

GC-MS basierte Methode als alternative Diagnostik zur Identifizierung defekter Silikonbrustimplantate

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Pia Rosendahl

geboren in Duisburg

Angewandte Analytische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2013 bis Oktober 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver J. Schmitz in der Angewandten Analytischen Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 03. Mai 2016

Gutachter: Prof. Dr. O. J. Schmitz

Prof. Dr. A. V. Hirner

Vorsitzende: Prof. Dr. K. Stachelscheid

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„GC-MS basierte Methode als alternative Diagnostik zur Identifizierung defekter Silikonbrustimplantate“

selbstständig verfasst, eigenständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe und dass die Arbeit in dieser oder in einer ähnlichen Form bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Ich habe weder in diesem noch einem anderen Fach ein gescheitertes Promotionsverfahren durchlaufen.

Essen, den 26. Februar 2016

(Pia Rosendahl)

Danksagung

Zu allererst möchte ich meiner besseren Hälfte Ingo und meiner Familie danken, die mich auf diesem Weg begleitet und gleichzeitig für Motivation, viel Essen und Zerstreuung gesorgt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver J. Schmitz für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine fachliche Betreuung und Unterstützung bei jeglichem Diskussionsbedarf sowie für die Möglichkeit, mich frei mit verschiedenen Fragestellungen auch neben meinem Promotionsthema auseinander zu setzen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Alfred V. Hirner, der den Grundstock für dieses interessante Thema lieferte, für seine Silikon-Büchersammlung und die Übernahme des Koreferats.

Ein großer Dank gilt der Mediziner-Fraktion vom Universitätsklinikum Essen, Dr. Peter Rusch, Dr. Oliver Hoffmann und Dr. Cornelia Jonkmanns-Nowacki. Danke für die unkomplizierte Zusammenarbeit, ausführlichen Erklärungen (auch für Nicht-Mediziner) sowie für die MRT- und SONO-Bilder.

Ebenso möchte ich meinen Kollegen aus der AAC danken:

Jörg und Maria, das Inventar und die Ersthelfer, wenn Not am Mann/Frau ist. Max, Sonja und Susanne: Danke für erheiternde Diskussionsrunden bei Kaffee, Kinderriegel, Würstchen und Co. Robin, Maren und Jennifer: die fleißigen Laboranten und Proben-Abholer und natürlich den nicht namentlich genannten Mitarbeitern.

Des Weiteren möchte ich mich bei Marco Nestola (Axel Semrau GmbH & Co. KG) sowie bei den Unternehmen Sigma Aldrich Sigma-Aldrich, Restek GmbH, Gerstel GmbH & Co. KG und Macherey-Nagel GmbH & Co. KG für ihre Unterstützung und die Bereitstellungen von Equipment und Verbrauchsmaterialien bedanken.

Dankeschön auch an Dr. Olga Müller, Thomas Knura und Xochitli Osorio für Ihre tatkräftige Unterstützung sowie die Epifluoreszenz- und ITEX-GC-MS-Messungen.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanken.

„Forschung ist wie SODOKU, man braucht etwas Glück und Durchhaltevermögen“

Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	Erste bzw. zweite Dimension
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Afssaps	Französische Agentur für die Sicherheit von Gesundheitsprodukten (franz. <i>Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé</i>)
ALCL	Non-Hodgin-Lymphom (engl. <i>anaplastic large cell lymphoma</i>)
APCI	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (engl. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
API	Atmosphärendruck-Ionisation (engl. <i>atmospheric pressure ionization</i>)
APPI	Atmosphärendruck-Photoionisation
ATR-FT-IR	Abgeschwächter Totalreflexion-Fourier-Transformation-Infrarot- spektroskopie (engl. <i>attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy</i>)
BCF	Biokonzentrationsfaktor (engl. <i>bioconcentration factor</i>)
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel- und Medizinprodukte
BMF	Biomagnifikation Faktor
BSTFA	N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cVMS	zyklische, flüchtige Methylsiloxane (engl. <i>cyclic volatile methylsiloxanes</i>)
DMSD	Dimethylsilandiol
Dn	zyklische Methylsiloxane (n = 3-7)
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	<i>Extracted Ion</i> -Chromatogramme
engl.	englisch
ESI	Elektrospray-Ionisation
FDA	Amerikanische Lebensmittelüberwachung- und Arzneimittelzulassungs- behörde (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FI	Fließinjektion
FID	Flammenionisationsdetektor
franz.	französisch
GC	Gaschromatographie / Gaschromatograph
GC-GC	Zweidimensionale Gaschromatographie; „ <i>Heart-cutting</i> “-GC

