.10.2 Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von EPO

Die Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von EPO erfolgt in Anlehnung an die im Ph. Eur. beschriebene Methode [79].

Tabelle 9.17: Methodenparameter zur Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von EPO mittels SEC

Eluent	Herstellung
Puffer	1,15 g Natriummonohydrogenphosphat wasserfrei, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat und 23,4 g Natriumchlorid wurden in 1000 ml Wasser gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.
Parameter	Einstellung
Messsystem	HPLC-DAD-System 3
Injektionsvolumen	50 µl
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	Keine Temperaturkontrolle
Detektoreinstellungen	214 nm (Bandweite 4 nm, Referenzwellenlänge 360 nm, Referenzbandweite 100 nm) 3D-Field: 190-800 nm Spectrum range: 190-400 nm, Spectrum step: 2 nm Spectrum store: All in Peak, Spectrum threshold: 1,0 mAU
Laufzeit	60 min

9.2 Aufnahme der Extraktionsprofile der verschiedenen Gummistopfen

Tabelle 9.18: Probenaufarbeitung für die Aufnahme der Extraktionsprofile der Gummistopfen

Verwendete Gummistopfen	CB1, CB2, CB3, BB1, BB2, BB3, BB4, BB6
Extraktionsmittel	IPA, Wasser
Extraktionsbedingungen	Es wurde jeweils ein Gummistopfen in 20 ml des Extraktionsmittels für 3 h unter reflux-Bedingungen in einem Erlenmeyerkolben mit Rührfisch extrahiert. Es wurde pro Gummistopfen eine Dreifachbestimmung durchgeführt.
Probenpräparation	Der Extrakt wurde 2 x mit jeweils 1 ml des Extraktionsmittels nachgespült und in ein Zentrifugenglas überführt und in einem Vakuumkonzentrator bei 2000 rpm (für IPA bei 40 °C, für Wasser bei 50 °C) bis zur Trockne eingengt.

Experimenteller Teil

	Der Rückstand wurde in 5 ml IPA aufgenommen und für 2 min im Ultraschallbad gelöst.
Aufarbeitung der Proben für die HPLC-Analyse	
1 – IS 1	25 mg Pyren wurden mit IPA zu 100 ml verdünnt und für 5 min im Ultraschallbad gelöst (0,25 mg/ml).
2 – IS 2	1 ml von IS 1 wurde mit IPA zu 50 ml verdünnt (0,005 mg/ml).
Probenpräparation	Die Probe wurde über einen 0,45 µm PET Filter in ein Becherglas filtriert. Es wurden jeweils 250 µl von IS 1 und 2 vorgelegt und mit Probe zu 1 ml aufgefüllt. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Zusatz von internem Standard für die HPLC-Analyse vorbereitet.

Für den Gummistopfen CB1 wurden zusätzlich die Extraktionsprofile bei 1 h (Dreifachbestimmung) und 6 h (Doppelbestimmung) Extraktion in IPA aufgenommen.

Als Leerwert wurden 20 ml IPA für drei Stunden unter reflux-Bedingungen in einem Erlenmeyerkolben mit Rührfisch erhitzt. Die anschließende Probenpräparation erfolgte analog zu den Gummistopfenproben.

9.3 Berechnung der Responsefaktoren von Pyren und TOTM

Für die Aufnahme der Extraktionsprofile, der Extraktionsstudien – sowohl unter forcierten Lagerbedingungen als auch unter reflux-Bedingungen – und der Interaktionsstudien wurde Pyren als interner und externer Standard im Rahmen der Probenpräparation eingesetzt und zur Quantifizierung verwendet. Nachdem die *Extractables* 6-9 als Vertreter der Substanzklasse der Trimellitate identifiziert worden waren, wurde die Konzentration an *Extractables* nachträglich umgerechnet und ausgedrückt als TOTM. Hierfür wurden in einer Untersuchung die Responsefaktoren von Pyren und TOTM bei verschiedenen eingesetzten Konzentrationen in IPA und den beiden zur Auswertung verwendeten Wellenlängen 220 und 254 nm berechnet, um mit diesen die Umrechnung der ursprünglich erhaltenen Ergebnisse vornehmen zu können.

Tabelle 9.19: Ergebnisse der Ermittlung der Responsefaktoren bei 0,01 mg/ml

Eingesetzte Konzentration von Pyren und TOTM: 0,01 mg/ml				
220 nm	Fläche _{Pyren} [FE]	Fläche _{TOTM} [FE]	Fläche _{Pyren} /c _{Pyren}	Fläche _{TOTM} /c _{TOTM}
Probe 1 Inj. 1	22,434	8,969	2217,89	832,39
Probe 1 Inj. 2	22,901	9,322	2264,06	865,15
Probe 2 Inj. 1	23,210	8,816	2295,18	836,63
Probe 2 Inj. 2	23,488	8,884	2322,67	843,08
254 nm	Fläche _{Pyren} [FE]	Fläche _{TOTM} [FE]	Fläche _{Pyren} /c _{Pyren}	Fläche _{TOTM} /c _{TOTM}
Probe 1 Inj. 1	20,355	3,467	2012,36	321,76
Probe 1 Inj. 2	20,800	3,593	2056,35	333,46
Probe 2 Inj. 1	21,165	3,364	2092,95	319,24
Probe 2 Inj. 2	21,344	3,409	2110,66	323,51

Tabelle 9.20: Ergebnisse der Ermittlung der Responsefaktoren bei 0,005 mg/ml

Eingesetzte Konzentration von Pyren und TOTM: 0,005 mg/ml				
220 nm	Fläche _{Pyren} [FE]	Fläche _{TOTM} [FE]	Fläche _{Pyren} /c _{Pyren}	Fläche _{TOTM} /c _{TOTM}
Probe 1 Inj. 1	11,057	4,915	2186,26	912,30
Probe 1 Inj. 2	11,148	4,904	2204,25	910,26
Probe 2 Inj. 1	11,553	4,462	2284,89	846,88
Probe 2 Inj. 2	11,613	4,482	2296,76	850,68
254 nm	Fläche _{Pyren} [FE]	Fläche _{TOTM} [FE]	Fläche _{Pyren} /c _{Pyren}	Fläche _{TOTM} /c _{TOTM}
Probe 1 Inj. 1	10,146	1,870	2006,13	347,10
Probe 1 Inj. 2	10,180	1,865	2012,85	346,17
Probe 2 Inj. 1	10,537	1,664	2083,96	315,82
Probe 2 Inj. 2	10,627	1,713	2101,76	325,12

Der ermittelte Responsefaktor war unabhängig von der eingesetzten Konzentration, jedoch abhängig von der Wellenlänge. Bei 254 nm ergab sich ein Responsefaktor von 6,26 während bei der Wellenlänge 220 nm der Responsefaktor 2,62 resultierte. Lag demnach bei der Auswertung das Peakverhältnis Fläche_{Extractable}/Fläche_{Pyren} vor, wurde dieses entsprechend

mit 6,26 bzw. 2,62 multipliziert, um das finale Ergebnis als *Konzentration Extractable ausgedrückt als Trimellitat* angeben zu können.

9.4 Strukturaufklärung der Extractables 6-9

Von den aus dem Gummistopfen CB1 extrahierten Substanzen wurden die *Extractables* 6-9 strukturell identifiziert. Hierfür waren die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte notwendig.

9.4.1 Gewinnung des Gummistopfenextrakts

10 CB1-Gummistopfen wurden in 200 ml IPA für sechs Stunden unter Reflux-Bedingungen erhitzt. Diese Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 100 ml IPA aufgenommen und gelöst.

9.4.2 Auftrennung und Aufreinigung des Gummistopfenextrakts

Die Auftrennung und Aufreinigung des Gummistopfenextrakts erfolgte mittels präparativem HPLC-DAD-System unter Verwendung der in Kapitel 9.1.1.2 beschriebenen Methode. Die aufgefangenen Fraktionen wurden anhand der Retentionszeiten den *Extractables* 6-9 zugeordnet und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt.

9.4.3 Aufnahme der NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden im NMR-Labor der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn aufgenommen (Pharmazeutisches Institut, An der Immenburg 4, 53121 Bonn, Gerät Avance 500 von Bruker Corporation).

9.4.4 Aufnahme der MS-Spektren

Die MS-Spektren wurden mit dem HPLC-DAD-MSD-System unter Verwendung der in Kapitel 9.1.1.3 beschriebenen Methode erzeugt. Die MS-Spektren wurden direkt mit dem Gummistopfen-Extrakt vor der Auftrennung und Aufreinigung aufgenommen.

9.5 Herstellung des Gummistopfenextrakts

10 Gummistopfen (unzerschnitten) des Typs CB1 bzw. BB6 wurden in 100 ml IPA unter Reflux-Bedingungen für sechs Stunden in einem Erlenmeyerkolben mit Rührfisch erhitzt. Der Extrakt wurde in einen geeigneten Kolben überführt, wobei der Erlenmeyerkolben noch mit 2 x 1 ml IPA ausgespült wurde, und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde anschließend in 20 ml ACN gelöst und in dieser Form bei 2-8 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Analog wurde ein möglicher Einfluss von an den Gummistopfen anhaftendem Silikonöl untersucht, indem die für die Herstellung des Gummistopfenextrakts verwendeten Gummistopfen im Vorfeld entfettet und damit das anhaftende Silikonöl entfernt wurde. Hierzu wurden die 10 Gummistopfen mit 100 ml IPA bedeckt und für 1 h auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde das IPA dekantiert und die Stopfen nochmals mit 3 x 5 ml IPA nachgespült. Alle IPA-Phasen wurden vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 20 ml ACN gelöst und in einer eigenen Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses von Silikonöl auf die Proteinaggregation verwendet (siehe Kapitel 11.8 im Anhang). Mit den entfetteten Gummistopfen wurde wie eingangs beschrieben der entsprechende Gummistopfenextrakt hergestellt.

10 Literaturverzeichnis

- [1] "Container closure systems for packaging human drugs and biologics," *Guidance for Industry, FDA*, 1999.
- [2] "Assessment of extractables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems," in *USP 42 - NF 37 <1663>*, effective date 01.11.2018.
- [3] "Assessment of drug product leachables associated with pharmaceutical packaging / delivery systems," in *USP 42 - NF 37 <1664>*, effective date 01.11.2018.
- [4] "Materials and containers," in *Ph. Eur. 3, Supplement 9.6*, effective date 01.01.2019.
- [5] "EU risk assessment report bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)," European Chemicals Bureau, 2008.
- [6] „Rubber closures for containers for aqueous parenteral preparations, for powders and for freeze-dried powders,“ in *Ph. Eur. 3.2.9, Supplement 9.5*, effective date 01.07.2018.
- [7] M. Schäfer, „Darstellung hochmolekularer und verzweigter Isobutene durch Einsatz von Makroinitiatoren, cyclischen Dienen und Initiatormonomeren“, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Technische Universität München, München, 2002.
- [8] E. J. Smith, "Elastomeric components for the pharmaceutical industry," in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, (2002) 1050-1065.
- [9] G. A. Sacha, W. Saffell-Clemmer, K. Abram and M. J. Akers, "Practical fundamentals of glass, rubber, and plastic sterile packaging systems," *Pharm Dev Technol.*, 15 (1) (2010) 6-34.
- [10] "Rubber closures for containers for aqueous parenteral preparations, for powders and freeze-dried powders," in *Ph. Eur. 3.2.9, Edition 10*, effective date 01.07.2019.
- [11] "Elastomeric closures for injections," in *USP 42 - NF 37 <381>*, effective date 01.11.2018.
- [12] "Test for rubber closure for aqueous infusions," in *JP 7.03, Edition 17*, effective date 01.04.2016.
- [13] J. B. Haverkamp, „Bisphenol A und Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE) als Extractables / Leachables aus Aluminiumtuben für den pharmazeutischen Gebrauch,“ Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 2010.
- [14] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

- [15] R. Franz und A. Störmer, Migration of plastic constituents. In plastic packaging: interactions with foods and pharmaceuticals, Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
- [16] G. R. Doyle und J. A. McCutcheon, in *Clinical procedures for safer patient care*, British Columbia Institute of Technology (BCIT).
- [17] "Guideline on plastic immediate packaging materials," *EMA*, 2005.
- [18] "ICH Topic Q 1 A (R2) Stability testing of new drug substances and products," *EMA*, 2003.
- [19] „ICH Topic Q5C Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological / biological products,“ *EMA*, 1996.
- [20] D. Jenke, Compatibility of pharmaceutical products and contact materials: safety considerations associated with extractables and leachables, John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [21] A. Seidl, O. Hainzl, M. Richter, R. Fischer, S. Böhm, B. Deutel, M. Hartinger, J. Windisch, N. Casadevall, G. M. London and I. Macdougall, "Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity," *Pharm Res*, 29 (2012) 1454-1467.
- [22] D. Jenke, "Extractable substances from plastic materials used in solution contact applications: an updated review," *PDA J Pharm Sci and Tech*, 60 (2006) 191-207.
- [23] E. Van Vliet, E. Reitano, J. Chhabra, G. Bergen and R. Whyatt, "A review of alternatives to di(2-ethylhexyl)phtalate-containing medical devices in the neonatal intensive care unit," *J Perinatol*, 31 (8) (2011) 551-560.
- [24] N. Li, B. Osborne, S. K. Singh and W. Wang, "Metal-leachate-induced conjugate protein instability," *J Pharm Sci*, 101 (8) (2012) 2733-2743.
- [25] M. Huang, T. S. Horwitz, C. Zweiben and S. K. Singh, "Impact of extractables/leachables from filters on stability of protein formulations," *J Pharm Sci*, 100 (11) (2011) 4617-4630.
- [26] K. Boven, S. Stryker, J. Knight, A. Thomas, M. v. Regenmortel, D. M. Kemeny, D. Power, J. Rossert and N. Casadevall, "The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes," *Kidney Int.*, 67 (6) (2005) 2346-2353.
- [27] J. Lücke, M. Bädeker und M. Hildinger, *Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2021*, The Boston Consulting Group GmbH, 2021.
- [28] V. Arzbach, „Boom der Biopharmazeutika,“ *PTA-Forum*, 02 (2016).

- [29] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl and D. P. Clark, Brock biology of microorganisms, San Francisco: Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2012.
- [30] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne and D. S. Katayama, "Stability of protein pharmaceuticals: an update," *Pharm. Res.*, 27 (4) (2010) 544-574.
- [31] J. L. Cleland, M. F. Powell and S. J. Shire, "The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation," *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 10 (4) (1993) 307-377.
- [32] M. J. Akers and M. R. DeFelippis, "Peptides and proteins as parenteral solutions," in *Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins*, Boca Raton, Taylor & Francis Group, LLC, 2013.
- [33] B. A. Kerwin, "Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways," *J Pharm Sci*, 97 (8) (2008) 2924-2935.
- [34] L. Wan and P. Lee, "CMC of polysorbate," *J Pharm Sci*, 63 (1974) 136-137.
- [35] T. A. Kahn, H.-C. Mahler and R. S. K. Kishore, "Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: A review," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 97 (2015) 60-67.
- [36] N. B. Bam, J. L. Cleland, J. Yang, M. C. Manning, J. F. Carpenter, R. F. Kelley and T. W. Randolph, "Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions," *J. Pharm. Sci.*, 87 (12) (1998) 1554-1559.
- [37] A. P. Villalobos, S. R. Gunturi and G. Heavner, "Interaction of polysorbate 80 with erythropoietin: a case study in protein-surfactant interactions," *Pharm. Res.*, 22 (7) (2005) 1186-1194.
- [38] V. M. Knepp, J. L. Whatley, A. Muchnik and T. Calderwood, "Identification of antioxidants for prevention of peroxide-mediated oxidation of recombinant human ciliary neurotrophic factor and recombinant human nerve growth factor," *PDA J Sci Pharm Technol*, 50 (3) (1996) 163-171.
- [39] C. J. Roberts, "Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control," *Trends Biotechnol*, 32 (7) (2014) 372-380.
- [40] J. S. Philo and T. Arakawa, "Mechanisms of protein aggregation," *Curr Pharm Biotechnol*, 10 (4) (2009) 348-351.
- [41] S. Kiese, A. Pappenberger, W. Friess and H.-C. Mahler, "Shaken, not stirred:

- mechanical stress testing of an IgG1 antibody," *J Pharm Sci*, 97 (10) (2008) 4347-4365.
- [42] K. Ratanji, J. Derrick, R. Dearman and I. Kimber, "Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation," *J Immunotoxicol*, 11(2) (2014) 99-109.
- [43] N. Wöffen, „Untersuchung der in vitro Modulation immunkompetenter Zellen zur präklinischen Bestimmung des immunogenen Potenzials von Biologika,“ Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2018.
- [44] A. Kuriakose, N. Chirmule and P. Nair, "Immunogenicity of biotherapeutics: causes and association with posttranslational modifications," *J Immunol Res*, (2016).
- [45] A. Fradkin, J. Carpenter and T. Randolph, "Immunogenicity of aggregates of recombinant human growth hormone in mouse models," *J Pharm Sci*, 98 (9) (2009) 3247-3264.
- [46] D. Pisal, M. Kosloski, C. Middaugh, R. Bankert and S. Balu-Iyer, "Native-like aggregates of factor VIII are immunogenic in von Willebrand factor deficient and hemophilia A mice," *J Pharm Sci*, 101 (6) (2012) 2055-2065.
- [47] B. Sharma, F. Bader, T. Templeman, P. List, M. Ryan and G. A. Heavner, "Technical investigations into the cause of the increased incidence of antibody-mediated pure red cell aplasia associated with EPREX," *Eur J Hosp Pharm Sci Pract*, 5 (2004) 86-91.
- [48] S. Hermeling, H. Schellekens, D. Crommelin and W. Jiskoot, "Micelle-associated protein in Epoetin formulations: a risk factor for immunogenicity?," *Pharm Res*, 20 (2003) 1903-1907.
- [49] H. Schellekens and W. Jiskoot, "Erythropoietin-associated PRCA: still an unsolved mystery," *J Immunotoxicol*, 3 (3) (2006) 123-130.
- [50] G. Vidarsson, G. Dekkers and T. Rispen, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions," *Front Immunol*, 5 (520) (2014) 1-17.
- [51] A. W. Vermeer, W. Norde and A. van Amerongen, "The unfolding/denaturation of immunoglobulin of isotype 2b and its F(ab) and F(c) fragments," *Biophys J*, 79 (4) (2000) 2150-2154.
- [52] E. Sahin, A. O. Grillo, M. D. Perkins and C. J. Roberts, "Comparative effects of pH and ionic strength on protein-protein interactions, unfolding, and aggregation for IgG1 antibodies," *J Pharm Sci*, 99 (12) (2010) 4830-4848.
- [53] H. Neye, „Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel,“ *Pharmazeutische Zeitung*,

- Ausgabe 43 (2006) (Online, 23.10.2006).
- [54] N. Schöffel, „Erythropoietin: Qualitative und quantitative Analyse nach szientometrischen Gesichtspunkten,“ Dissertation, Institut für Arbeitsmedizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, 2011).
- [55] K.-U. Eckhardt, „Eythropoietin: Karriere eines Hormons,“ *Deutsches Ärzteblatt*, 95 (5) (1996) 285-290.
- [56] T. Arakawa, J. S. Philo and Y. Kita, "Kinetic and thermodynamic analysis of thermal unfolding of recombinant erythropoietin," *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (6) (2001) 1321-1327.
- [57] Y. Endo, H. Nagai, Y. Watanabe, K. Ochi and T. Tagagi, "Heat-induced aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and deglycosylated states as monitored by gel permeation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique," *J Biochem*, 112 (5) (1992) 700-706.
- [58] B. M. Eckhardt, J. Q. Oeswein and T. A. Bewley, "Effect of freezing on aggregation of human growth hormone," *Pharm. Res.*, 8 (11) (1991) 1360-1364.
- [59] „Metered dose inhaler (MDI) and dry powder inhaler (DPI) drug products (Draft),“ *Guidance for Industry, FDA*, 1998.
- [60] "Nasal spray and inhalation solution, suspension, and spray drug products," *Guidance for Industry, FDA*, 2002.
- [61] "ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology," *EMA*, November 2005.
- [62] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh, in *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2002.
- [63] D. L. Norwood, D. Paskiet, M. Ruberto, T. Feinberg, A. Schroeder, G. Poochikian, Q. Wang, T. J. Deng, F. DeGrazio, M. K. Munos and L. M. Nagao, "Best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products: An overview of the PQRI recommendations," *Pharm. Res.*, 25 (4) (2008) 727-739.
- [64] Department of Environmental Health, University of Cincinnati, Risk Science Center, „Toxicity review for trioctyltrimellitate (TOTM),“ August 8, 2018.
- [65] D. Jenke, M. Poss, J. Story, A. Odufu, D. Zietlow und T. Tsilipetros, „Development and validation of chromatographic methods for the identification and quantitation of organic compounds leached from laminated polyolefin material,“ *J Chromatogr Sci*, 42 (2004)

- 388-395.
- [66] R. Ito, N. Miura, H. Iguchi, H. Nakamura, M. Ushiro, N. Wakui, K. Nakahashi, Y. Iwasaki, K. Saito, T. Suzuki and H. Nakazawa, "Determination of tris(2-ethylhexyl)trimellitate released from PVC tube by LC-MS/MS," *Int. J. Pharm.*, 360 (2008) 91-95.
- [67] "EU risk assessment report dibutyl phtalate (DBP)," European Chemicals Bureau, 2004.
- [68] "EU risk assessment report benzyl butyl phtalate (BBP)," European Chemicals Bureau, 2007.
- [69] "The safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update)," Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks, 2015.
- [70] W. Schlocker, „<https://www.pschyrembel.de/Polysorbate/H0BKP>,” 04.2016. [Online].
- [71] D. Decou, H. Schmidt, L. Stockmeier, X. Yu, S. Zdravkovic, D. Rude, R. Piccoli, X. Ding and D. Wood, "A study of leachables for biopharmaceutical formulations stored in rubber-stoppered glass vials," *Biopharm. Int.*, 23 (2010) 26-36.
- [72] "Human normal immunoglobulin," in *Ph. Eur. 0338, Edition 6, effective date 01.01.2008*.
- [73] K. A. Britt, D. K. Schwartz, C. Wurth, H. C. Mahler, J. F. Carpenter and T. W. Randolph, "Excipient effects on humanized monoclonal antibody interactions with silicone oil emulsions," *J. Pharm. Sci.*, 101 (12) (2012) 4419-4432.
- [74] L. S. Jones, A. Kaufmann and C. R. Middaugh, "Silicone oil induced aggregation of proteins," *J. Pharm. Sci.*, 94 (4) (2005) 918-927.
- [75] A. W. P. Vermeer and W. Norde, "The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein," *Biophys. J.*, 78 (2000) 394-404.
- [76] A. Fincke, J. Winter, T. Bunte and C. Olbrich, "Thermally induced degradation pathways of three different antibody-based drug development candidates," *Eur. J. Pharm. Sci.*, 62 (2014) 148-160.
- [77] N. K. Andrikopoulos, H. Brueschweiler, H. Felber and C. Taeschler, "HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols, and triglycerides," *JAOCS*, 68 (6) (1991) 359-364.
- [78] "Clarity and degree of opalescence of liquids," in *Ph. Eur. 2.2.1, Edition 6, effective date 01.01.2008*.
- [79] "Erythropoietin concentrated solution," in *Ph. Eur. 1316, Edition 6, effective date 01.01.2008*.