GCxGC	Komprehensive zweidimensionale Gaschromatographie
GL	Glasliner
H	Bodenhöhe
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HS	Analyse des Dampfraumes (engl. <i>headspace</i>)
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma (engl. <i>inductively coupled plasma</i>)
I.E.	Ionisierungspotential (engl. <i>ionization energy</i>)
IR	Infrarot
ITEX	<i>in-tube extraction</i>
k. A.	keine Angaben
Kap.	Kapitel
L	Länge
l bzw. li	linke Seite
LMW	niedermolekular (engl. <i>low molecular weight</i>)
Ln	lineare Methylsiloxane
LOD	Nachweisgrenzen (engl. <i>limit of detection</i>)
LOEL	Niedrigste beobachtbare Wirkungskonzentrationen (engl. <i>lowest observed effect level</i>)
log K _{OC}	Verteilungskoeffizient des Phasensystems organischer Kohlenstoff-Wasser
log K _{OW}	Verteilungskoeffizient des 2-Phasensystems 1-Oktanol-Wasser
LOQ	Bestimmungsgrenzen (engl. <i>limit of quantitation</i>)
LVI	engl. <i>large volume injection</i>
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
M1; M2	Methode M1 (splitlos GC-MS), Methode M2 (LVI-GC-MS)
M4Q	Tetrakis(trimethylsiloxyl)silan
MDL	Nachweisgrenze der Methode (engl. <i>method detection limit</i>)
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
N, N _{eff}	Bodenzahl, effektive Bodenzahl
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
n. n.	nicht nachgewiesen
n. o.	nicht operiert

NOEC	Expositionskonzentration, bei der keine signifikante behandlungsbedingte Wirkung beobachtet werden kann (engl. <i>no observed effect concentration</i>)
Nr.	Nummer
Pat.	Patient
PCP	Körperpflegeprodukten (engl. <i>personal care products</i>)
PDMS	Poly(dimethyl)siloxan
PEG	Polyethylenglycol
PIP	Poly Implant Prothèse (französischer SBI-Hersteller)
POP	Persistente organische Schadstoffe (engl. <i>persistent organic pollutants</i>)
PTV	Temperaturprogrammierbares Injektionssystem (engl. <i>programmed temperature vaporization</i>)
r bzw. re	rechte Seite
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RSD	Relative Standardabweichung
RTV	Vulkanisierung bei Raumtemperatur (engl. <i>room-temperature vulcanization</i>)
s.	siehe
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis (engl. <i>signal-to-noise</i>)
SBI	Silikonbrustimplantat (engl. <i>silicone breast implant</i>)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> (MS-Modus)
SONO	Mammasonographie (Brustultraschall)
SPE	Festphasenextraktion (engl. <i>solid phase extraction</i>)
SPME	Festphasenmikroextraktionstechnik (engl. <i>solid phase microextraction</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Gesamtionenstrom (engl. <i>total ion current</i>)
t _R , t ₀	Retentionszeit, Totzeit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
VB	Vertrauensbereich
vgl.	vergleiche
VMS	flüchtige Methylsiloxane (engl. <i>volatile methylsiloxanes</i>)
z. B.	zum Beispiel

Abstract

In April 2010, it was announced that SBI from the manufacturer “Poly Implant Prothèse” (PIP) and “Rofil Medical Nederland B.V.” include industrial- instead of medical-grade silicone gel. Compared to silicone breast implants (SBI) from manufacturers such as Allergan and Mentor higher rupture tendencies of PIP- and Rofil-SBI, gel-bleeding rates and cyclic volatile methylsiloxanes (cVMS) concentrations are reported. Due to this fact, the French Health Products Safety Agency and German Federal Institute for Drugs and Medical Devices have recommended in December 2011 and January 2012, respectively, the explantation of such implants, which has lasted until today and is independent of the actual implant status.

To date, literature describes magnetic resonance imaging (MRI) as the “gold standard” for detecting implant failure due to highest sensitivity and specificity up to 95 %. For logistic (ubiquity) and cost reasons, mamma sonography (breast ultrasound, SONO) with a sensitivity of 25-75 % deems the manner of choice for surveying implant status. These diagnostic methods are associated with a high expense on the health system and a higher expenditure of time for the patients. Under this point of view, it would be advantageous to establish a cost-effective, non-invasive and sensitive method for the identification of ruptured implants.