11 Anhang

11.1 Daten zur Validierung der HPLC-Methode

11.1.1 Probenpräparation und Ergebnisse der Linearität

Für den Gummistopfenextrakt wurden 5 CB1-Gummistopfen 6 h in 100 ml IPA refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 25 ml IPA gelöst und filtriert. Dann wurden 2 ml einer Pyren-Standardlösung (0,037 mg/ml in IPA) mit dem filtrierten Extrakt zu 20 ml verdünnt. Die resultierende Probe entsprach dem 100 %-Konzentrationsniveau. Aus dieser Probe wurden durch Verdünnung mit IPA vier weitere Proben mit 20, 40, 60 und 80 % der ursprünglichen Konzentration hergestellt. Beispielhafte Chromatogramme der Probe auf 100 %-Level auf beiden HPLC-DAD Systemen sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

Tabelle 11.1: Bestimmung der Linearität bei 220 nm auf den HPLC-DAD Systemen 1 und 2. Für die *Extractables* (E) 1-9 wurden für beide HPLC-Systeme der jeweilige Korrelationskoeffizient R, die Steigung m und der y-Achsenabschnitt b berechnet. Da die Peakflächen von den beiden HPLC-DAD-Systemen in unterschiedlichen Größenordnungen ausgegeben werden, sind die Ergebnisse für HPLC-DAD-System 1 mit drei Nachkommastellen und für HPLC-DAD-System 2 mit einer Nachkommastelle dargestellt.

E	HPLC-DAD System 1			HPLC-DAD System 2		
	m	b	R	m	b	R
1	4,742	0,050 (4,784) ¹	0,9997	294,9	4,0 (298,9) ¹	0,9999
2	13,825	0,057 (13,872) ¹	0,9996	778,8	16,0 (795,0) ¹	0,9999
3	11,070	0,081 (11,134) ¹	0,9997	654,9	8,4 (663,2) ¹	0,9998
4	45,336	0,512 (45,787) ¹	0,9998	2842,1	50,8 (2895,2) ¹	0,9999
5	52,453	0,414 (52,868) ¹	0,9997	3079,7	76,4 (3152,3) ¹	1,0000
6	125,951	1,690 (127,310) ¹	0,9997	7944,4	213,4 (8127,9) ¹	0,9999
7	344,246	11,585 (352,515) ¹	0,9993	14274,7	2960,4 (16585,9)^{1,2}	0,9906
8	327,064	16,634 (337,119) ¹	0,9980	12268,6	3382,7 (14994,8)^{1,2}	0,9860
9	125,352	2,033 (126,806) ¹	0,9996	7126,8	566,0 (7552,2)^{1,2}	0,9986

¹ Die Werte in Klammern stellen für jedes *Extractable* seine jeweilige mittlere Peakfläche in der Probe auf 100 %-Level dar. Dieser Wert war notwendig, um zu prüfen, inwiefern der resultierende y-Achsenabschnitt der gewählten Bedingung entsprach (< 5 % der mittleren Peakfläche in der Probe auf 100 %-Level).

² für *Extractable* 7 (17,8 %), *Extractable* 8 (22,6 %) und *Extractable* 9 (7,4 %) entsprach der y-Achsenabschnitt nicht der gewählten Bedingung.

Tabelle 11.2: Bestimmung der Linearität bei 254 nm auf den HPLC-DAD Systemen 1 und 2. Für die *Extractables* (E) 6-9 wurden für beide HPLC-Systeme der jeweilige Korrelationskoeffizient R, die Steigung m und der y-Achsenabschnitt b berechnet. Da die Peakflächen von den beiden HPLC-DAD-Systemen in unterschiedlichen Größenordnungen ausgegeben werden, sind die Ergebnisse für HPLC-DAD-System 1 mit drei Nachkommastellen und für HPLC-DAD-System 2 mit einer Nachkommastelle dargestellt.

E	HPLC-DAD System 1			HPLC-DAD System 2		
	m	b	R	m	b	R
6	48,597	0,574 (49,058) ¹	0,9997	3161,0	41,7 (3202,5) ¹	0,9999
7	140,070	2,317 (142,028) ¹	0,9997	9110,1	247,8 (9327,6) ¹	0,9999
8	140,245	2,381 (142,220) ¹	0,9997	9016,3	300,4 (9261,4) ¹	0,9999
9	49,416	0,623 (49,859) ¹	0,9997	3256,7	68,0 (3324,3) ¹	0,9999

¹ Die Werte in Klammern stellen für jedes *Extractable* seine jeweilige mittlere Peakfläche in der Probe auf 100 %-Level dar. Dieser Wert war notwendig, um zu prüfen, inwiefern der resultierende y-Achsenabschnitt der gewählten Bedingung entsprach (< 5 % der mittleren Peakfläche in der Probe auf 100 %-Level).

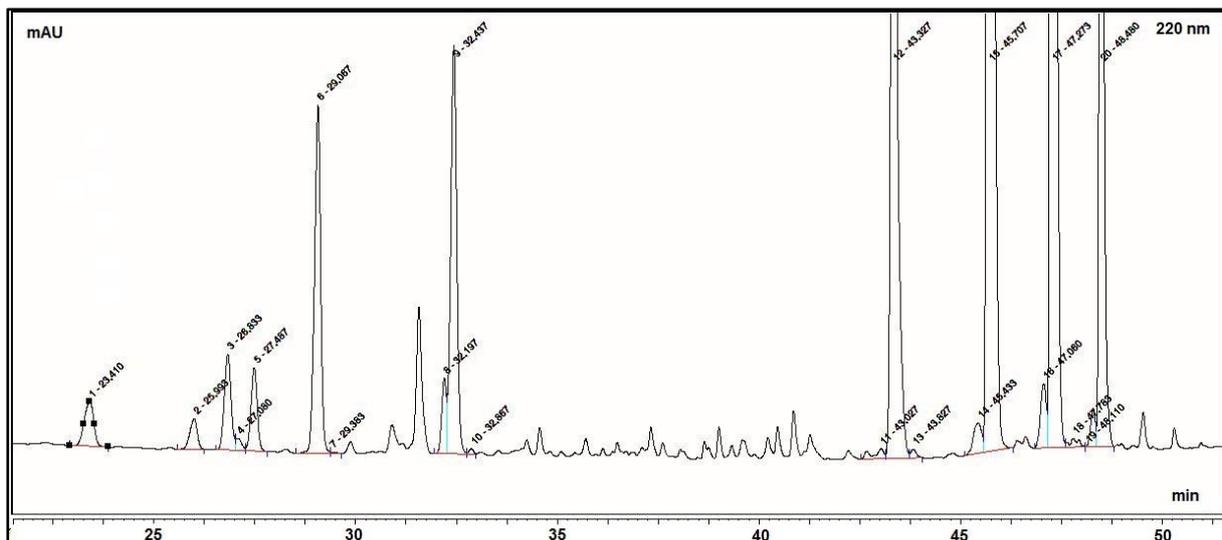


Abbildung 11.1: Chromatogramm der Probe auf 100 %-Level, HPLC-DAD System 1, 220 nm

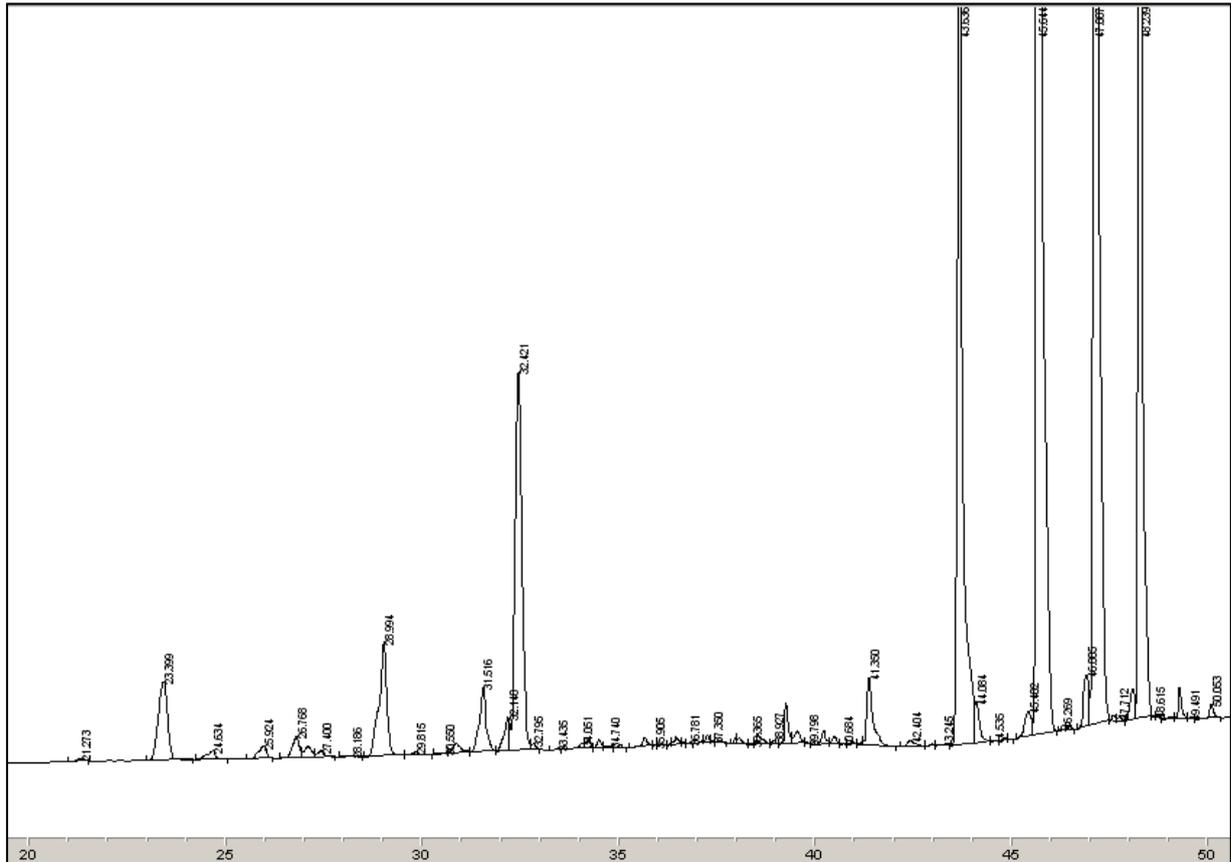


Abbildung 11.4: Chromatogramm der Probe auf 100 %-Level, HPLC-DAD System 2, 254 nm

Tabelle 11.3: Berechnung des Anlagen-Korrekturfaktors. Für diesen wurde lediglich mit den Ergebnissen der *Extractables* 6-9 gearbeitet, da diese aufgrund ihrer höheren Intensität besser auswertbar waren und eine niedrigere Standardabweichung (SD) aufwiesen

<i>Extractable</i>	HPLC-System 1 Fläche _{Substanz} /Fläche _{Pyren}	HPLC-System 2 Fläche _{Substanz} /Fläche _{Pyren}	System 1/System 2 [%]
1 (220 nm)	0,520 (SD: 0,002)	0,636 (SD: 0,012)	81,79
2 (220 nm)	1,496 (SD: 0,019)	1,707 (SD: 0,053)	87,65
3 (220 nm)	1,206 (SD: 0,012)	1,413 (SD: 0,036)	85,34
4 (220 nm)	4,983 (SD: 0,010)	6,192 (SD: 0,156)	80,48
5 (220 nm)	5,722 (SD: 0,041)	6,805 (SD: 0,213)	84,09
6 (254 nm)	6,039 (SD: 0,020)	6,689 (SD: 0,054)	90,27
7 (254 nm)	17,583 (SD: 0,150)	19,838 (SD: 0,311)	88,63
8 (254 nm)	17,617 (SD: 0,148)	19,870 (SD: 0,413)	88,66
9 (254 nm)	6,149 (SD: 0,018)	7,005 (SD: 0,084)	87,78
Mittelwert <i>Extractables</i> 6-9			88,84
Korrekturfaktor Anlage			1,126

11.1.2 Robustheit

Tabelle 11.4: Robustheit – Variation der Flussgeschwindigkeit um $\pm 5\%$

Zeit [min]	Fluss original [ml/min]	niedriger Fluss [ml/min]	hoher Fluss [ml/min]
0	0,5	0,475	0,525
5	0,5	0,475	0,525
35	0,5	0,475	0,525
36	0,6	0,575	0,625
40	0,6	0,575	0,625
48	0,6	0,575	0,625
55	0,6	0,575	0,625
56	0,6	0,575	0,625
60	0,5	0,475	0,525

Tabelle 11.5: Robustheit – Variation der Zusammensetzung von Eluent B. Eluent B enthielt standardmäßig 60 % Acetonitril (ACN) und 40 % Methanol (MeOH) unter Zugabe von 400 μl Ameisensäure (AS) pro Liter. Zur Prüfung der Robustheit wurde der Anteil an ACN um $\pm 2\%$ variiert.

Typ	Zusammensetzung
Eluent B unter Standardbedingungen	600 ml ACN + 400 ml MeOH + 400 μl AS
Eluent B1	620 ml ACN + 380 ml MeOH + 400 μl AS
Eluent B2	580 ml ACN + 420 ml MeOH + 400 μl AS

Tabelle 11.6: Robustheit – Variation des Gradienten

Standardgradient	Gradient 1	Gradient 2			
Zeit [min]	Zeit [min]	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	Anteil B [%]	Anteil C [%]
0	0	0	0,5	52	0
5	5	5	0,5	52	0
35	40	30	0,5	100	0
36	41	31	0,6	100	0
40	45	35	0,6	100	0
48	53	43	0,6	40	60
55	60	50	0,6	40	60
56	61	51	0,6	100	0
60	65	55	0,5	52	0

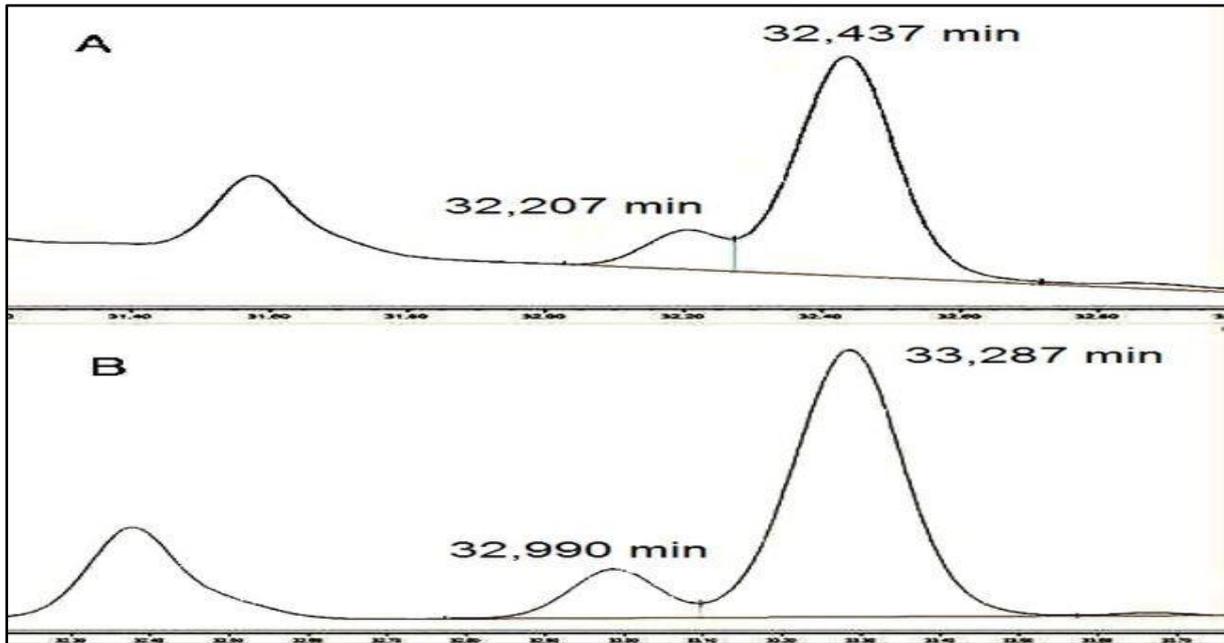


Abbildung 11.5: Robustheit bei Variation des pH-Wertes des Puffers der mobilen Phase. A – Chromatogrammausschnitt mit Puffer pH 2,5: *Extractable 5* (RT = 32,437 min) kann von dem vorgelagerten Peak (RT = 32,207 min) durch die Funktion *split peak* abgetrennt werden. B - Chromatogrammausschnitt mit Puffer pH 3,5: *Extractable 5* (RT = 33,287 min) kann von dem vorgelagerten Peak (RT = 32,990 min) durch die Funktion *split peak* abgetrennt werden.

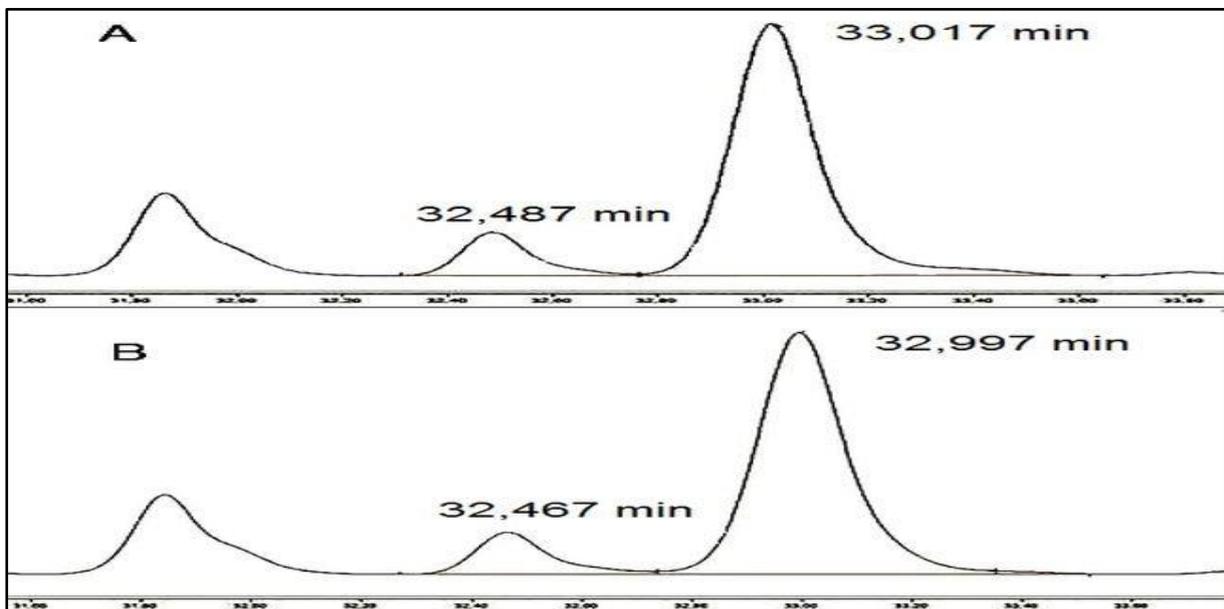


Abbildung 11.6: Robustheit – Variation der Ameisensäure. A – Chromatogrammausschnitt aus mit variiertes Phase C (+ 200 µl): Der vorgelagerte Peak ist klar abgetrennt mit RT = 32,487 min von *Extractable 5* (RT = 33,017 min). B – Chromatogrammausschnitt mit variiertes Phase C (- 100 µl): Der vorgelagerte Peak mit RT = 32,467 min ist klar abgetrennt von *Extractable 5* (RT = 32,997 min).

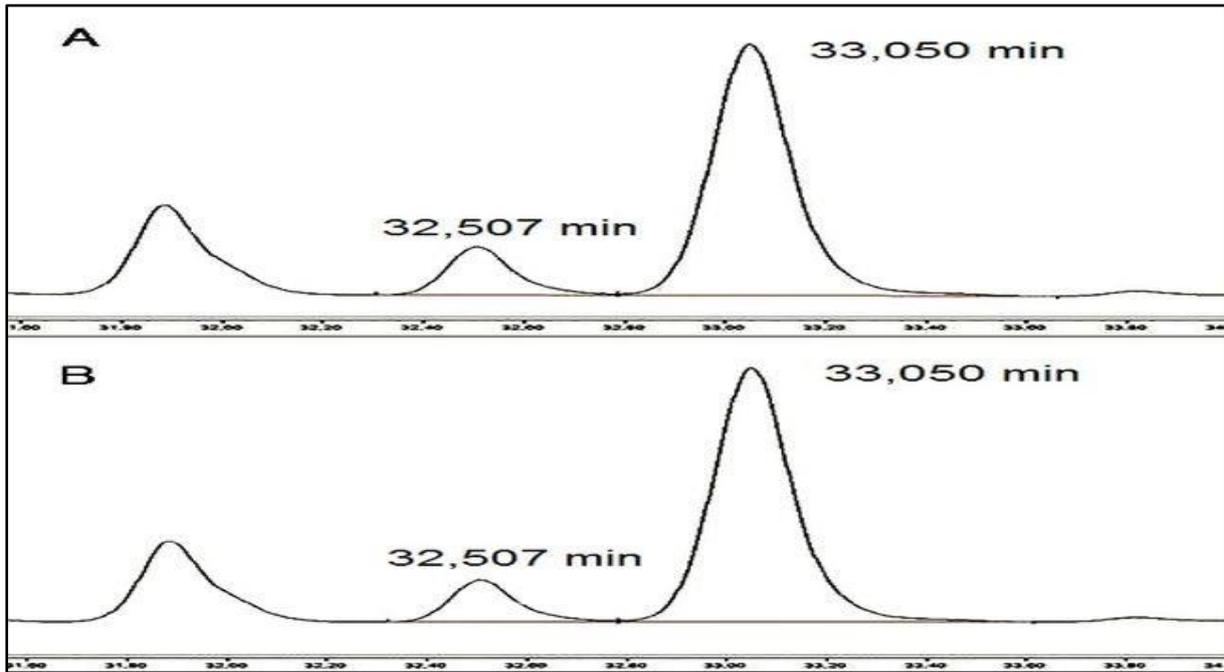


Abbildung 11.7: Robustheit – Variation der Wellenlänge. A – Chromatogrammausschnitt bei 218 nm: Der vorgelagerte Peak mit RT = 32,507 min ist klar von *Extractable 5* (RT = 33,050 min) abgetrennt. B – Chromatogrammausschnitt bei 222 nm: Der vorgelagerte Peak mit RT = 32,507 min ist klar von *Extractable 5* (RT = 33,050 min) abgetrennt.

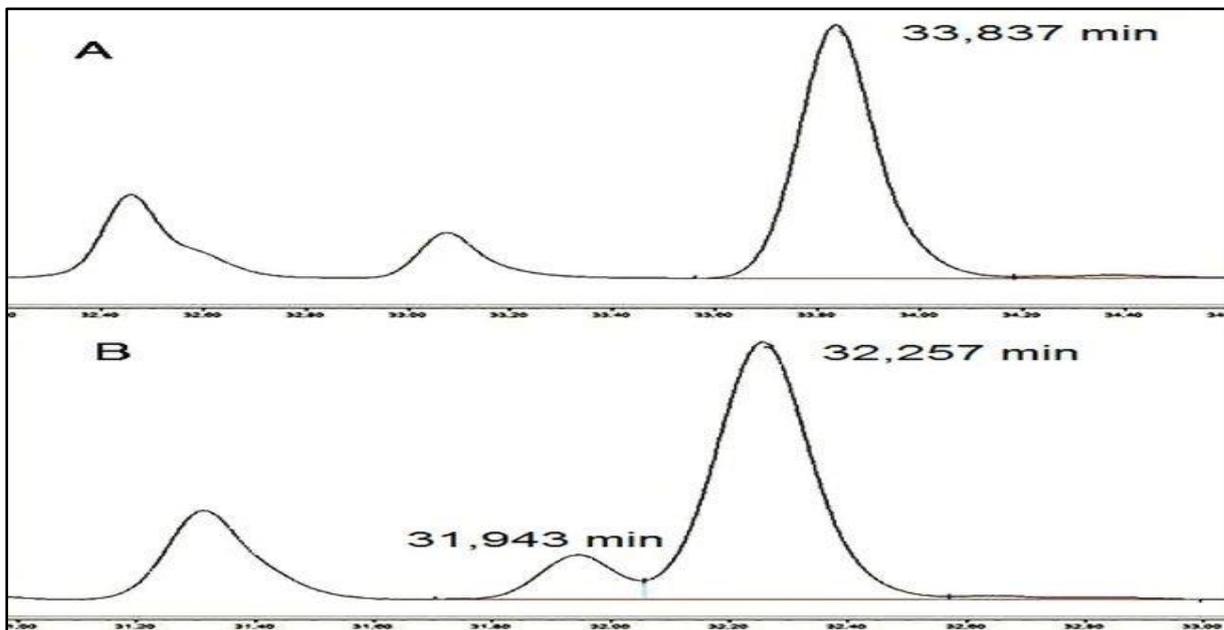


Abbildung 11.8: Robustheit – Variation der Ofentemperatur. A – Chromatogrammausschnitt bei variierter Ofentemperatur (35 °C): Der vorgelagerte Peak ist vollständig von *Extractable 5* (RT = 33,837 min) abgetrennt. B – Chromatogrammausschnitt bei variierter Ofentemperatur (45 °C): Der vorgelagerte Peak bei RT = 31,943 min lässt sich von *Extractable 5* (RT = 32,257 min) mit der Funktion *split peak* abtrennen.

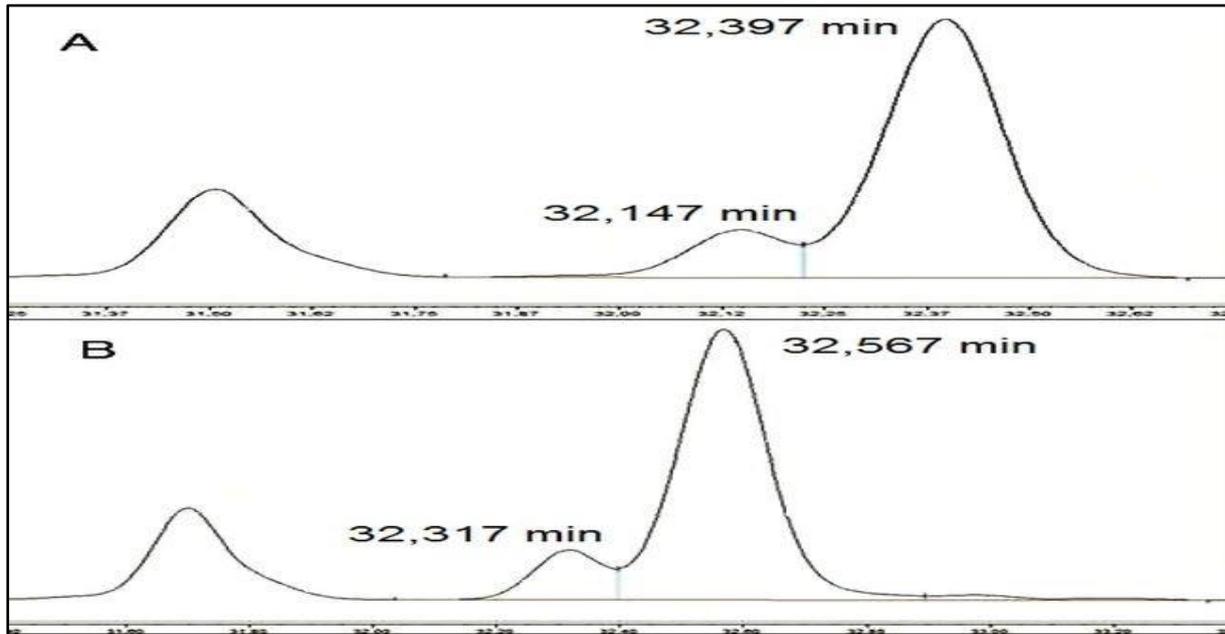


Abbildung 11.9: Robustheit – Variation der mobilen Phase B. A – Chromatogrammausschnitt mit variiertes Phase B (- 20 ml MeOH): Der vorgelagerte Peak bei RT = 32,147 min lässt sich von *Extractable 5* (RT = 32,397 min) mit der Funktion *split peak* abtrennen. **B – Chromatogrammausschnitt mit variiertes Phase B (+ 20 ml MeOH):** Der vorgelagerte Peak bei RT = 32,317 min lässt sich von *Extractable 5* (RT = 32,567 min) mit der Funktion *split peak* abtrennen.

11.1.3 Präzision

Tabelle 11.7: Ergebnisse der Methoden- und Gerätepräzision sowie der intermediären Präzision für die Messung der Pyren-Standardlösung. Es wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) von der Retentionszeit (RT) sowie von der Peakfläche des Pyren-Peaks erfasst (Konzentration_{Pyren}: 0,0037 mg/ml).

--	Methodenpräzision ¹	Gerätepräzision ²	Intermediäre Präzision ³
MW von RT [min]	23,87	23,88	23,59
SD von RT [min]	0,010	0,010	0,009
RSD von RT [%]	0,04	0,04	0,04
MW von Peakfläche [FE]	8,890	9,270	465,894
SD von Peakfläche [FE]	0,221	0,033	18,019
RSD von Peakfläche [%]	2,48	0,35	3,87

¹ Es wurden sechs Pyren-Standardlösungen präpariert und jeweils einmal injiziert (HPLC-DAD System 1).

² Es wurde eine Pyren-Standardlösung präpariert und 6-fach injiziert (HPLC-DAD System 1).

³ Es wurden sechs Pyren-Standardlösungen präpariert und jeweils einmal injiziert (HPLC-DAD System 2).

Anhang

Tabelle 11.8: Ergebnisse der Methodenpräzision für die Messung der Gummistopfen-Probe. Es wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) von der Retentionszeit (RT) sowie von der Peakfläche des internen Standards (IS) und den *Extractables* 1-9 (E1 bis E9) erfasst.

Methodenpräzision ¹										
RT	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [min]	23,86	26,40	27,25	27,89	29,40	33,01	43,89	46,11	47,59	48,74
SD [min]	0,016	0,013	0,016	0,016	0,013	0,016	0,005	0,005	0,005	0,000
RSD [%]	0,07	0,05	0,06	0,06	0,04	0,05	0,01	0,01	0,01	0,00
Fläche	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [FE]	8,747	4,544	13,34	12,77	55,44	52,06	125,34	339,87	328,84	125,22
SD [FE]	0,219	0,087	0,263	0,284	1,124	0,910	2,431	5,464	4,744	2,359
RSD [%]	2,51	1,92	1,97	2,22	2,03	1,75	1,94	1,61	1,44	1,88
Gerätepräzision (6 Injektionen von Probe 1) ²										
MW [min]	23,89	26,40	27,26	27,88	29,41	33,06	43,82	46,07	47,56	48,72
SD [min]	0,005	0,005	0,005	0,000	0,005	0,000	0,008	0,004	0,004	0,005
RSD [%]	0,02	0,02	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01
Fläche	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [FE]	8,563	4,877	13,06	12,48	44,04	51,63	122,78	334,28	324,15	122,39
SD [FE]	0,0245	0,0253	0,0446	0,0520	0,1397	0,1414	0,3251	0,7044	0,8018	0,2971
RSD [%]	0,29	0,52	0,34	0,42	0,32	0,27	0,26	0,21	0,25	0,24
Intermediäre Präzision ³										
MW [min]	23,56	26,06	26,92	27,53	29,08	32,70	43,65	45,65	47,09	48,25
SD [min]	0,009	0,009	0,008	0,009	0,011	0,007	0,006	0,004	0,007	0,009
RSD [%]	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
Fläche	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [FE]	458,41	288,14	791,66	758,31	3597,0	3093,2	8299,1	16310	15249	7787,6
SD [FE]	13,491	4,7859	6,0214	7,4420	19,428	17,123	28,934	46,735	45,436	33,768
RSD [%]	2,94	1,66	0,76	0,98	0,54	0,55	0,35	0,29	0,30	0,43

¹ Es wurden sechs Probelösungen präpariert und jeweils einmal injiziert (HPLC-DAD System 1).

² Es wurde eine Probelösung präpariert und 6-fach injiziert (HPLC-DAD System 1).

³ Es wurden sechs Probelösungen präpariert und jeweils einmal injiziert (HPLC-DAD System 2).

11.1.4 Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze für Pyren und TOTM

Tabelle 11.9: S/N-Verhältnis für Pyren bei 220 nm. Es wurden fünf Konzentrationslevels (0,028 – 0,037 – 0,046 – 0,056 – 0,065 µg/ml) hergestellt und injiziert (n = 6). Aus den resultierenden Chromatogrammen wurde manuell das S/N-Verhältnis berechnet. Dargestellt sind der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und relative Standardabweichung (RSD in %) der resultierenden S/N-Verhältnisse. Wellenlänge: 220 nm, Injektionsvolumen: 20 µl.

220nm	0,028 µg/ml		0,037 µg/ml		0,046 µg/ml		0,056 µg/ml		0,065 µg/ml	
Inj	S/N	Fläche								
1	3,0	0,0396	5,7	0,0724	5,0	0,0839	5,6	0,1317	8,5	0,1430
2	2,8	0,0549	4,7	0,0709	5,0	0,0752	4,8	0,1055	8,5	0,1369
3	3,0	0,0323	5,3	0,0636	5,0	0,0809	6,0	0,0918	5,6	0,1081
4	4,0	0,0519	4,7	0,0468	6,5	0,0801	4,8	0,1077	6,4	0,1120
5	3,2	0,0593	6,0	0,0909	5,0	0,0881	6,0	0,0943	6,4	0,1345
6	3,2	0,0348	4,0	0,0693	4,0	0,0729	7,0	0,1162	8,0	0,1248
MW	3,2	0,0455	5,1	0,0690	5,1	0,0802	5,7	0,1079	7,2	0,1266
SD	0,42	0,0113	0,74	0,0143	0,80	0,0056	0,84	0,0147	1,25	0,0141
RSD	13,11	24,95	14,59	20,67	15,76	6,94	14,68	13,66	17,33	11,15

Tabelle 11.10: S/N-Verhältnis für Pyren bei 254 nm. Es wurden fünf Konzentrationslevels (0,028 – 0,037 – 0,046 – 0,056 – 0,065 µg/ml) hergestellt und injiziert (n = 6). Aus den resultierenden Chromatogrammen wurde manuell das S/N-Verhältnis berechnet. Dargestellt sind der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und relative Standardabweichung (RSD in %) der resultierenden S/N-Verhältnisse. Wellenlänge: 254 nm, Injektionsvolumen: 20 µl.

254nm	0,028 µg/ml		0,037 µg/ml		0,046 µg/ml		0,056 µg/ml		0,065 µg/ml	
Inj	S/N	Fläche	S/N	Fläche	S/N	Fläche	S/N	Fläche	S/N	Fläche
1	3,2	0,0463	7,0	0,0652	8,0	0,0878	8,4	0,0988	9,3	0,1269
2	4,0	0,0506	4,3	0,0563	9,5	0,0809	8,0	0,1056	15,0	0,1155
3	4,0	0,0422	5,6	0,0657	10,0	0,0899	8,0	0,1079	11,2	0,1277
4	4,0	0,0418	5,6	0,0565	8,0	0,0831	6,7	0,1107	12,0	0,1346
5	3,2	0,048	4,8	0,0589	8,0	0,0829	7,6	0,1004	14,0	0,1207
6	4,0	0,0492	6,0	0,0703	8,0	0,0727	7,6	0,102	11,6	0,1281
MW	3,7	0,0464	5,6	0,0622	8,6	0,0829	7,7	0,1042	12,2	0,1256
SD	0,41	0,0037	0,94	0,0057	0,92	0,0060	0,58	0,0046	2,04	0,0066
RSD	11,07	7,89	16,97	9,24	10,69	7,26	7,53	4,42	16,78	5,27

Aus der obigen Zusammenstellung der Ergebnisse ergab sich ein S/N-Verhältnis von 3,2 bzw. 3,7 für eine Konzentration von 0,028 µg/ml Pyren. Daher wurde über klassischen Dreisatz mit den S/N-Werten dieser Konzentration der LOD und LOQ für beide Wellenlängen berechnet:

Tabelle 11.11: Ergebnisse für LOD und LOQ mittels Signal/Rausch-Verfahren für Pyren

220 nm	LOD	0,026 µg/ml	254 nm	LOD	0,022 µg/ml
	LOQ	0,087 µg/ml		LOQ	0,074 µg/ml

Um den LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren ermitteln zu können, wurde mit den analogen Pyren-Konzentrationen eine Kalibriergerade aufgenommen und ausgewertet. Für beide Wellenlängen resultierten lineare Funktionen (siehe Abbildung 11.10), deren Geradengleichungen anschließend zur Berechnung der Standardabweichung der Residuen verwendet wurden.

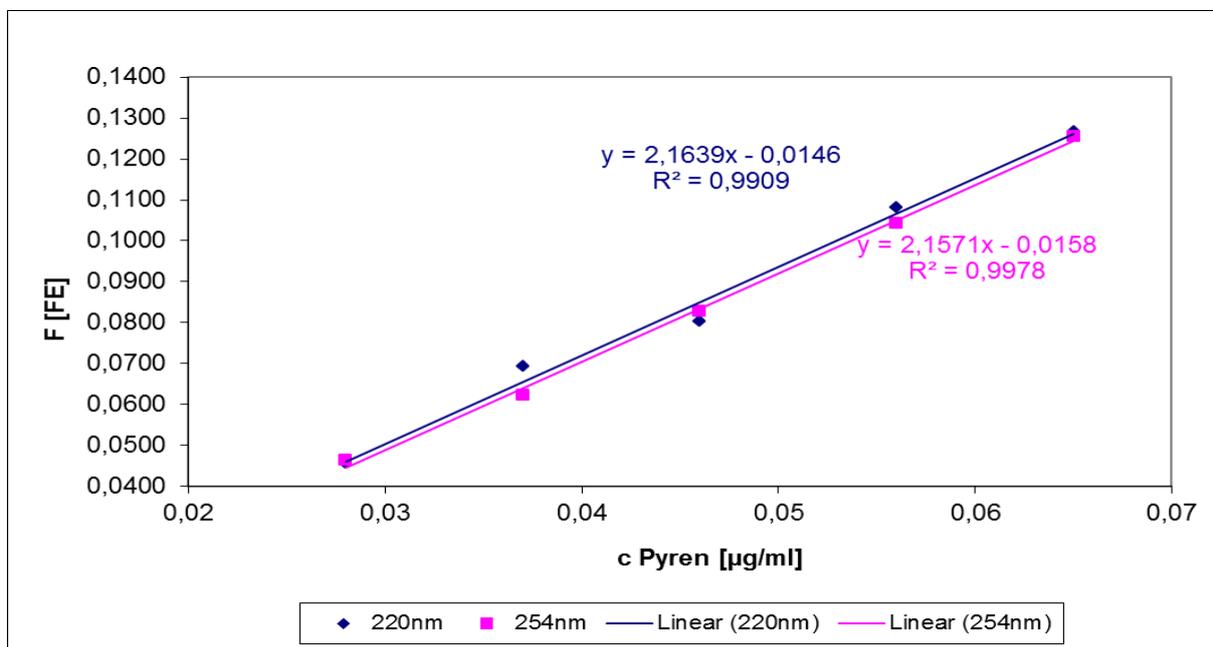


Abbildung 11.10: Ermittlung von LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für Pyren. Graphisch dargestellt sind die Kalibriergeraden für die Wellenlängen 220 und 254 nm mit den dazugehörigen Geradengleichungen.

Anhand der Geradengleichungen wurden für jede Pyren-Konzentration die Residuen und die Quadratsumme der Residuen bestimmt, mit welchen die Reststandardabweichung σ berechnet wurde. Die daraus berechneten Ergebnisse für LOD und LOQ sind in Tabelle 11.13 dargestellt. Analog zu dem geschilderten Vorgehen wurden auch für die Referenzsubstanz TOTM mittels Kalibriergeradenverfahren LOD und LOQ ermittelt.

Anhang

Tabelle 11.12: Pyren: Rohdaten zur Bestimmung von LOD/LOQ mit Kalibriergeradenverfahren. Für die Pyren-Konzentrationen 0,028 – 0,037 – 0,046 – 0,056 – 0,065 µg/ml sind die tatsächlich gemessenen Peakflächen (Fläche_{real}) und die resultierenden Residuen [FE] dargestellt, inklusive der Quadratsumme der Residuen und der Reststandardabweichung σ .

220 nm	c [µg/ml]	0,028	0,037	0,046	0,056	0,065
	Fläche_{real} [FE]	0,0455	0,0690	0,0802	0,1079	0,1266
	Residue [FE]	-0,0005	0,0035	-0,0048	0,0013	0,0005
	Quadratsumme	3,72 x 10⁻⁵				
	Reststandardabweichung σ	0,0035				
254 nm	c [µg/ml]	0,028	0,037	0,046	0,056	0,065
	Fläche_{real} [FE]	0,0464	0,0622	0,0829	0,1042	0,1256
	Residue [FE]	0,0018	-0,0018	-0,0005	-0,0007	0,0012
	Quadratsumme	8,78 x 10⁻⁶				
	Reststandardabweichung σ	0,0017				

Tabelle 11.13: Ergebnisse für LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für Pyren

220 nm	LOD	0,005 µg/ml	254 nm	LOD	0,003 µg/ml
	LOQ	0,016 µg/ml		LOQ	0,008 µg/ml

Tabelle 11.14: TOTM: Rohdaten zur Bestimmung von LOD/LOQ mit Kalibriergeradenverfahren. Für die TOTM-Konzentrationen 0,050 – 0,075 – 0,100 – 0,125 – 0,175 µg/ml sind die tatsächlich gemessenen Peakflächen (Fläche_{real}) dargestellt, inklusive der resultierenden Residuen, der Quadratsumme und der Reststandardabweichung σ .