In the present work an instrumental-analytical method based on blood analysis to verify ruptured SBI was developed. For this task, blood and capsular tissue samples of in total forty women with SBI or double lumen- and hydrogel-implants from different manufacturers were available. The human samples were collected in the department of gynecology and obstetrics (School of Medicine, University of Duisburg-Essen, DR. P. RUSCH) immediately before or/and during the explantation of the implants. After explantation, the status of the explanted SBI was verified.

In the first part of the present work, screening-methods using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a quadrupole mass spectrometer (GCxGC-MS) were applied to identify significant marker substances in the human matrices. By analyzing dichloromethane-extracts of silicone gel from ten ex- and three implants with GCxGC-MS a target-list was prepared and checked for recovery of these substances in the tissue and blood samples of women with intact and ruptured SBI. By comparing resulting mass spectra with two standard reference databases, phenyl-substituted siloxanes next to linear and cyclic methylsiloxanes could be analyzed in the capsular tissue samples of women with ruptured SBI. The three cVMS, octamethylcyclotetra (D4)-, decamethylcyclopenta (D5)- and dodecamethyl-cyclohexasiloxane (D6), were confirmed by measuring analytical standards. In contrast to the blood samples of the control person and of women with intact SBI (n = 12),

methylsiloxanes D4 and D6 were identified in two respectively seven blood samples of women with ruptured SBI (n = 10). Furthermore, in three blood-extracts of women with ruptured SBI the presumed tetradecamethylcycloheptasiloxane (D7) was detected.

The second part of the present work focused on the method development for the sensitive cVMS-GC-MS analysis in human samples. Increased sensitivity was achieved by using a low-bleeding capillary column and a self-made, stainless steel container around the injection port which was flushed with argon before sample injection. With this argon-cage, the daily signal fluctuation of cVMS (D3-D5) in the instrumental blank resulting from the laboratory air was reduced from 45 % to 3-9 %. Hereby, with a splitless-injection GC-MS-technique (M1) limits of detection (LOD) between 0.7-0.9 µg D3-D6/L dichloromethane were obtained. Additionally, a second GC-MS method was developed based on a large volume injection-technique (LVI, M2) to realize LOD between 40-80 ng D4-D6/L dichloromethane. After homogenization and dichloromethane extraction of capsular tissue samples or direct liquid-liquid-extraction of blood samples with sample cooling during preparation and analysis, extraction efficiencies between 81-99 % were achieved. Relating to the human matrices, capsular tissue and blood, LOD between 6-15 ng D3-D6/g tissue (M1) and 0.03-0.05 ng D4-D6/g blood (M2) and limits of quantification (LOQ) between 16-30 ng D3-D6/g tissue (M1) and 0.1-0.18 ng D4-D6/g blood (M2) were calculated.

Human samples of patients with intact, bleeding and ruptured SBI of different manufacturers were analyzed with the validated GC-MS methods M1 and M2. Because of the higher persistence, D6 was the dominant siloxane in the dichloromethane-extracts of capsular tissue. Furthermore, a tendency to higher D6-concentrations in capsular tissue of women with ruptured Rofil-SBI (median: 1368 ng D6/g, n = 3) than with intact (median: 354 ng D6/g, n = 7) or bleeding Rofil-SBI (median: 405 ng D6/g, n = 17) was observed. Additionally, smaller siloxanes D3-D5 were determined in tissue samples of women with bleeding and ruptured SBI. Comparable tendencies were perceived in tissue samples of women with other or unknown manufacturers. Generally, the D5- and D6-concentration in tissue samples of women with intact and bleeding SBI correlated with the implantation period of their implants. Especially for an implantation period longer than ten years an increasing D5- and D6-amount in the surrounding tissue was observed. Analysis of the blood samples was done by LVI-GC-MS. In contrast to the control sample and to women with intact SBI (n = 13), where blood-concentrations were mainly below LOQ or not be detectable, in blood of women with ruptured SBI (n = 11) higher D4- and D6-concentrations up to 0.57 ng D4/g blood and 0.16 ng D6/g blood were analyzed. An association to the siloxane-amount in capsular tissue