220 nm	c [µg/ml]	0,050	0,075	0,100	0,125	0,175
	Fläche_{real} [FE]	0,0542	0,0528	0,0741	0,1032	0,1249
	Residue [FE]	0,0073	-0,0100	-0,0045	0,0086	-0,0014
	Quadratsumme	0,0002				
	Reststandardabweichung σ	0,0091				
254 nm	c [µg/ml]	0,050	0,075	0,100	0,125	0,175
	Fläche_{real} [FE]	0,0208	0,0203	0,0350	0,0382	0,0464
	Residue [FE]	0,0010	-0,0051	0,0040	0,0015	-0,0015
	Quadratsumme	4,76 x 10⁻⁵				
	Reststandardabweichung σ	0,0040				

Tabelle 11.15: Ergebnisse für LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für TOTM

220 nm	LOD	0,047 µg/ml	254 nm	LOD	0,058 µg/ml
	LOQ	0,144 µg/ml		LOQ	0,177 µg/ml

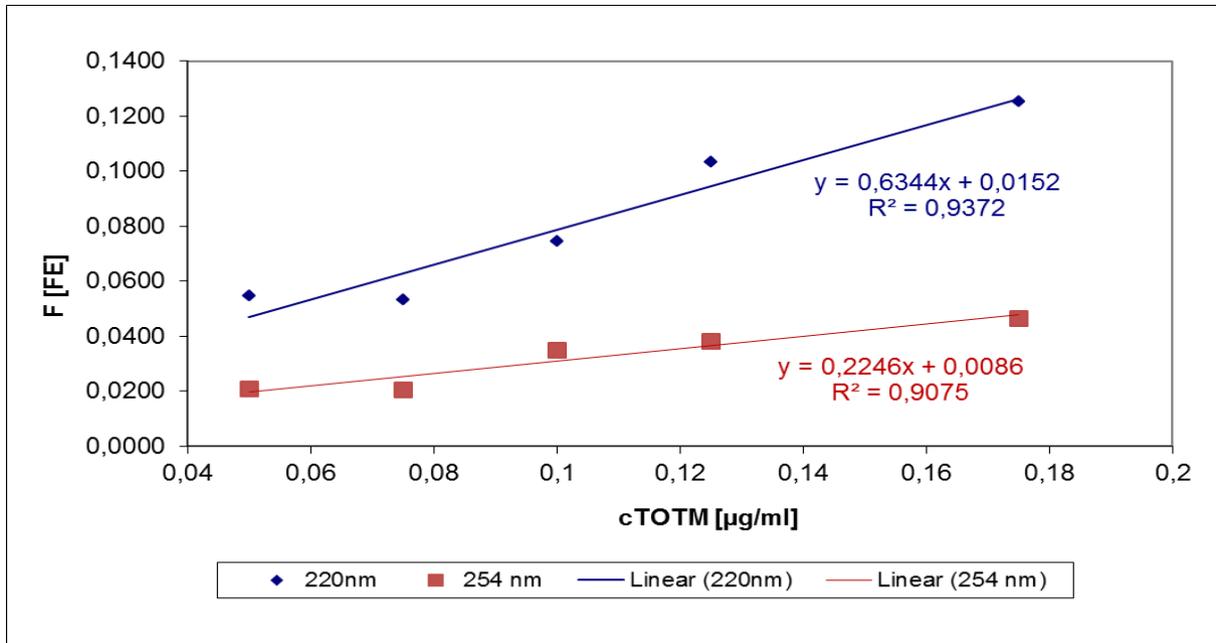


Abbildung 11.11: Ermittlung von LOD und LOQ mittels Kalibriergeradenverfahren für TOTM. Graphisch dargestellt sind die Kalibriergeraden für die Wellenlängen 220 und 254 nm mit den dazugehörigen Geradengleichungen.

11.1.5 Proben- und Standardstabilität

Tabelle 11.16: Stabilität des präparierten Standards. Die Stabilität der präparierten Standardlösung (Konzentration: 0,0037 mg/ml) wurde für einen Zeitraum von 72 h im Autosampler untersucht (n = 19 Injektionen). Zusätzlich wurde die Stabilität von im Kühlschrank gelagerter Stammlösung für einen Zeitraum von 48 h betrachtet, indem zum Zeitpunkt T0, nach 24 h und nach 48 h aus der gelagerten Stammlösung (0,37 mg/ml) die Präparation und Injektion erfolgte (n = 3 Injektionen). Dargestellt ist der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) von der Retentionszeit (RT) und der Peakfläche. ¹ Die Berechnung erfolgte aus allen Injektionen.

Standardstabilität	Im Autosampler bei 5 °C	Aus im Kühlschrank gelagerter Stammlösung
MW von RT [min] ¹	23,92	23,82
SD von RT [min] ¹	0,04	0,01
RSD von RT [%] ¹	0,18	0,02
MW von Peakfläche [FE] ¹	8,596	8,736
SD von Peakfläche [FE] ¹	0,123	0,122
RSD von Peakfläche [%] ¹	1,44	1,40

Tabelle 11.17: Stabilität der präparierten Gummistopfen-Probe. Die Stabilität der präparierten Probelösung wurde für einen Zeitraum von 72 h im Autosampler untersucht (n = 19 Injektionen). Zusätzlich wurde die Stabilität von im Kühlschrank gelagerter Probelösung (vor Zusatz von internem Standard) für einen Zeitraum von 48 h betrachtet, indem zum Zeitpunkt T0, nach 24 h und nach 48 h aus der gelagerten Stammlösung (0,37 mg/ml) die Präparation und Injektion erfolgte (n = 3 Injektionen). Dargestellt ist der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) von der Retentionszeit (RT) und der Peakfläche. ¹ Die Berechnung erfolgte aus allen Injektionen.

Stabilität im Autosampler bei 5 °C										
RT	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [min] ¹	23,80	26,35	27,21	27,85	29,37	32,98	43,84	46,06	47,55	48,71
SD [min] ¹	0,023	0,022	0,021	0,021	0,020	0,021	0,019	0,009	0,006	0,005
RSD [%] ¹	0,10	0,08	0,08	0,08	0,07	0,06	0,04	0,02	0,01	0,01
Fläche	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [FE] ¹	8,793	4,733	13,291	12,555	43,151	51,624	121,99	332,37	323,23	121,91
SD [FE] ¹	0,195	0,031	0,085	0,086	0,531	0,895	1,461	2,917	2,263	1,444
RSD [%] ¹	2,22	0,65	0,64	0,68	1,23	1,73	1,20	0,88	0,70	1,18

Aus im Kühlschrank bei 2-8 °C gelagerter Stammlösung										
RT	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [min] ¹	23,82	26,37	27,23	27,87	29,38	33,00	43,85	46,07	47,55	48,71
SD [min] ¹	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000	0,006	0,010	0,006	0,006	0,006
RSD [%] ¹	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
Fläche	IS	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9
MW [FE] ¹	9,119	4,914	13,748	12,868	45,161	54,213	127,68	345,19	334,64	127,63
SD [FE] ¹	0,228	0,128	0,199	0,294	0,484	0,955	1,386	3,500	3,271	1,345
RSD [%] ¹	2,50	2,60	1,45	2,28	1,07	1,76	1,09	1,01	0,98	1,05

11.1.6 Berechnung des Korrekturfaktors zur Vergleichbarkeit der Daten beider HPLC-Systeme

Zur Berechnung des Korrekturfaktors wurden die Daten der Linearitätsbestimmung von beiden HPLC-Systemen (HPLC-System 1 und 2) miteinander verglichen und hinsichtlich des Flächenverhältnisses $\text{Fläche}_{\text{Extractable}}/\text{Fläche}_{\text{IS}}$ ausgewertet. Da aufgrund der anderen Ergebnisse der Linearitätsbestimmung bereits bekannt war, dass die *Extractables* 1-5 bei 220 nm und die *Extractables* 6-9 bei 254 nm ausgewertet würden, wurden auch die Flächenverhältnisse der einzelnen *Extractables* bei den entsprechenden Wellenlängen betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass für die *Extractables* 1-5 generell niedrigere Flächenverhältnisse resultierten als für die *Extractables* 6-9. Da aus den Extraktionsstudien (siehe Kapitel 4.3.2) bekannt war, dass auf die *Extractables* 6-9 etwa 90 % der Gesamtkonzentration an *Extractables* entfielen, würde aufgrund einer fehlenden Gewichtung die Verwendung des Flächenverhältnis-Mittelwerts aller *Extractables* zu einer unrealistischen Verzerrung der Ergebnisse führen. Daher wurde der Flächenverhältnis-Mittelwert der *Extractables* 6-9 berechnet und der aus diesem resultierende Korrekturfaktor 1,126 als allgemeiner Korrekturfaktor für alle neun *Extractables* verwendet.

Tabelle 11.18: Berechnung des Korrekturfaktors. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW, n = 5) der erzeugten Flächenverhältnisse von dem jeweiligen *Extractable* (E) und internen Standard (IS) für beide HPLC-Systeme. ¹ Die Auswertung erfolgte bei 220 nm, ² Die Auswertung erfolgte bei 254 nm.

--	HPLC-System 1	HPLC-System 2	Verhältnis HPLC-System 1/HPLC-System 2
	MW Fläche _E /Fläche _{IS}	MW Fläche _E /Fläche _{IS}	
E1 ¹	0,520	0,636	0,8176
E2 ¹	1,496	1,707	0,8764
E3 ¹	1,206	1,413	0,8535
E4 ¹	4,983	6,192	0,8047
E5 ¹	5,722	6,805	0,8409
E6 ²	6,039	6,689	0,9028
E7 ²	17,583	19,838	0,8863
E8 ²	17,617	19,870	0,8866
E9 ²	6,149	7,005	0,8778
Mittelwert (E1 bis E9)			0,8607
Kehrwert des Mittelwerts (E1 bis E9)			1,162
Mittelwert (E6 bis E9)			0,8884
Kehrwert des Mittelwerts (E6 bis E9)			1,126

11.2 Daten zur Validierung der AAS-Methoden

11.2.1 AAS-Methode für die Zink-Bestimmung gemäß JP

11.2.1.1 Linearität

Die Linearität wurde für die Konzentrationen 0,15 – 0,30 – 0,45 – 0,60 – 0,75 ppm überprüft.

Tabelle 11.19: Ergebnisse der Linearität der Zink-Bestimmung gemäß JP

y-Achsenabschnitt b [A]	0,0061
Steigung m [A/ppm]	0,3148
Korrelationskoeffizient R	0,9999

11.2.1.2 Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Berechnung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) erfolgte mittels Kalibriergeradenverfahren aus den Daten der Linearitätsprüfung gemäß der ICH Guideline Q2 (R1) [61].

Tabelle 11.20: Berechnung von LOD und LOQ der Zink-Bestimmung gemäß JP. Aus der Geradengleichung und der resultierenden Standardabweichung der Residuen (SD) wurden die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) berechnet.

c [ppm]	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75
Signal _{real} [A]	0,0519	0,1019	0,1488	0,1945	0,2417
Residue [A]	-0,0014	0,0014	0,0010	-0,0005	-0,0005
Quadratsumme	$5,4 \times 10^{-6}$				
Reststandardabweichung σ	0,0013				
LOD [ppm]	0,01				
LOQ [ppm]	0,04				

11.2.1.3 Präzision

11.2.1.3.1 Methodenpräzision

Es wurde jeweils eine Kalibrierung (0,20 – 0,30 – 0,50 – 0,70 ppm) und die Messung von Blank und Prüflösung als Doppelbestimmung durchgeführt:

Tabelle 11.21: Ergebnisse der Methodenpräzision der Zink-Bestimmung gemäß JP

--	Messreihe 1	Messreihe 2
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0030	0,0059
Steigung m [A/ppm]	0,3221	0,3160
Korrelationskoeffizient R	0,9999	1,0000
Gehalt Probe [ppm]	< LOD ¹	< LOD ¹
RSD [%]	k. A. ²	k. A. ²
Mittelwert beider Messreihen [ppm]		k. A. ²
Differenz von Messreihe 1 zu 2 [%]		k. A. ²
RSD beider Messreihen [%]		k. A. ²

¹ < LOD: < Nachweisgrenze, der Gummistopfen CB2 enthält keine nachweisbare Konzentration an Zink

² k. A.: keine Angabe möglich, da keine nachweisbare Konzentration an Zink enthalten

11.2.1.3.2 Intermediäre Präzision

Es wurde eine Kalibrierung (0,20 – 0,30 – 0,50 – 0,70 ppm) und die Messung von Blank und Prüflösung als Doppelbestimmung durchgeführt:

Tabelle 11.22: Ergebnisse der intermediären Präzision der Zink-Bestimmung gemäß JP

y-Achsenabschnitt	0,0032
Steigung	0,3180
Korrelationskoeffizient	1,0000
Gehalt Probe	< LOD ¹
RSD	k. A. ²
Mittelwert beider Messreihen	k. A. ²
Differenz zum Vortag	k. A. ²

¹ < LOD: < Nachweisgrenze, der Gummistopfen CB2 enthält keine nachweisbare Konzentration an Zink

² k. A.: keine Angabe möglich, da keine nachweisbare Konzentration an Zink enthalten

11.2.1.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde mit den drei Konzentrationen 0,15 – 0,45 – 0,75 ppm in Blank-Matrix und Prüflösung-Matrix durchgeführt.

Tabelle 11.23: Ergebnisse der Richtigkeit der Zink-Bestimmung gemäß JP: Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte (n = 2)

--	Blank		Prüflösung	
Konzentration _{Soll} [ppm]	Konzentration _{Ist} [ppm]	Wiederfindung [%]	Konzentration _{Ist} [ppm]	Wiederfindung [%]
0,15	0,14	93,3	0,13	86,7
0,45	0,44	97,8	0,43	95,6
0,75	0,73	97,3	0,72	96,0

11.2.1.5 Proben- und Standardstabilität

Für die Proben- und Standardstabilität wurde kalibriert und zwei Prüflösungen von Gummistopfen BB3 gemessen. Anschließend wurden die Kalibrierstandards und Prüflösungen über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag nochmals gemessen.

Tabelle 11.24: Proben- und Standardstabilität der Zink-Bestimmung gemäß JP. Die Kenndaten der Kalibriergeraden sowie das Ergebnis der Prüflösung sind für den Zeitpunkt T0 sowie der Messung nach 24 h (T24) dargestellt.

--	Zeitpunkt T0	Zeitpunkt T24
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0087	0,0081
Steigung m [A/ppm]	0,3123	0,3070
Korrelationskoeffizient R	0,9998	0,9998
Gehalt Probe [ppm]	1,03	1,05
RSD [%]	0,62	0,40
Mittelwert beider Messreihen [ppm]		1,04
Differenz von Messreihe 1 zu 2 [%]		1,9

11.2.1.6 Robustheit

Im Rahmen der Robustheitsprüfung wurden die Methodenparameter „Gasfluss“, „Brennerhöhe“ und der Einfluss verschiedener Salpetersäure-Chargen überprüft.

Tabelle 11.25: Ergebnisse der Variation der Brennerhöhe um $\pm 0,1$ mm (Ausgangsstellung: 5,4 mm)

--	5,3 mm	5,5 mm
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0076	0,0071
Steigung m [A/ppm]	0,3117	0,3144
Korrelationskoeffizient R	1,0000	0,9997
Gehalt Probe [ppm]	< LOD ¹	< LOD ¹
RSD [%]	k. A. ²	k. A. ²

¹ < LOD: < Nachweisgrenze, der Gummistopfen CB2 enthält keine nachweisbare Konzentration an Zink

² k. A.: keine Angabe möglich, da keine nachweisbare Konzentration an Zink enthalten

Tabelle 11.26: Ergebnisse der Variation des Gasflusses um $\pm 0,1$ l/min (Ausgangswert: 0,9 l/min)

--	0,8 l/min	1,0 l/min
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0074	0,0069
Steigung m [A/ppm]	0,3258	0,3043
Korrelationskoeffizient R	0,9997	0,9999
Gehalt Probe [ppm]	< LOD ¹	< LOD ¹
RSD [%]	k. A. ²	k. A. ²

¹ < LOD: < Nachweisgrenze, der Gummistopfen CB2 enthält keine nachweisbare Konzentration an Zink

² k. A.: keine Angabe möglich, da keine nachweisbare Konzentration an Zink enthalten

Um den Einfluss einer anderen Salpetersäure-Charge zu überprüfen, erfolgte die Kalibrierung und Probenpräparation zunächst mit derselben Charge, zusätzlich wurde die Probenpräparation nochmals unter Verwendung einer anderen Salpetersäure durchgeführt.

--	Salpetersäure – 1
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0125
Steigung m [A/ppm]	0,3031
Korrelationskoeffizient R	0,9999
Gehalt Probe [ppm]	1,05
Gehalt Probe [ppm]	1,08 ¹
Differenz [%]	2,9

¹ Die Probenpräparation erfolgte mit einer anderen Charge Salpetersäure.

11.2.2 AAS-Methode für die Zink-Analyse gemäß Ph. Eur., USP

11.2.2.1 Linearität

Die Linearität wurde für die Konzentrationen 0,05 – 0,20 – 0,35 – 0,50 – 0,65 ppm überprüft.

Tabelle 11.27: Ergebnisse der Linearität der Zink-Bestimmung gemäß Ph. Eur., USP

y-Achsenabschnitt b [A]	0,0042
Steigung m [A/ppm]	0,3343
Korrelationskoeffizient R	0,9997

11.2.2.2 Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Berechnung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) erfolgte mittels Kalibriergeradenverfahren aus den Daten der Linearitätsprüfung gemäß der ICH Guideline Q2 (R1) [61].

Tabelle 11.28: Berechnung von LOD und LOQ der Zink-Bestimmung gemäß Ph. Eur., USP. Aus der Geradengleichung und der resultierenden Standardabweichung der Residuen (SD) wurden die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) berechnet.

c [ppm]	0,05	0,20	0,35	0,50	0,65
Signal _{real} [A]	0,0190	0,0721	0,1236	0,1715	0,2200
Residue [A]	-0,00196	0,001	0,00236	0,00012	-0,00152
Quadratsumme	$1,3 \times 10^{-5}$				
Reststandardabweichung σ	0,0021				
LOD [ppm]	0,02				
LOQ [ppm]	0,06				

11.2.2.3 Präzision

11.2.2.3.1 Methodenpräzision

Es wurde jeweils eine Kalibrierung (0,05 – 0,10 – 0,30 – 0,50 ppm) und die Messung von Blank und Prüflösung als Doppelbestimmung durchgeführt:

Tabelle 11.29: Methodenpräzision – Ergebnisse

--	Messreihe 1	Messreihe 2
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0017	0,0019
Steigung m [A/ppm]	0,3032	0,3006
Korrelationskoeffizient R	0,9999	0,9998
Gehalt Probe [ppm]	0,68	0,70
RSD [%]	0,55	1,02
Mittelwert beider Messreihen [ppm]		0,69
Differenz von Messreihe 1 zu 2 [%]		2,9
RSD beider Messreihen (bez. auf Signal) [%]		1,9

11.2.2.3.2 Intermediäre Präzision

Tabelle 11.30: Intermediäre Präzision – Ergebnisse

y-Achsenabschnitt b [A]	0,0022
Korrelationskoeffizient R	0,9999
Gehalt Probe [ppm]	0,73
RSD [%]	0,27
Mittelwert beider Messreihen [ppm]	0,70
Differenz zum Vortag [%]	1,4

11.2.2.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde mit den drei Konzentrationen 0,05 – 0,35 – 0,65 ppm in Blank-Matrix und Prüflösung-Matrix durchgeführt.

Tabelle 11.31: Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte (n = 2)

--	Blank		Prüflösung	
Konzentration _{Soll} [ppm]	Konzentration _{Ist} [ppm]	Wiederfindung [%]	Konzentration _{Ist} [ppm]	Wiederfindung [%]
0,05	0,05	100,0	0,05	100,0
0,35	0,36	102,9	0,36	102,9
0,65	0,65	100,0	0,64	98,5

11.2.2.5 Proben- und Standardstabilität

Die Kalibrierstandards und Prüflösungen der Wiederholpräzision wurden über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und am nächsten Tag nochmals gemessen.

Tabelle 11.32: Ergebnisse der Proben- und Standardstabilität

y-Achsenabschnitt b [A]	0,0045
Korrelationskoeffizient R	0,9999
Gehalt Probe [ppm]	0,65
RSD [%]	0,28
Differenz zum Vortag [%]	11,0 ¹

¹ Als Konsequenz erfolgte bei allen weiteren Messungen die arbeitstägliche Herstellung der Standards und Proben.

11.2.2.6 Robustheit

Im Rahmen der Robustheitsprüfung wurden die Methodenparameter „Gasfluss“, „Brennerhöhe“ und der Einfluss verschiedener Salzsäure-Chargen überprüft. Bezogen auf den gemessenen Gehalt der Probe von 0,72 ppm in Ausgangsstellung ergab sich somit eine Abweichung von 2,9 % bei der Variation der Brennerhöhe.

Tabelle 11.33: Variation der Brennerhöhe um $\pm 0,1$ mm (Ausgangsstellung: 6,2 mm)

--	6,1 mm	6,3 mm
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0026	0,0025
Korrelationskoeffizient R	0,9999	0,9999
Gehalt Probe [ppm]	0,70	0,72
RSD [%]	0,28	0,87

Tabelle 11.34: Variation des Gasflusses um $\pm 0,1$ l/min (Ausgangswert: 1,0 l/min)

--	0,9 l/min	1,1 l/min
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0028	0,0019
Korrelationskoeffizient R	0,9997	0,9998
Gehalt Probe [ppm]	0,72	0,74
RSD [%]	0,58	0,79

Bezogen auf den gemessenen Gehalt der Probe von 0,71 ppm mit dem Ausgangsfluss ergab sich somit eine Abweichung von 1,4 bzw. 4,2 % bei der Variation des Gasflusses.

Bei der Verwendung einer anderen Charge der eingesetzten konzentrierten Salzsäure ergaben sich folgende Ergebnisse:

--	Salzsäure – 2
y-Achsenabschnitt b [A]	0,0014
Steigung m [A/ppm]	0,3716
Korrelationskoeffizient R	0,9998
Gehalt Probe [ppm]	0,79
Gehalt Probe [ppm]	0,71 ¹
Differenz [%]	11,3 ²

¹ Diese Ergebnis resultierte bei der Verwendung der ursprünglichen Salzsäure-Charge.

² Da dieselbe Salzsäure-Charge auch bei der Methodenpräzision verwendet wurde und hierbei keine Auffälligkeiten zeigte, wird von einer Verunreinigung bei der Probenpräparation ausgegangen.

11.3 Ergebnisse der Berechnungen zur Konzentration der Extractables in Gummistopfen CB1 und BB6 aus den Extraktionsprofilen

Für den Gummistopfen CB1 wurden zur Berechnung der *Extractables* die erhaltenen Extraktionsprofile nach 3 h Extraktion unter reflux-Bedingungen für die bekannten *Extractables* 1-9 herangezogen. Die Auswertung erfolgte für alle *Extractables* bei 254 nm zur besseren Vergleichbarkeit, da die Ergebnisse zu Gummistopfen BB6 ebenfalls bei 254 nm ausgewertet worden waren. Für den Gummistopfen BB6 wurden alle detektierten Peaks verwendet, da nur eine geringe Anzahl an *Extractables* und diese auch nur in niedriger Konzentration vorlagen.

Tabelle 11.35: Ergebnisse für den Gummistopfen CB1 bei einer Extraktion von 3 h. Die Konzentration der einzelnen *Extractables* 1-9 wurde umgerechnet und ausgedrückt als Trimellitat in [$\mu\text{g/ml}$] \pm SD (n = 6) und RSD.

<i>Extractable</i>	Gehalt Trimellitat [$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	RSD [%]
1	1,95	0,46	23,61
2	3,49	0,60	17,20
3	2,52	0,57	22,82
4	26,12	3,89	14,88
5	60,05	8,38	13,95
6	124,90	14,85	11,89
7	376,20	44,03	11,70
8	379,98	44,10	11,61
9	134,90	16,16	11,98
Summe	1110,11	$\mu\text{g/ml}$	
Umrechnung	5550,57	$\mu\text{g/Stopfen}$	

Tabelle 11.36: Ergebnisse für den Gummistopfen BB6 bei einer Extraktion von 3 h. Aufgrund der geringen Konzentration an *Extractables* wurde die Summe aller detektierten Peaks verwendet, ausgedrückt als Trimellitat in [$\mu\text{g/ml}$] \pm SD (n = 6) und RSD.

Extraktion 3 h	Gehalt Trimellitat				
	<i>Extractable</i>	[$\mu\text{g/ml}$]	SD [$\mu\text{g/ml}$]	RSD [%]	$\mu\text{g/Stopfen}$
Summe		5,29	1,37	25,94	26,43

11.4 Vollständigkeit der Extraktion in Abhängigkeit von der Extraktionszeit

Die Extraktion von Gummistopfen CB1 von 1 h und 3 h unter reflux-Bedingungen wurde jeweils mit drei Gummistopfen durchgeführt. Die Extraktion von 6 h unter reflux-Bedingungen erfolgte mit zwei Gummistopfen. Diese Extraktlösungen wurden anschließend gemäß Kapitel 9.2 aufgearbeitet, sodass die Ergebnisse in Tabelle 11.37 die Mittelwerte aus $n = 6$ bzw. $n = 4$ Proben darstellen.

Tabelle 11.37: Extractables 1-9 aus Gummistopfen CB1 unter reflux-Bedingungen mit IPA. Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat in $[\mu\text{g/ml}] \pm \text{SD}$ dargestellt

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 h	1,19 ± 0,18	4,92 ± 0,36	4,54 ± 0,26	29,98 ± 3,35	28,24 ± 2,73	71,07 ± 4,17	216,38 ± 13,21	218,49 ± 13,28	76,73 ± 4,71	651,51 ± 41,86
3 h	3,96 ± 0,90	11,19 ± 2,03	10,51 ± 1,86	55,54 ± 8,38	46,98 ± 6,73	124,90 ± 14,85	376,20 ± 44,03	379,98 ± 44,10	134,90 ± 16,16	1144,11 ± 138,13
6 h	5,17 ± 0,46	17,02 ± 1,71	16,18 ± 1,60	99,29 ± 9,48	66,69 ± 6,71	174,59 ± 6,74	519,79 ± 19,28	521,84 ± 19,29	186,92 ± 7,01	1607,33 ± 71,51

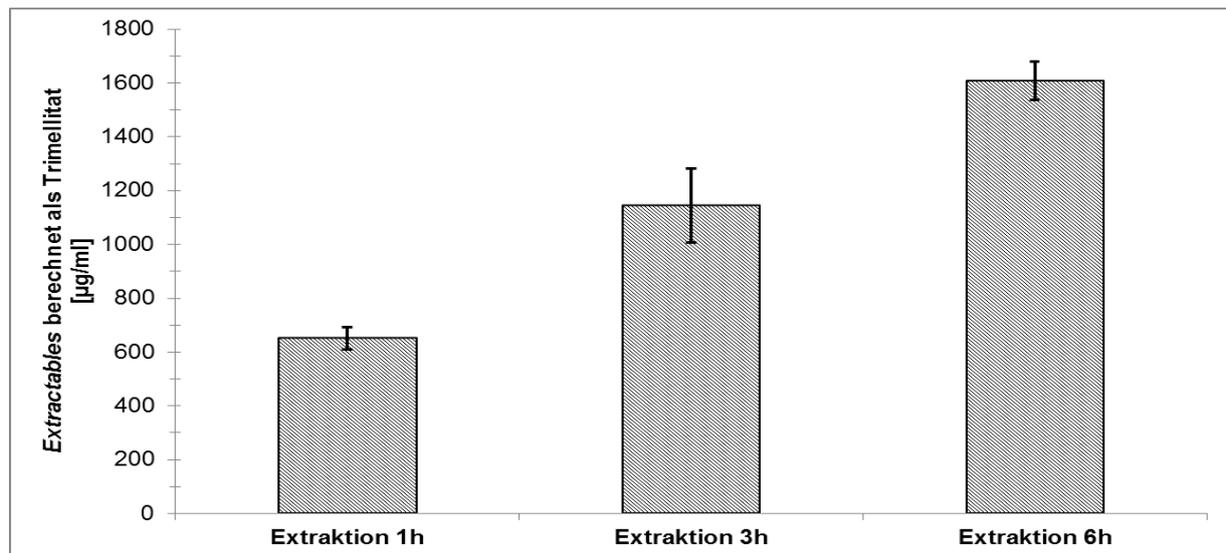


Abbildung 11.12: Konzentration der Extractables 1-9 als Summe aus Gummistopfen CB1 in Abhängigkeit von der Zeit. Extraktion in IPA für 1 – 3 – 6 h unter reflux-Bedingungen; die Konzentration an Extractables wird als Trimellitat in $[\mu\text{g/ml}] \pm \text{SD}$ ausgedrückt.

11.5 Ergebnisse der Extraktionsstudie von Gummistopfen CB1

Es wurden zwei Extraktionsstudien mit variierenden Prüfzeitpunkten durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse beider Extraktionsstudien zusammengefasst.

Tabelle 11.38: Ergebnisse der Extraktion von Gummistopfen CB1 mit IPA für die *Extractables* 1-9. Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat, ausgedrückt in [$\mu\text{g/ml}$] \pm SD, dargestellt; ¹ Wert aus 1. Extraktionsstudie entnommen; ² Wert aus 2. Extraktionsstudie entnommen; ³ Mittelwert aus der 1. und 2. Extraktionsstudie

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 ³	0,72 \pm 0,15	1,80 \pm 0,34	1,67 \pm 0,15	2,90 \pm 0,42	6,36 \pm 0,44	15,78 \pm 0,94	47,94 \pm 3,74	48,04 \pm 3,69	16,64 \pm 1,24	141,84 \pm 19,21
4 ³	1,52 \pm 0,10	3,90 \pm 0,20	3,37 \pm 0,19	6,83 \pm 1,23	13,80 \pm 0,42	33,38 \pm 2,10	103,16 \pm 4,94	103,89 \pm 5,16	35,27 \pm 2,41	305,11 \pm 41,40
6 ²	2,17 \pm 0,24	4,90 \pm 0,27	4,49 \pm 0,09	9,10 \pm 1,00	16,89 \pm 0,53	42,47 \pm 0,73	128,95 \pm 2,32	129,07 \pm 2,80	45,19 \pm 0,77	383,20 \pm 7,79
8 ¹	2,29 \pm 0,22	5,80 \pm 0,19	4,49 \pm 0,11	8,31 \pm 0,69	19,21 \pm 0,62	45,79 \pm 0,78	139,49 \pm 2,42	140,96 \pm 2,60	49,10 \pm 1,48	415,92 \pm 7,73
13 ¹	3,54 \pm 0,32	7,82 \pm 0,28	5,94 \pm 0,46	10,46 \pm 1,34	24,42 \pm 1,81	62,99 \pm 1,55	189,11 \pm 4,40	190,54 \pm 4,36	65,92 \pm 1,70	560,74 \pm 13,74
14 ²	3,05 \pm 0,27	7,64 \pm 0,36	6,56 \pm 0,31	16,29 \pm 1,12	25,71 \pm 1,27	66,02 \pm 2,71	199,27 \pm 8,00	199,12 \pm 8,08	70,04 \pm 2,80	593,79 \pm 24,38
21 ²	4,03 \pm 0,33	8,90 \pm 0,52	7,42 \pm 0,27	17,92 \pm 1,09	27,94 \pm 0,96	74,99 \pm 1,04	229,24 \pm 3,46	230,72 \pm 3,97	80,65 \pm 1,25	681,84 \pm 10,69
22 ¹	3,80 \pm 0,27	9,32 \pm 0,74	7,49 \pm 0,35	15,72 \pm 0,40	30,55 \pm 1,86	79,20 \pm 2,10	234,76 \pm 6,34	236,18 \pm 6,34	81,91 \pm 2,19	700,96 \pm 18,15
28 ²	4,23 \pm 0,36	10,49 \pm 0,59	9,24 \pm 0,43	23,97 \pm 1,19	34,19 \pm 1,43	91,40 \pm 2,39	273,14 \pm 7,10	273,40 \pm 6,33	96,35 \pm 2,56	816,22 \pm 20,77
56 ²	4,91 \pm 0,51	12,64 \pm 0,29	11,42 \pm 0,31	35,76 \pm 2,21	40,78 \pm 0,92	116,37 \pm 1,21	353,40 \pm 4,51	356,33 \pm 6,06	125,83 \pm 1,70	1057,44 \pm 11,94

11.6 Ergebnisse der Interaktionsstudien von CB1

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Interaktionsstudien von CB1 mit den sieben Modellformulierungen gemäß Kapitel 9.1.7.3 dargestellt. Für die *Extractables* 1-5 erfolgte die Auswertung bei 220 nm mit einem LOQ von 0,14 µg/ml. Für die *Extractables* 6-9 erfolgte die Auswertung bei 254 nm mit einem LOQ von 0,18 µg/ml (zur Bestimmung von LOQ und LOD siehe Kapitel 4.1.4).

Tabelle 11.39: Migration der *Extractables* 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 3 (1,0 % PS 80 in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3). Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat, ausgedrückt in [µg/ml] ± SD, dargestellt. ¹ keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n < 3

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 Wo	0,27 ± 0,04	0,35 ± 0,06	0,26 ± 0,06	3,30 ± 0,07	< LOQ	< LOQ	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,03	< LOQ	4,76 ± 0,05
1 Mo	0,40 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,39 ± 0,02	6,56 ± 0,15	1,46 ± 0,05	0,69 ± 0,16	2,02 ± 0,56	1,85 ± 0,50	0,46 ± 0,17	14,47 ± 1,52
2 Mo	0,45 ± 0,04	0,64 ± 0,07	0,43 ± 0,06	7,50 ± 0,16	1,69 ± 0,03	1,14 ± 0,57	3,48 ± 1,54	3,27 ± 1,41	0,83 ± 0,59	19,42 ± 4,13
3 Mo	0,52 ± 0,12	0,71 ± 0,02	0,45 ± 0,05	7,83 ± 0,77	1,62 ± 0,13	2,16 ± 0,36	6,27 ± 1,02	5,99 ± 1,05	1,82 ± 0,35	27,36 ± 3,55
4 Mo	0,52 ± 0,12	0,71 ± 0,02	0,45 ± 0,05	7,83 ± 0,77	1,62 ± 0,13	2,37 ¹	6,71 ¹	6,33 ¹	1,80 ¹	31,00 ¹
6 Mo	0,57 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,51 ± 0,06	10,88 ± 0,71	3,01 ± 0,22	3,67 ± 0,46	11,09 ± 1,56	10,44 ± 1,51	3,42 ± 0,51	44,38 ± 4,50

Tabelle 11.40: Migration der *Extractables* 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 2 (0,1 % PS 80 in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3). Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat, ausgedrückt in [µg/ml] ± SD, dargestellt

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 Wo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,57 ± 0,14	0,30 ± 0,03	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,87 ± 0,17
1 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,58 ± 0,25	0,70 ± 0,10	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,28 ± 0,35
2 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,03 ± 0,53	0,89 ± 0,17	< LOQ	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	< LOQ	4,31 ± 0,68
3 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,95 ± 0,14	0,95 ± 0,05	< LOQ	0,33 ± 0,05	0,29 ± 0,08	< LOQ	4,52 ± 0,27
4 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,12 ± 0,20	0,94 ± 0,06	< LOQ	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,03	< LOQ	4,63 ± 0,29
6 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,86 ± 0,50	0,80 ± 0,11	< LOQ	0,37 ± 0,03	0,27 ± 0,02	< LOQ	4,30 ± 0,59

Anhang

Tabelle 11.41: Migration der *Extractables* 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 5 (1,0 % PS 20 in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3). Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat, ausgedrückt in [µg/ml] ± SD, dargestellt. ¹ keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n < 3

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 Wo	0,14 ¹	0,19 ± 0,01	0,15 ¹	3,25 ± 0,16	0,60 ± 0,05	< LOQ	0,31 ¹	0,31 ¹	< LOQ	4,65 ± 0,33
1 Mo	0,27 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,31 ± 0,04	6,30 ± 0,37	1,96 ± 0,13	0,21 ± 0,03	0,75 ± 0,08	0,63 ± 0,08	< LOQ	10,84 ± 0,64
2 Mo	0,26 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,35 ± 0,01	8,34 ± 0,29	2,67 ± 0,03	0,36 ± 0,00	1,13 ± 0,07	0,93 ± 0,06	0,26 ± 0,00	14,71 ± 0,37
3 Mo	0,27 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,38 ± 0,04	8,89 ± 0,98	2,96 ± 0,36	0,51 ± 0,06	1,66 ± 0,08	1,36 ± 0,05	0,38 ± 0,02	16,83 ± 1,16
4 Mo	0,39 ± 0,14	0,55 ± 0,18	0,41 ± 0,01	9,11 ± 0,94	2,87 ± 0,66	0,79 ¹	1,94 ¹	1,64 ¹	0,48 ¹	18,05 ¹
6 Mo	0,26 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,38 ± 0,03	11,71 ± 0,21	4,15 ± 0,08	0,99 ± 0,19	2,69 ± 0,36	2,25 ± 0,32	0,65 ± 0,12	23,51 ± 1,11

Tabelle 11.42: Migration der *Extractables* 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 4 (0,1 % PS 20 in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,3). Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat, ausgedrückt in [µg/ml] ± SD, dargestellt. ¹ keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n < 3

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 Wo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,32 ± 0,12	0,41 ± 0,06	< LOQ	0,25 ¹	0,28 ¹	< LOQ	1,91 ± 0,18
1 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,11 ± 0,30	0,90 ± 0,11	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3,01 ± 0,41
2 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,14 ± 0,22	0,77 ± 0,07	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,90 ± 0,29
3 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,20 ± 0,08	0,80 ± 0,03	< LOQ	0,22 ± 0,05	0,25 ¹	< LOQ	3,28 ± 0,15
4 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2,15 ± 0,25	0,77 ± 0,06	< LOQ	0,23 ± 0,05	0,23 ¹	< LOQ	3,31 ± 0,49
6 Mo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,98 ± 0,24	1,03 ± 0,09	< LOQ	0,26 ± 0,00	0,18 ± 0,00	< LOQ	3,44 ± 0,18

Anhang

Tabelle 11.43: Migration der *Extractables* 1-9 aus Gummistopfen CB1 in Modellformulierung 7 (1,0 % PS 80 in 50 mM Citratpuffer pH 3,0). Die Ergebnisse sind als mittlere Konzentration an Trimellitat, ausgedrückt in [$\mu\text{g/ml}$] \pm SD, dargestellt.

Zeit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe
1 Wo	0,21 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	4,24 \pm 0,33	< LOQ	5,10 \pm 0,34				
1 Mo	0,35 \pm 0,04	0,57 \pm 0,03	0,40 \pm 0,02	8,63 \pm 0,08	1,13 \pm 0,03	0,23 \pm 0,00	0,83 \pm 0,09	0,77 \pm 0,08	< LOQ	12,91 \pm 0,25
2 Mo	0,36 \pm 0,08	0,58 \pm 0,03	0,42 \pm 0,04	10,36 \pm 1,32	1,59 \pm 0,21	0,32 \pm 0,10	1,29 \pm 0,19	1,15 \pm 0,20	0,29 \pm 0,05	16,37 \pm 1,87
3 Mo	0,39 \pm 0,00	0,55 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	11,24 \pm 0,37	2,49 \pm 0,09	0,59 \pm 0,09	2,09 \pm 0,39	1,90 \pm 0,38	0,51 \pm 0,15	20,06 \pm 1,45
4 Mo	0,39 \pm 0,06	0,52 \pm 0,02	0,46 \pm 0,023	12,38 \pm 1,39	2,70 \pm 0,38	0,92 \pm 0,13	2,44 \pm 0,38	2,30 \pm 0,36	0,65 \pm 0,12	22,75 \pm 2,28
6 Mo	0,43 \pm 0,05	0,42 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02	12,48 \pm 1,50	2,46 \pm 0,41	1,06 \pm 0,19	3,13 \pm 0,36	2,84 \pm 0,37	0,80 \pm 0,13	23,88 \pm 2,72

11.7 Einfluss der entfetteten Gummistopfenextrakte auf IgG

Tabelle 11.44 Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 entfettet. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 3). ¹ n.d. = nicht detektiert; ² keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n = 2; ³ keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n = 1

Ansatz 1: Probelösung mit Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	n.d. ¹	113 \pm 10	138 \pm 18	95 \pm 4	84 ²	74 \pm 2	55 \pm 2
Monomer	1216 ³	1004 \pm 71	1012 \pm 14	1016 \pm 17	963 \pm 58	929 \pm 21	985 \pm 29
Ansatz 2: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	n.d. ¹	154 \pm 15	197 \pm 17	217 \pm 17	210 \pm 11	215 \pm 22	219 \pm 21
Monomer	1258 ³	1026 \pm 17	1016 \pm 35	1031 \pm 35	984 \pm 23	970 \pm 30	1000 \pm 6

Tabelle 11.45: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt CB1 entfettet. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Extinktion in A (n = 2), die Trübung wurde nur für T_{0 min}, T_{70 min} und T_{130 min} gemessen. ¹ Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 1 und Ansatz 3; ² Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 2 und Ansatz 4

Ansatz 1: Probelösung mit Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung¹	0,0329	-	-	0,2493	-	-	0,4052
Ansatz 2: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt CB1							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung²	0,0031	-	-	0,0103	-	-	0,0177

Tabelle 11.46: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 entfettet. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 3). ¹ n.d. = nicht detektiert; ² keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, da n = 1

Ansatz 1: Probelösung mit Gummistopfenextrakt BB6							
	T₀ min	T₃₀ min	T₅₀ min	T₇₀ min	T₉₀ min	T₁₁₀ min	T₁₃₀ min
Aggregat	n.d. ¹	91 \pm 1	115 \pm 9	121 \pm 5	128 \pm 9	145 \pm 3	150 \pm 3
Monomer	1245 ²	1049 \pm 33	1050 \pm 33	1032 \pm 31	1024 \pm 32	1044 \pm 17	1053 \pm 25
Ansatz 2: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt BB6							
	T₀ min	T₃₀ min	T₅₀ min	T₇₀ min	T₉₀ min	T₁₁₀ min	T₁₃₀ min
Aggregat	n.d. ¹	131 \pm 17	162 \pm 16	182 \pm 18	188 \pm 16	209 \pm 15	221 \pm 13
Monomer	1248 ²	1065 \pm 60	1036 \pm 46	1028 \pm 53	1004 \pm 49	1015 \pm 39	1055 \pm 65

Tabelle 11.47: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Gummistopfenextrakt BB6 entfettet. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Extinktion in A (n = 2), die Trübung wurde nur für T0 min, T70 min und T130 min gemessen. ¹ Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 1 und Ansatz 3; ² Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 2 und Ansatz 4

Ansatz 1: Probelösung mit Gummistopfenextrakt BB6							
	T₀ min	T₃₀ min	T₅₀ min	T₇₀ min	T₉₀ min	T₁₁₀ min	T₁₃₀ min
Trübung¹	0,0014	-	-	0,0139	-	-	0,0159
Ansatz 2: Probelösung ohne Gummistopfenextrakt BB6							
	T₀ min	T₃₀ min	T₅₀ min	T₇₀ min	T₉₀ min	T₁₁₀ min	T₁₃₀ min
Trübung²	0,0029	-	-	0,0129	-	-	0,0134

11.8 Einfluss von Silikonöl auf IgG

Tabelle 11.48: Ergebnisse der SEC-Messung von IgG – Silikonöl. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Fläche in FE \pm SD (n = 3). ¹ n.d. = nicht detektiert; ² keine Angabe der Standardabweichung (SD) möglich, n = 1

Ansatz 1: Probelösung mit Silikonöl							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	n.d. ¹	64 \pm 7	128 \pm 9	174 \pm 15	193 \pm 16	222 \pm 29	247 \pm 31
Monomer	1239 ²	1032 \pm 42	1013 \pm 17	1015 \pm 26	953 \pm 34	974 \pm 32	1015 \pm 27
Ansatz 2: Probelösung ohne Silikonöl							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Aggregat	n.d. ¹	74 \pm 3	117 \pm 7	145 \pm 12	160 \pm 14	175 \pm 21	197 \pm 21
Monomer	1241 ²	1043 \pm 40	1050 \pm 52	1063 \pm 39	1008 \pm 43	1025 \pm 28	1071 \pm 26

Tabelle 11.49: Ergebnisse der Trübungsmessung von IgG – Silikonöl. Die Ergebnisse sind dargestellt als mittlere Extinktion in A (n = 2), die Trübung wurde nur für T0 min, T70 min und T130 min gemessen. ¹ Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 1 und Ansatz 3; ² Trübung ist die Differenz der gemessenen Extinktion von Ansatz 2 und Ansatz 4

Ansatz 1: Probelösung mit Silikonöl							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung¹	0,0037	-	-	0,0095	-	-	0,0133
Ansatz 2: Probelösung ohne Silikonöl							
	T_{0 min}	T_{30 min}	T_{50 min}	T_{70 min}	T_{90 min}	T_{110 min}	T_{130 min}
Trübung²	0,0020	-	-	0,0082	-	-	0,0094

11.9 Ergebnisse der Entfettung von Gummistopfen CB1

Tabelle 11.50: Ergebnisse der Entfettung von Gummistopfen CB1. 10 Gummistopfen wurden gemäß Kapitel 9.5 extrahiert und das resultierende Spülwasser hinsichtlich des Gehalts an Silikonöl mittels AAS analysiert.

C _{Standard}	Silikonöl [ppm]	Signal [A]	Spülwasser-Probe
	5,56	0,0103	Signal [A]
	8,34	0,0159	0,0182
	11,12	0,0212	0,0203
	13,90	0,0285	Mittelwert Signal [A]
Steigung		0,00215	0,0193
y-Achsenabschnitt		-0,00199	Gehalt Silikonöl [ppm]
Bestimmtheitsmaß		0,9945	9,86

11.10 Chromatogramme zur Auswertung von EPO – Extractables

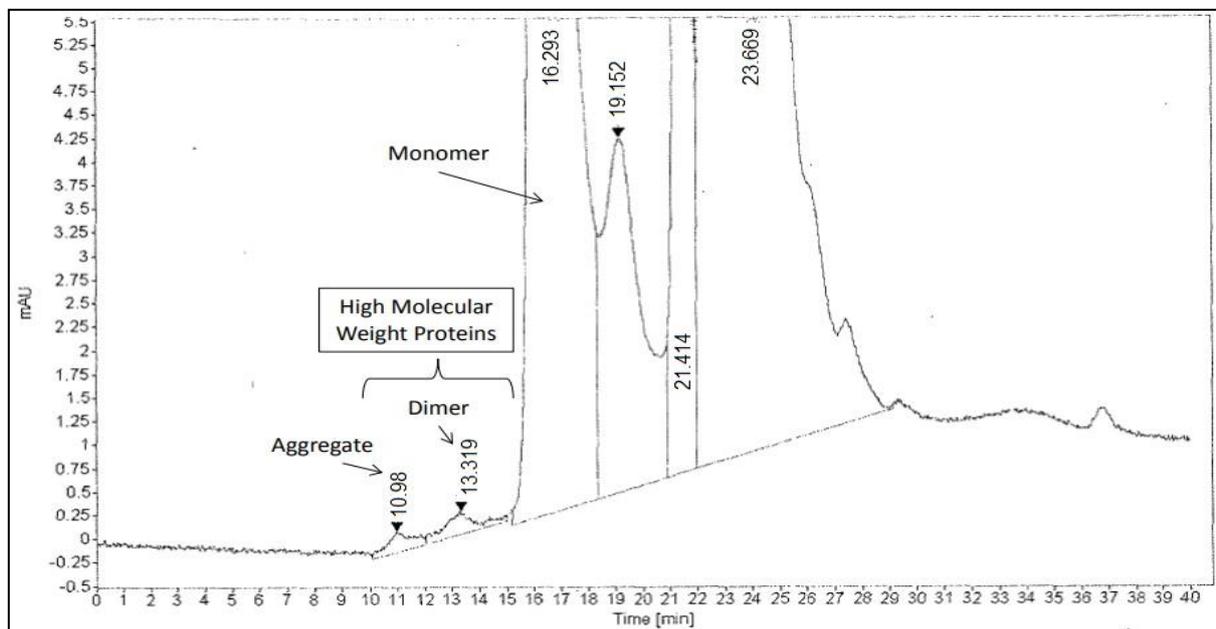


Abbildung 11.13: Chromatogramm von EPO als Zoom zur besseren Darstellung der einzelnen EPO-Spezies. Neben dem EPO-Monomer wurden die gebildeten HMWPs (*High Molecular Weight Proteins*) in Form einer EPO-Aggregat-Spezies und einem EPO-Dimer detektiert. Wellenlänge: 214 nm

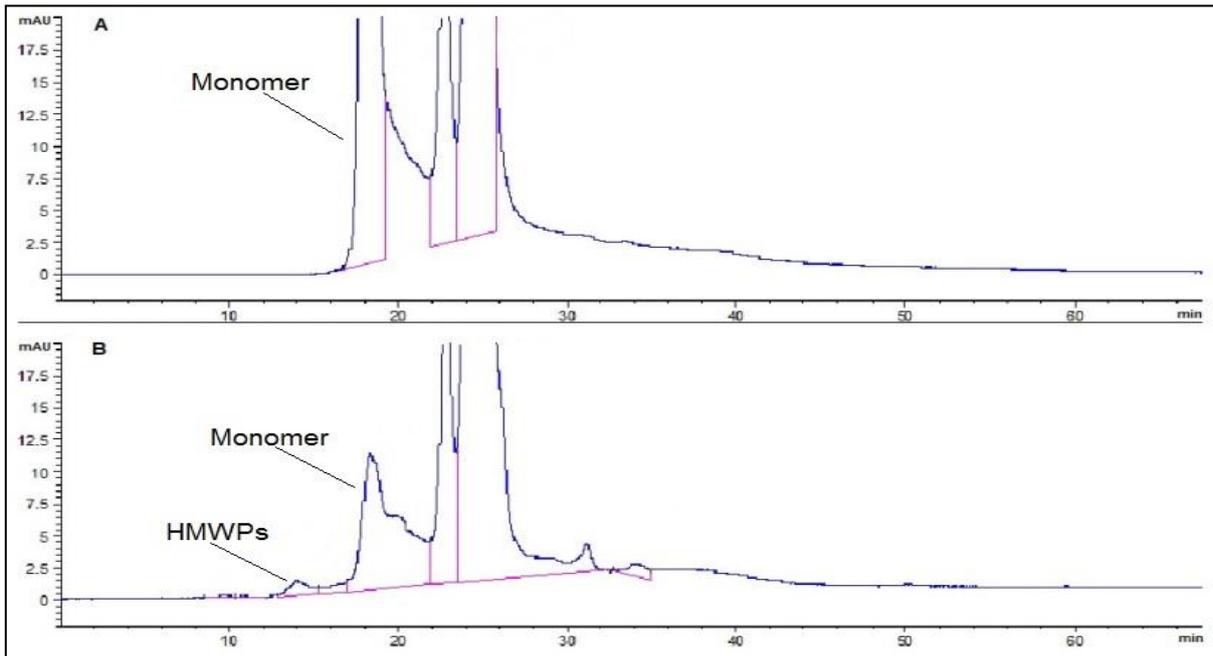


Abbildung 11.14: Chromatogramme von EPO in 0,1 % m/v PS20-ACN-Lösung nach 8 Tagen Lagerung bei 55 °C. Graph A zeigt EPO ohne Gummistopfenextrakt CB1 und nur in PS20-ACN-Lösung (Ansatz 1), Graph B zeigt EPO unter analogen Lagerbedingungen aber in Gegenwart von Gummistopfenextrakt CB1, wobei die Bildung der HMWPs und die gleichzeitige Abnahme des EPO-Monomers ersichtlich ist. Wellenlänge: 214 nm

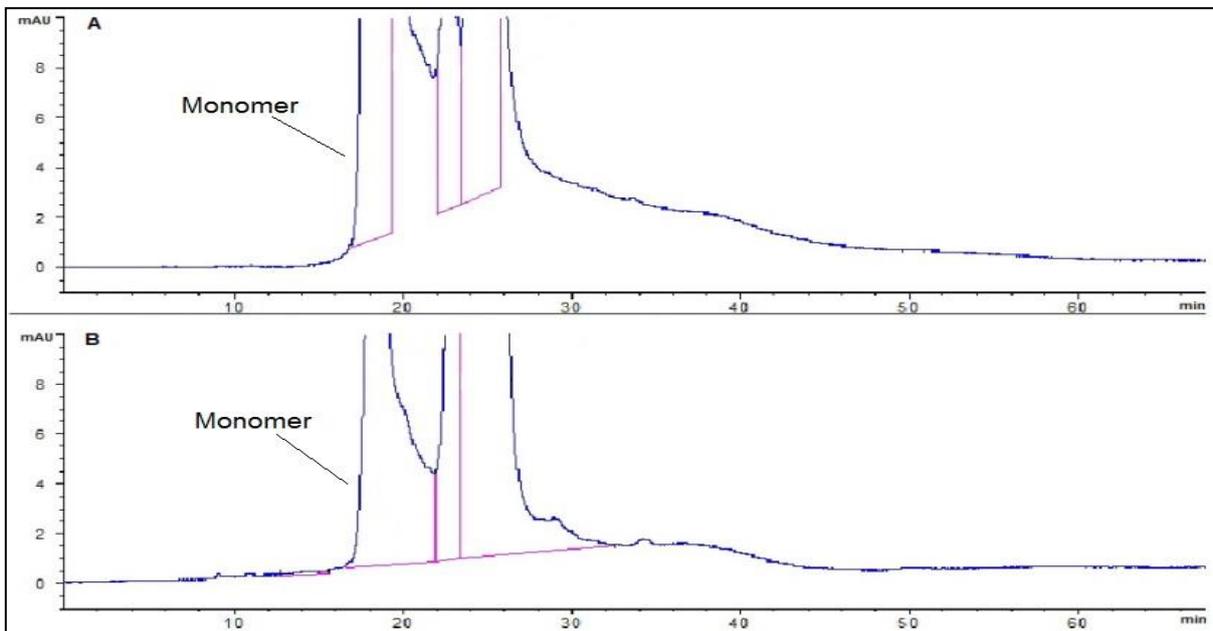


Abbildung 11.15: Chromatogramme von EPO in 0,1 % m/v PS20-ACN-Lösung in Abhängigkeit von der Lagerdauer bei 55 °C. Die Chromatogramme zeigen EPO in PS20-ACN-Lösung (Ansatz 1) zum Zeitpunkt T0 (Graph A) und nach acht Wochen Lagerung bei 55 °C (Graph B). Wellenlänge: 214 nm

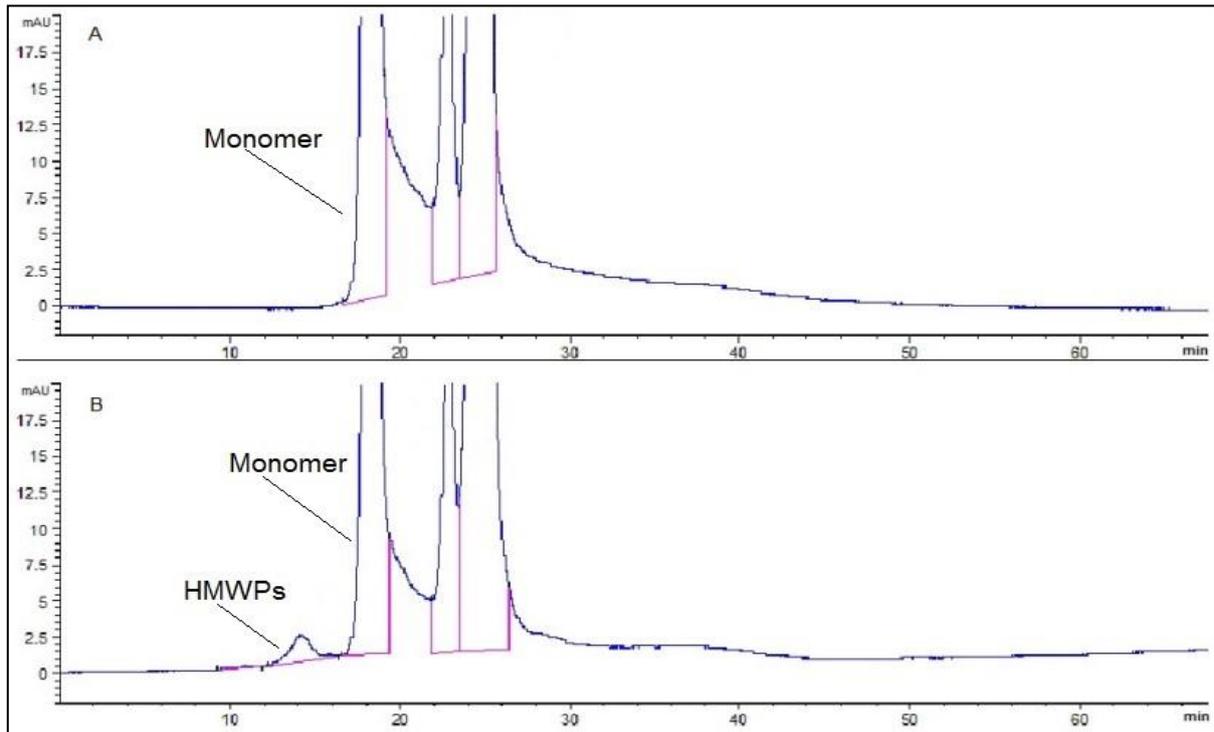


Abbildung 11.16: Chromatogramme von EPO in Gegenwart des Gummistopfenextrakts CB1 in Abhängigkeit von der Lagerdauer. Graph A zeigt EPO in Gegenwart des Gummistopfenextrakts CB1 (Ansatz 3) zum Zeitpunkt T0 (Graph A) und nach 8 Tagen Lagerung bei 55 °C (Graph B). Wellenlänge: 214 nm

11.11 Strukturaufklärung der Extractables 6-9 von CB1

11.11.1 MS-Spektren der Substanzen *Extractables* 7-9

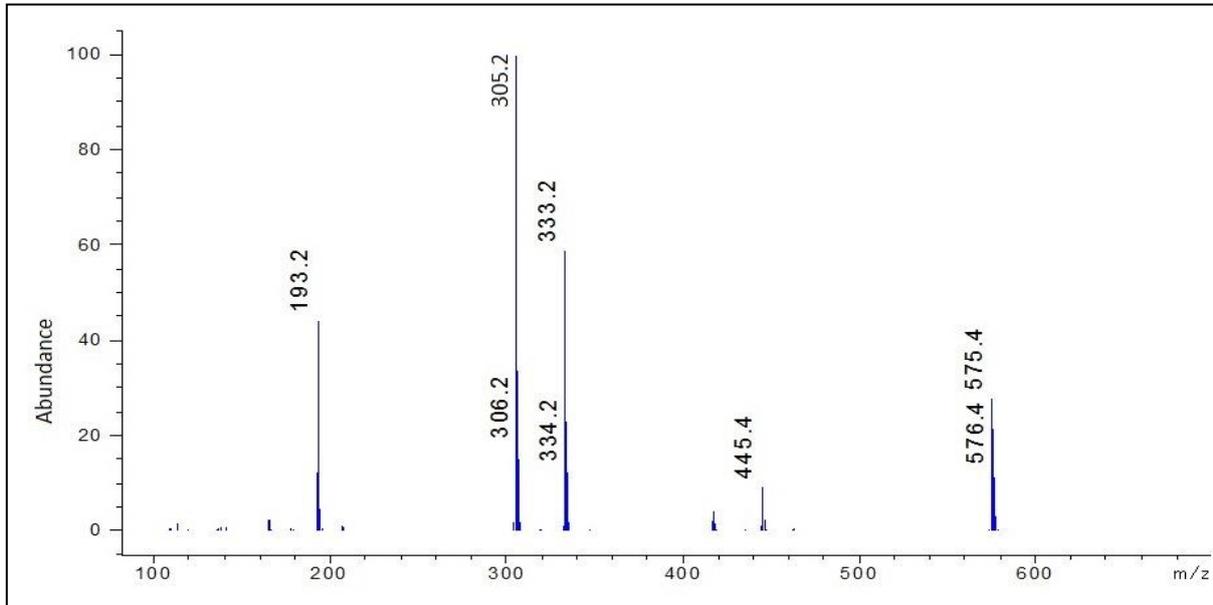


Abbildung 11.17: MS-Spektrum von *Extractable* 7. Das MS-Spektrum beinhaltet das $[M+H]^+$ -Signal 576,4 / 575,4 m/z sowie Fragmente mit 445,4 – 334,2 / 333,2 – 306,2 / 305,2 - 193,2 m/z.

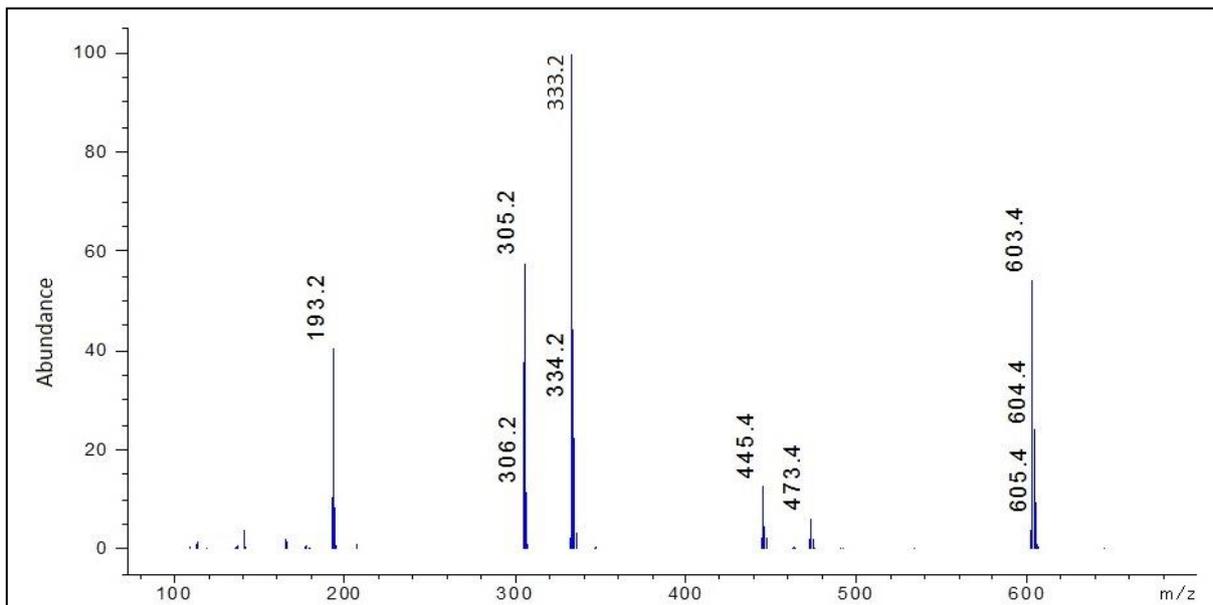


Abbildung 11.18: MS-Spektrum von *Extractable* 8. Das MS-Spektrum beinhaltet das $[M+H]^+$ -Signal 605,4 / 604,4 / 603,4 m/z sowie Fragmente mit 473,4 - 445,4 – 334,2 / 333,2 – 306,2 / 305,2 - 193,2 m/z.

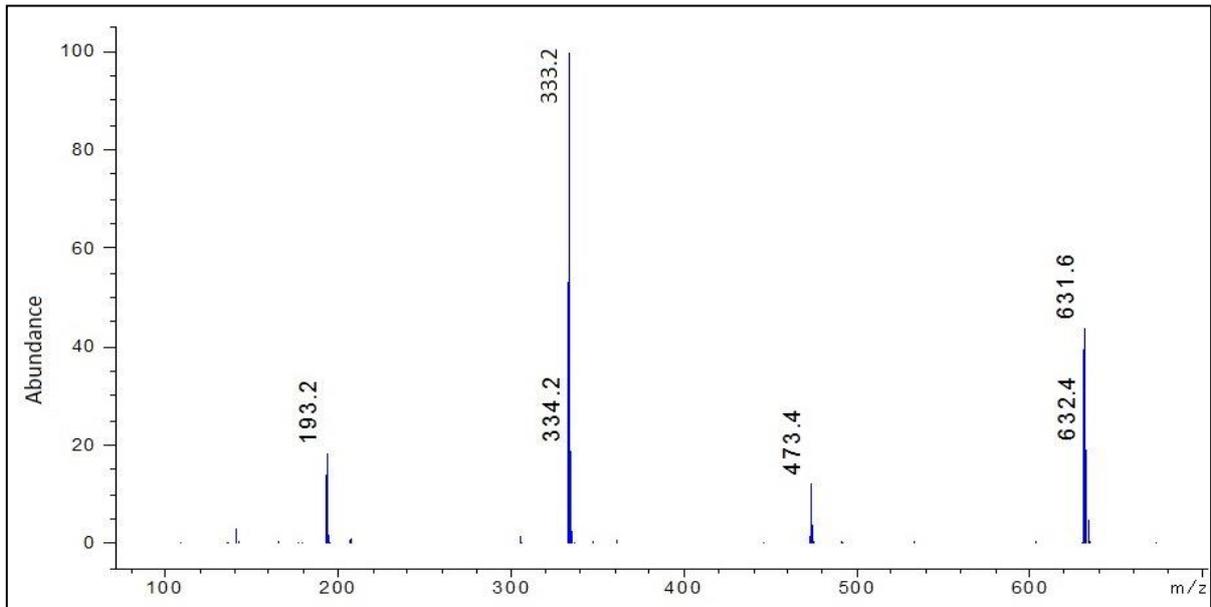


Abbildung 11.19: MS-Spektrum von *Extractable 9*. Das MS-Spektrum beinhaltet das $[M+H]^+$ - Signal 632,4 / 631,6 m/z sowie Fragmente mit 473,4 – 334,2 / 333,2 - 193,2 m/z.

11.11.2 NMR-Spektren der *Extractables* 6-9

11.11.2.1 NMR-Spektren von *Extractable* 6

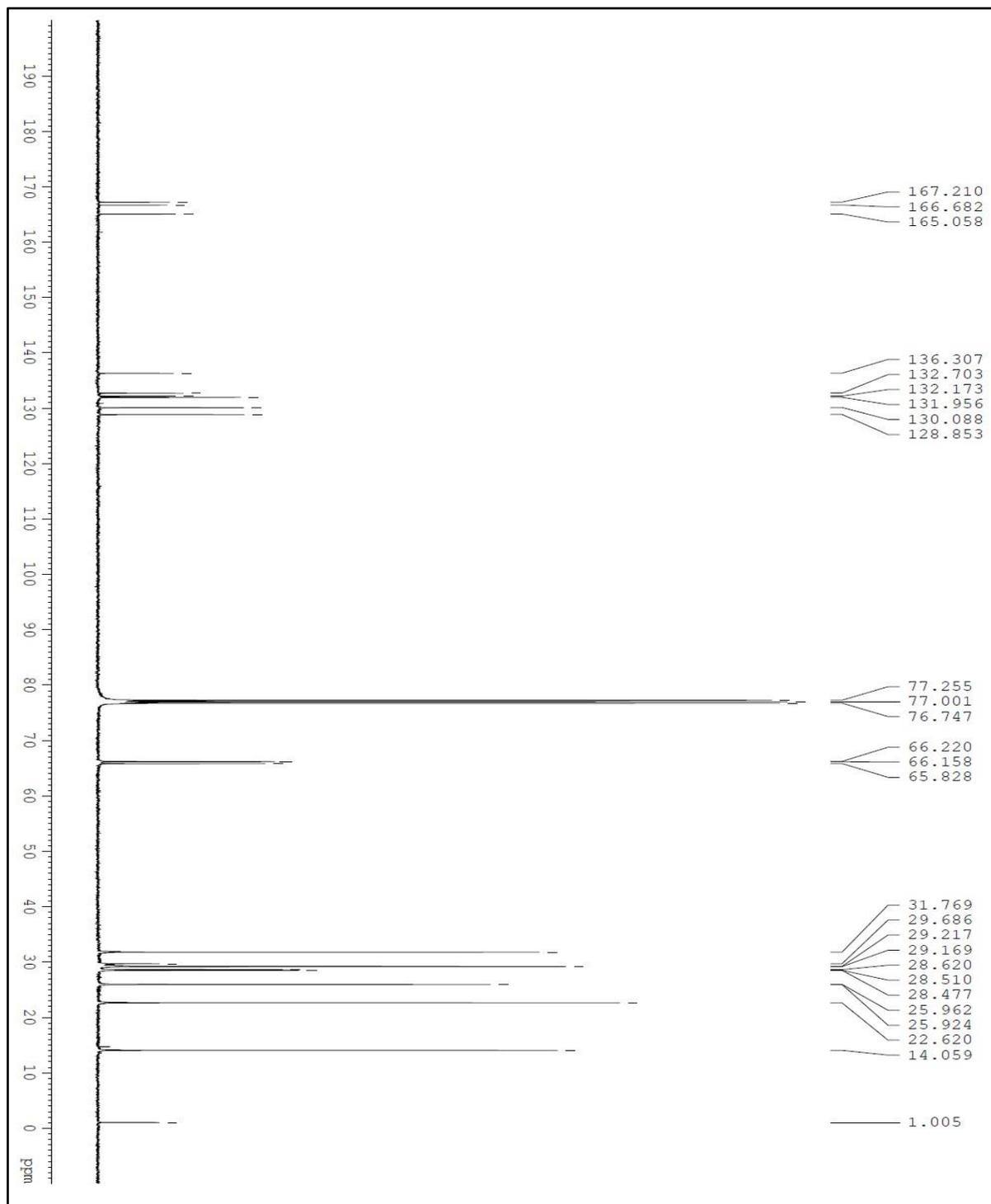


Abbildung 11.20: ¹³C-NMR-Spektrum von *Extractable* 6. Die Integrale sind den Signalen zugeordnet.

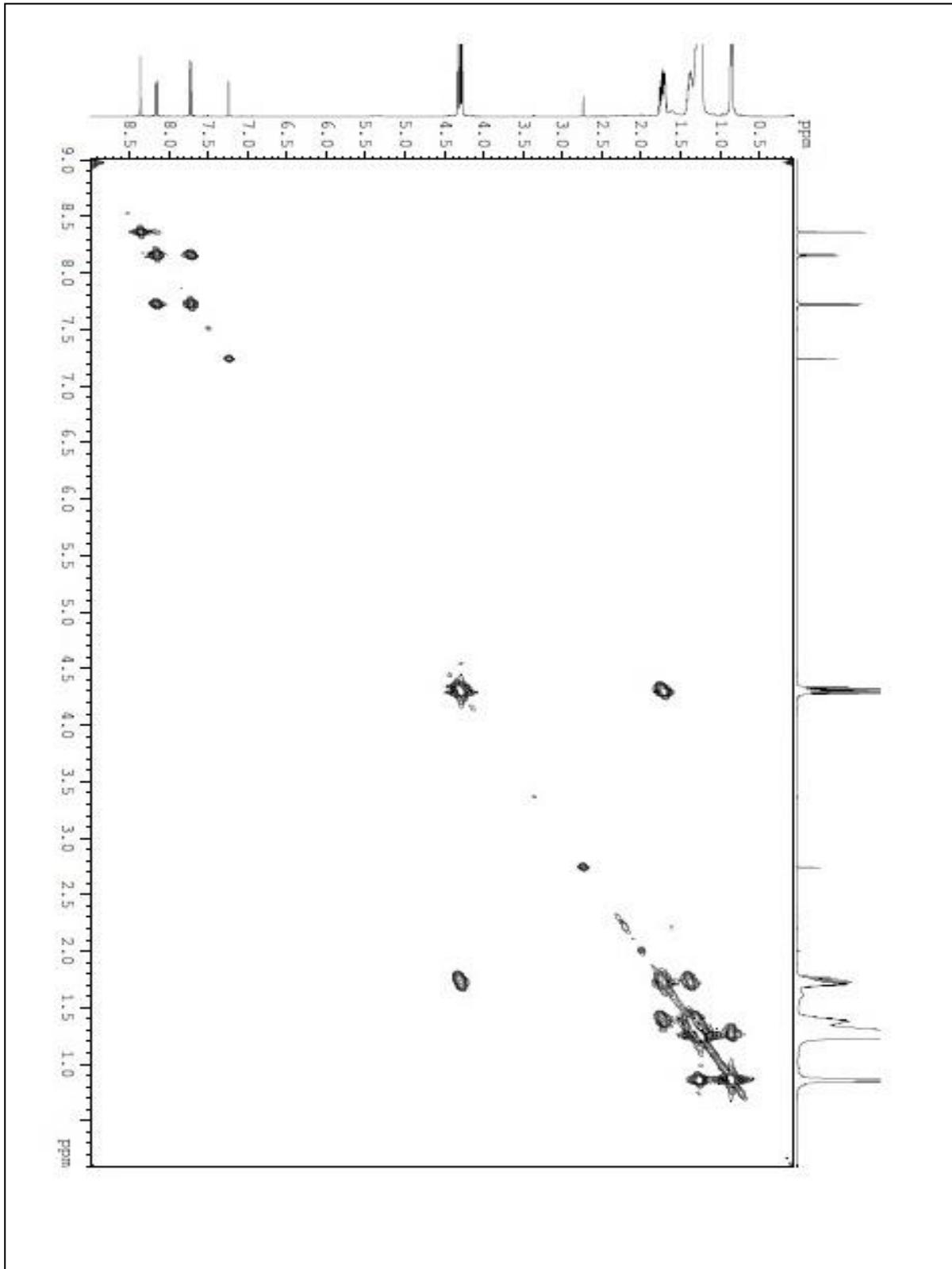


Abbildung 11.21: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von *Extractable 6*. Auf beiden Achsen wurden die ^1H -NMR-Signale von *Extractable 6* aufgetragen.

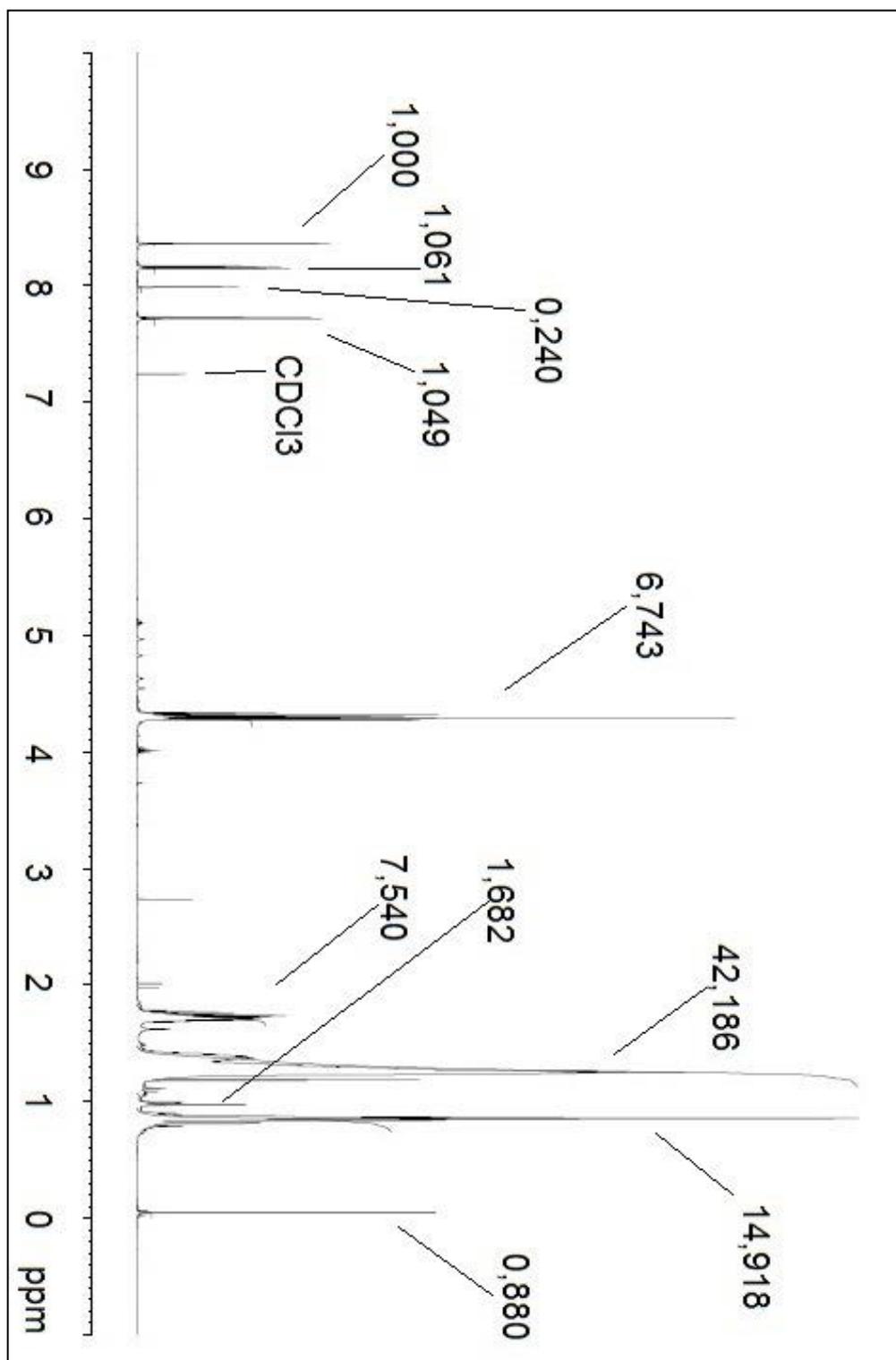
11.11.2.2 NMR-Spektren von *Extractable 7*

Abbildung 11.22: ¹H-NMR-Spektrum von *Extractable 7*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet.

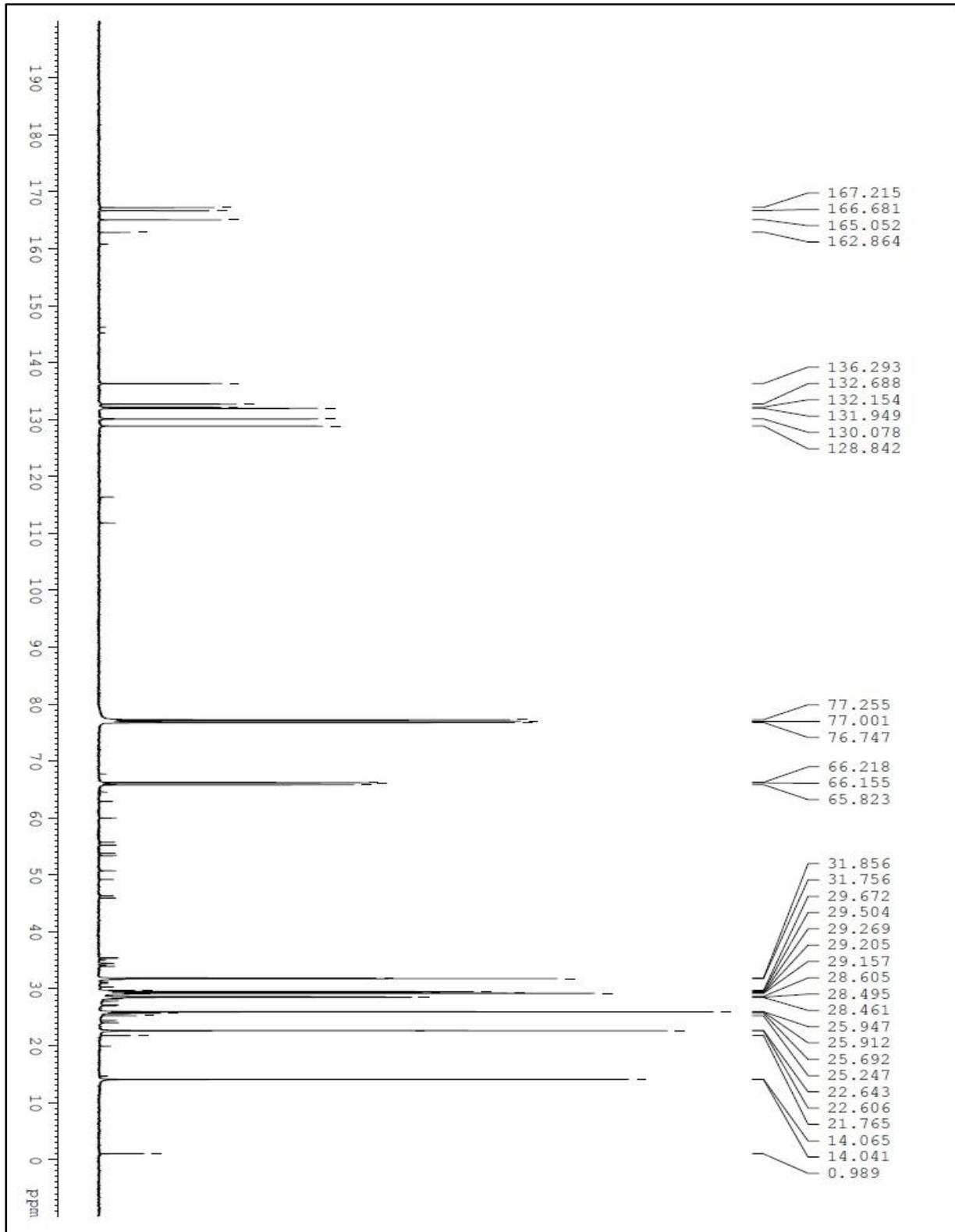


Abbildung 11.23: ^{13}C -NMR-Spektrum von *Extractable 7*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet.

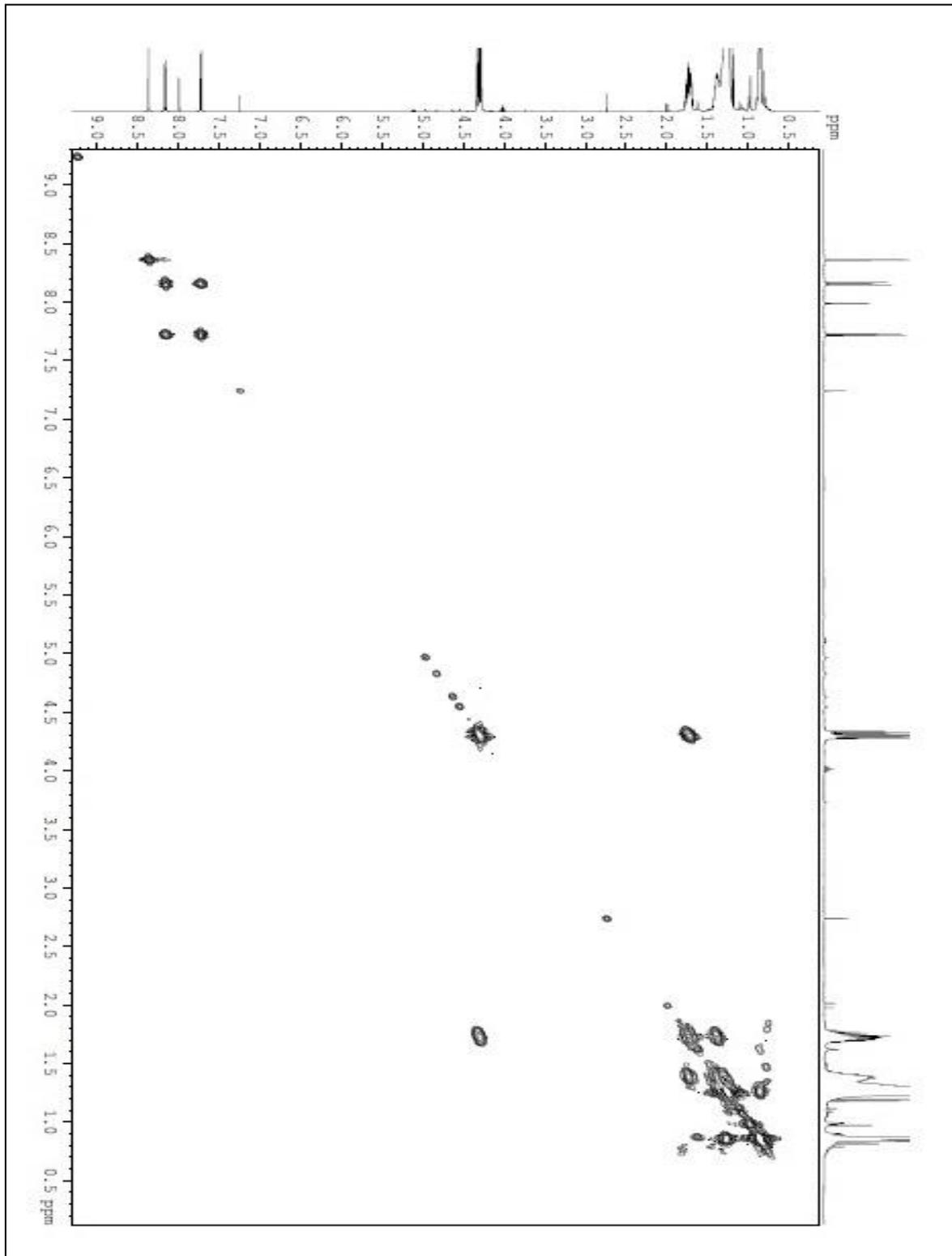


Abbildung 11.24: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von *Extractable 7*: Auf beiden Achsen wurden die ^1H -NMR-Signale von *Extractable 7* aufgetragen.

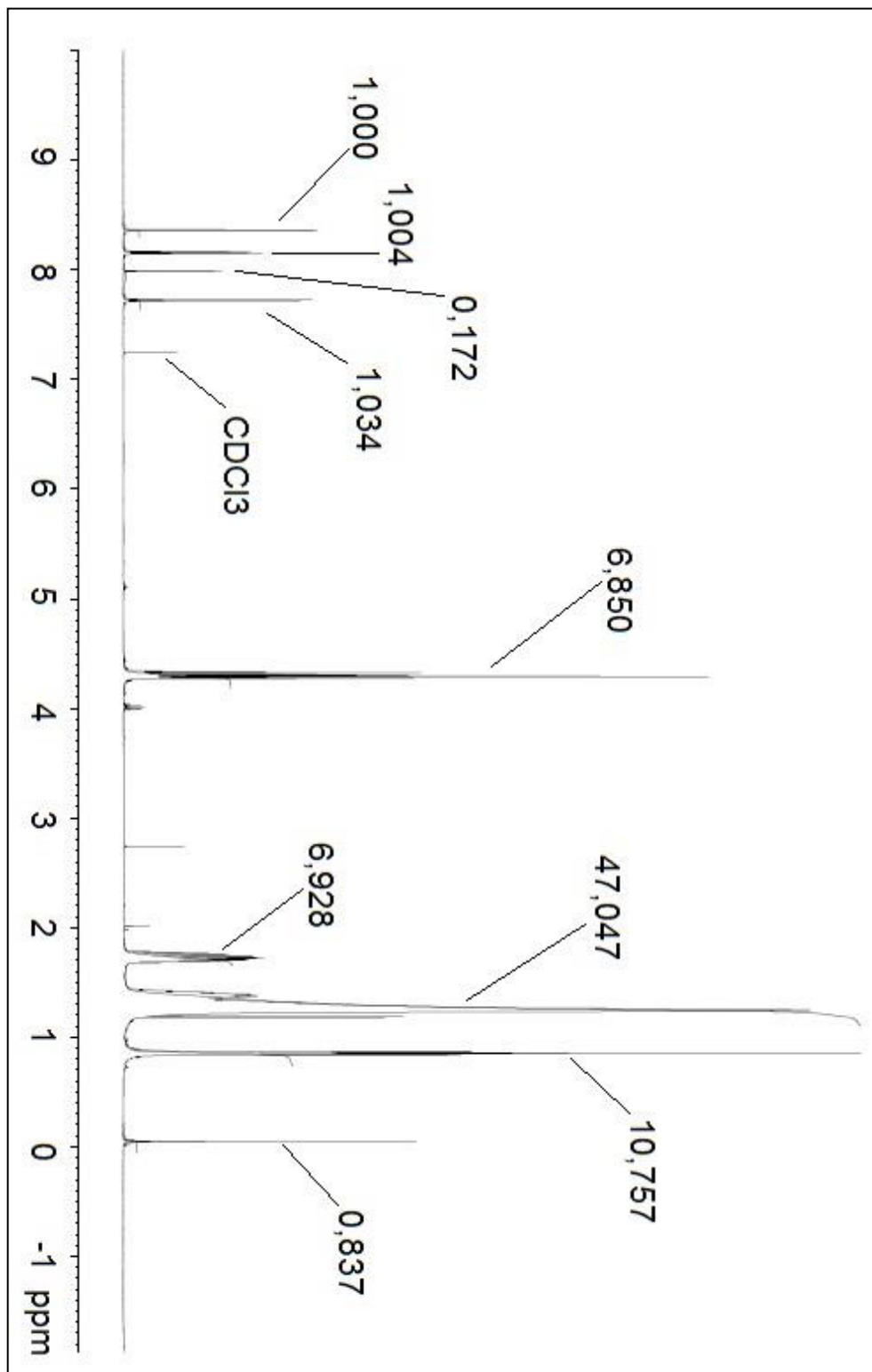
11.11.2.3 NMR-Spektren von *Extractable 8*

Abbildung 11.25: ¹H-NMR-Spektrum von *Extractable 8*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet.

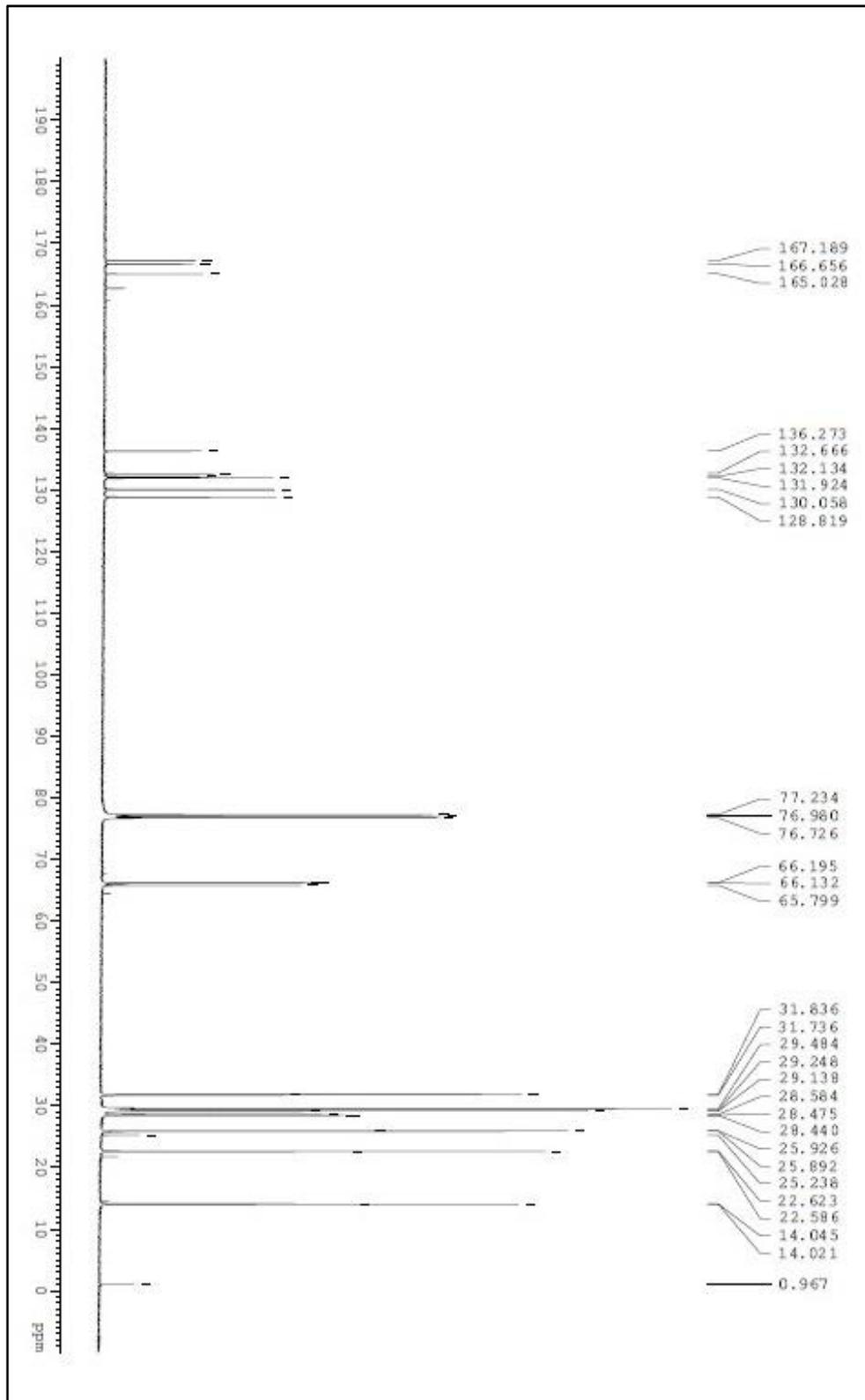


Abbildung 11.26: ^{13}C -NMR-Spektrum von *Extractable 8*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet.

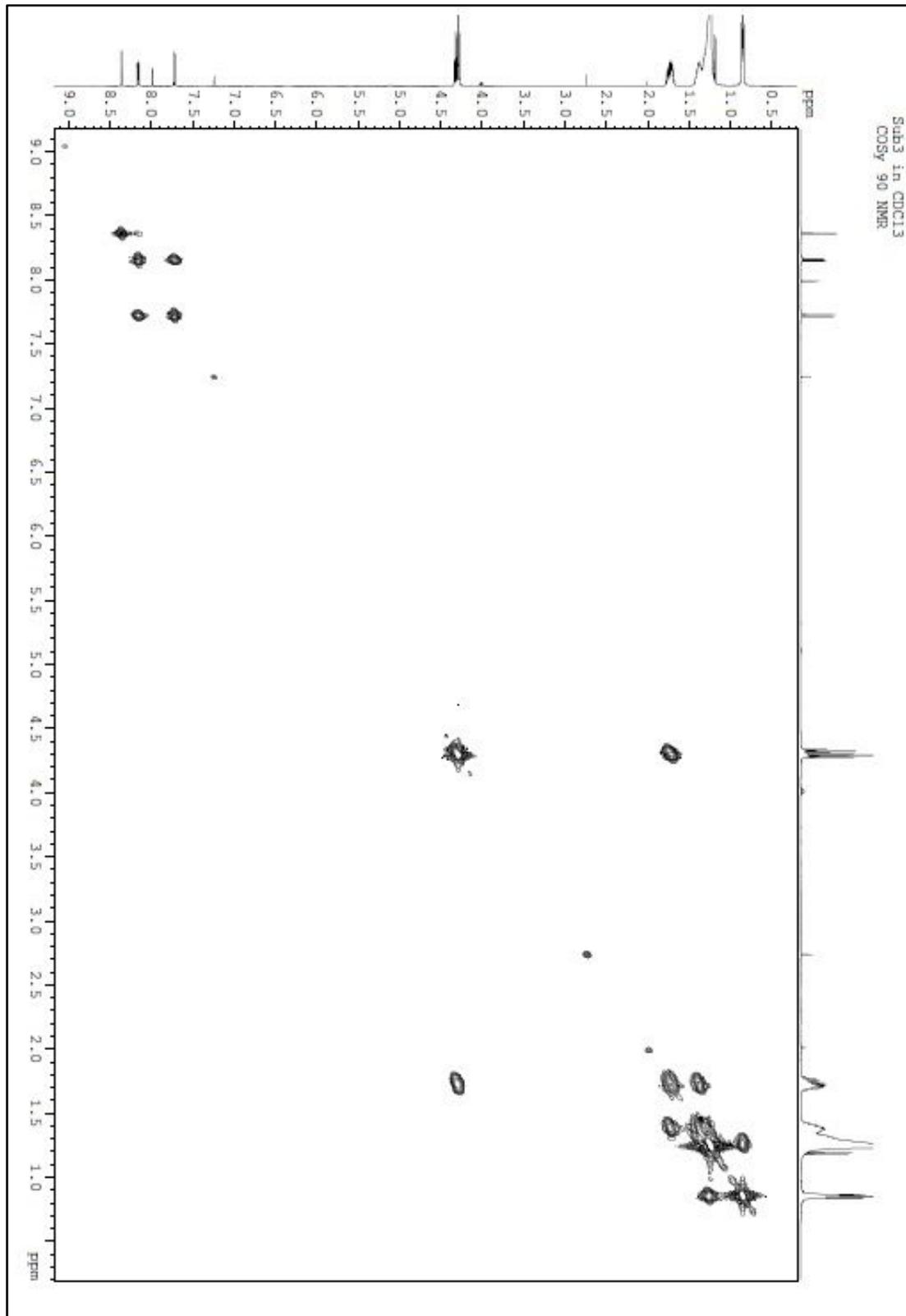


Abbildung 11.27: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von *Extractable 8*. Auf beiden Achsen wurden die ^1H -NMR-Signale von *Extractable 8* aufgetragen.

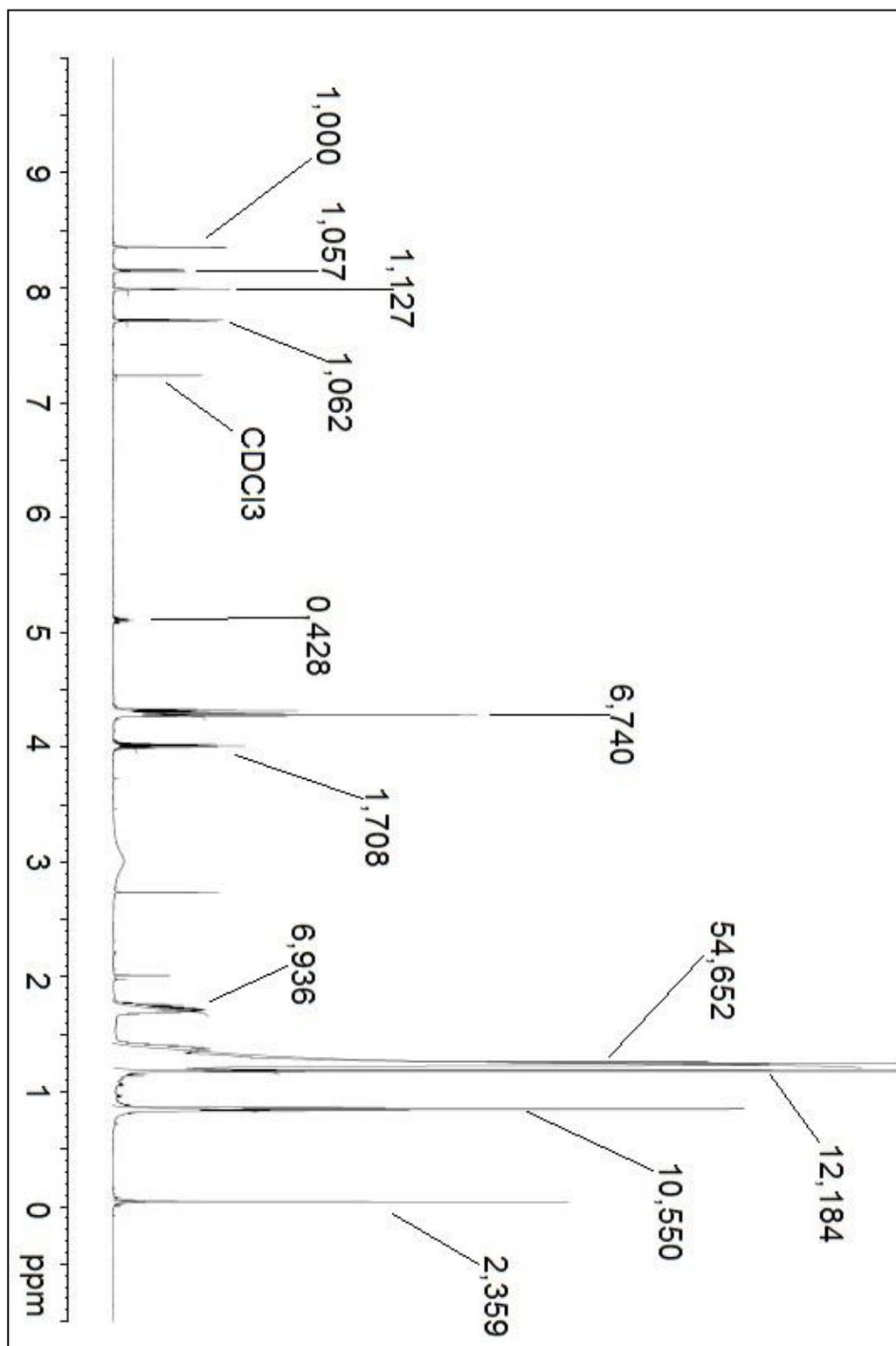
11.11.2.4 NMR-Spektren von *Extractable 9*

Abbildung 11.28: ¹H-NMR-Spektrum von *Extractable 9*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet.

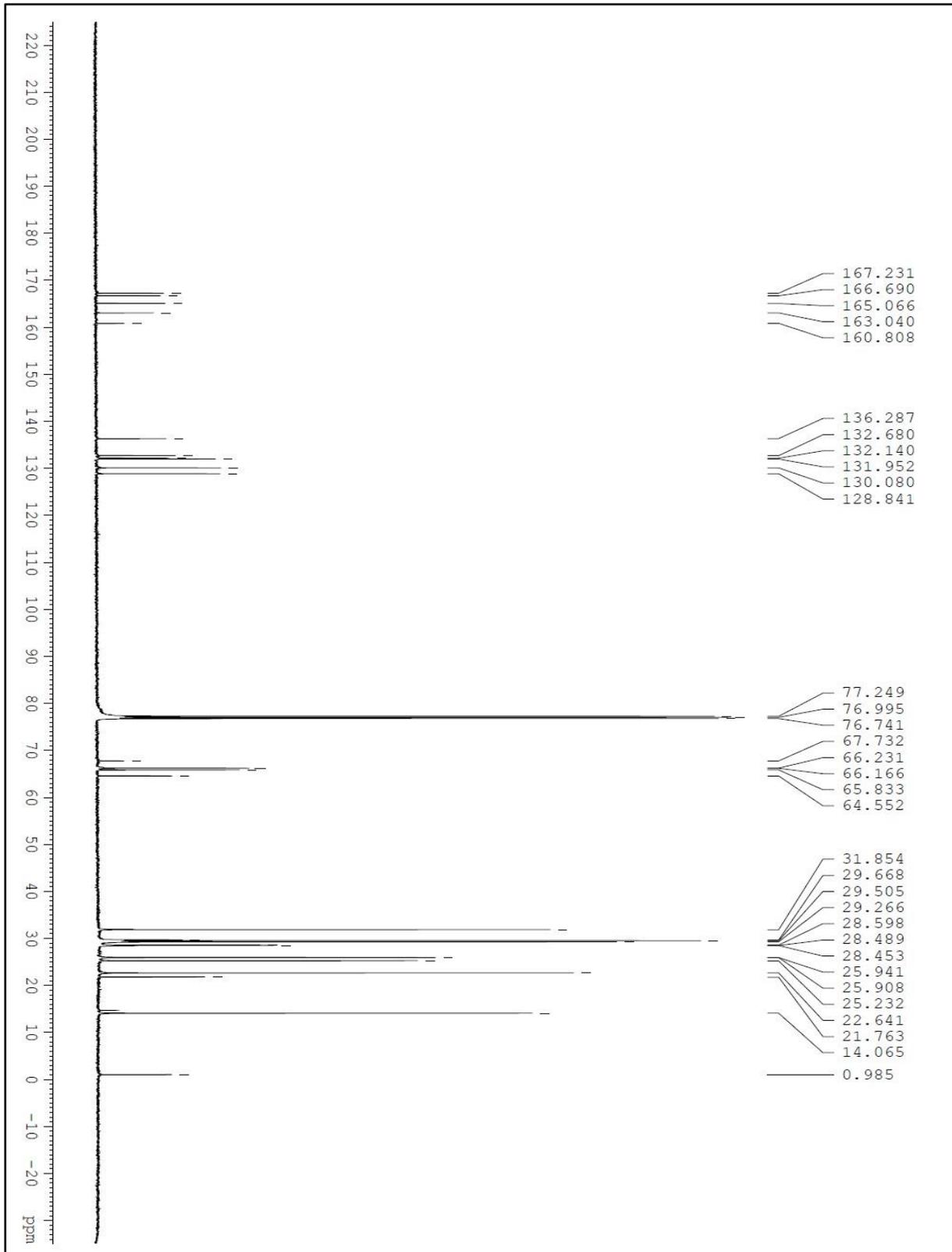


Abbildung 11.29: ^{13}C -NMR-Spektrum von *Extractable 9*. Die Integrale sind den einzelnen Signalen zugeordnet.

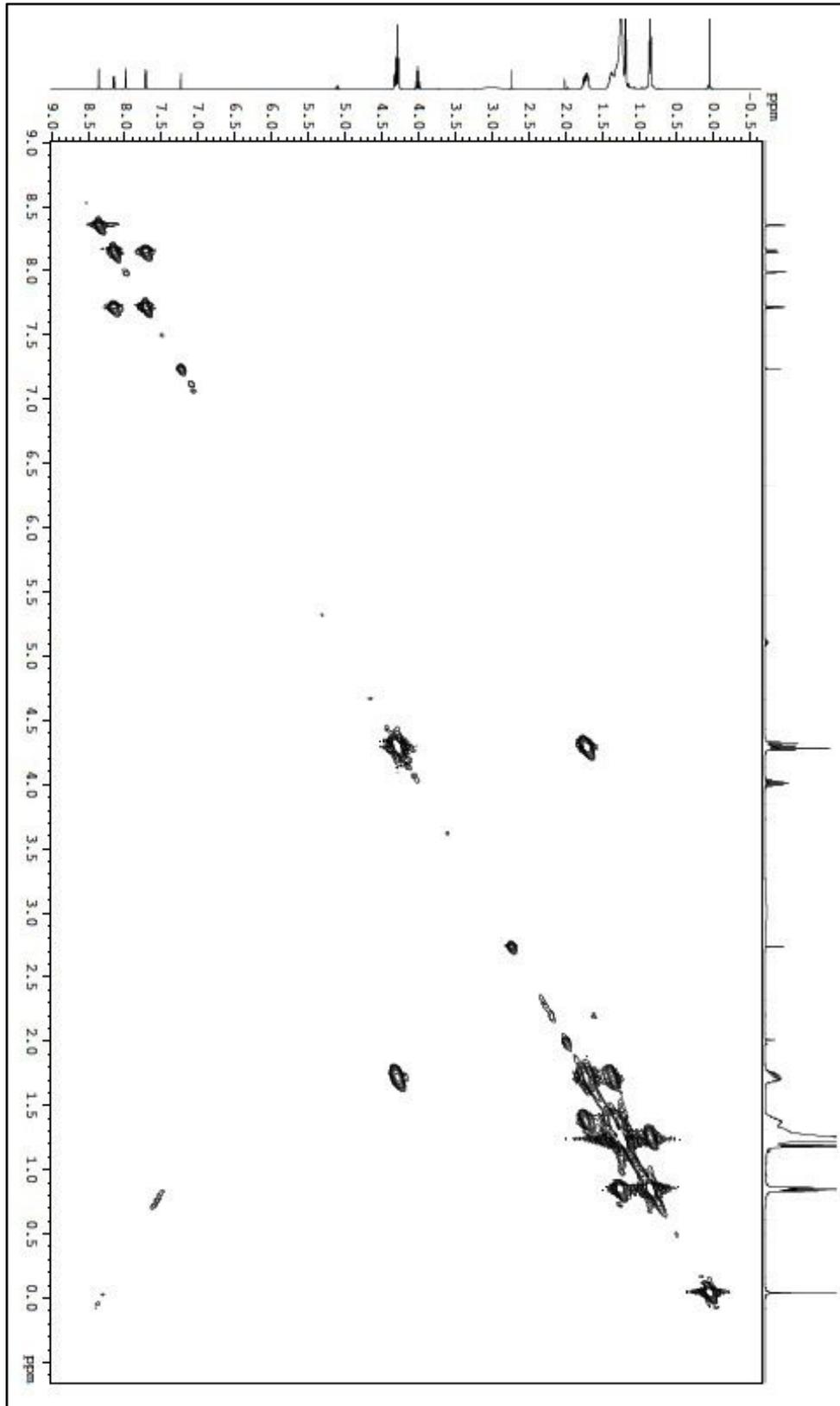


Abbildung 11.30: ^1H , ^1H -Cosy-Spektrum von *Extractable 9*. Auf beiden Achsen wurden die ^1H -NMR-Signale von *Extractable 9* aufgetragen.