was not observed. The most prominent cVMS in personal care products, D5, was quantified only two-times in each group of women with SBI (intact and ruptured). Therefore, a possible contamination during blood-sampling or an influence of dermal application or exposition via inhalation could be excluded. The identification of ruptured SBI by analyzing the patient's blood sample via LVI-GC-MS can be performed using a D4/D6-multi-compound marker. In this context, concentrations above 0.18 ng D4 and 0.10 ng D6/g blood are significant for ruptured SBI. If only one siloxane is quantifiable and the second siloxane is detectable, this case would also be indicative for an implant failure. Applying this multi-compound marker and these definitions of limit values for diagnosis only three ruptured and one intact of in total 24 implants were misdiagnosed. With this developed analytical preoperative diagnostic method a three-times higher precision (error rate 17 %) than the commonly used clinical diagnostic method SONO (error rate 46 %) could be achieved.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Silikonbrustimplantate	2
2.1.1	Aufbau und chemische Zusammensetzung	3
2.1.2	Implantat-Generationen und weitere Implantat-Varianten	8
2.1.3	Auftretende Komplikationen bei Patienten mit Silikonbrustimplantaten	9
2.1.3.1	Silikon-Bluten	10
2.1.3.2	Ruptur und Diagnostik von Implantatdefekten	12
2.1.3.3	Lokale und systematische gesundheitliche Folgen	14
2.1.3.4	Silikonimplantate der Hersteller Poly Implant Prothèse und Rofil Medical Nederland B.V.	16
2.2	Niedermolekulare zyklische Methylsiloxane	17
2.2.1	Vorkommen in Umweltmatrices: Exposition und Akkumulation	19
2.2.2	Eliminierung und Metabolisierung in der Umwelt und in höheren Organismen	22
2.2.3	Toxikologische Eigenschaften	25
2.3	Stand der Forschung: Silikon- und Siloxan-Analytik	26
3	Problemstellung und Zielsetzung	34
4	Experimenteller Teil	36
4.1	Probenaufstellung	36
4.1.1	Vollblut- und Kapselgewebeproben von Implantatträgern	36
4.1.2	Silikonimplantate und –explantate	39
4.2	Wahl des organischen Lösungsmittels und Herstellung von Standardlösungen	40
4.3	Probenentnahme und Extraktion von Silikongel aus Im- und Explantaten	42
4.4	Probenvorbereitung der Blut- und Kapselgewebeproben	42
4.4.1	Optimierung der Lager- und Extraktionsbedingungen	42
4.4.1.1	Aufstockexperimente mit Kontrollblut	43
4.4.1.2	Aufstockexperimente mit einer Gewebe-Vergleichsmatrix	45
4.4.2	Probenvorbereitung zur quantitativen und qualitativen GC-Analyse von Vollblut und Kapselgewebeproben von Implantatträgern	47
4.4.3	Probenvorbereitung der Blutplasmaproben für die qualitative <i>non-target</i> -Analytik	49
4.4.4	Probenvorbereitung aufgestockter Vollblutproben für die dynamische <i>headspace</i> -GC-Analyse	50

4.4.5	Durchführung von Wasch-Experimenten bei der Probenvorbereitung von Kapselgewebeproben	50
4.4.6	Probenvorbereitung der Kapselgewebeproben für die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie	51
4.5	Methodenvalidierung	51
4.6	Qualitätskontrolle	52
4.7	Verwendete Geräte und Materialien	53
4.7.1	Analysegeräte und verwendete Einstellungen	53
4.7.1.1	Gaschromatographie-Elektronenstoßionisation-Quadrupol-Massenspektrometrie	53
4.7.1.2	Gaschromatographie-Atmosphärendruck-Photoionisation-Orbitrap-Massenspektrometrie	56
4.7.1.3	Gaschromatographie- <i>in-tube extraction</i> -Ion Trap-Massenspektrometrie	57
4.7.1.4	Komprehensive zweidimensionale Gaschromatographie-Quadrupol-Massenspektrometrie	58
4.7.1.5	Fluoreszenzmikroskopie	59
4.7.1.6	Mammasonographie	60
4.7.1.7	Weitere verwendete Software	60
4.7.2	Laborgeräte und Materialien	60
4.7.3	Chemikalien	62
5	Ergebnisse und Diskussion	64
5.1	Qualitative Analyse von Silikonbrustimplantaten und Humanproben von Implantatträgern mittels comprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie	64
5.1.1	Chemische Additive in Silikongel unterschiedlicher SBI-Hersteller	65
5.1.2	<i>Suspected-target</i> -Analytik von Kapselgewebe- und Vollblutproben von Implantatträgern	74
5.1.3	<i>Non-target</i> -Analytik von Vollblutproben von Frauen mit defekten und intakten Implantaten	78
5.2	Methodenentwicklung zur quantitativen Methylsiloxan-Analytik in Humanproben	81
5.2.1	Sensitivitätssteigerung der splitlosen GC-MS-Methode	82
5.2.1.1	Einfluss des Injektionssystems und der Raumluft	82
5.2.1.2	Einfluss der stationären Phase	86

5.2.2	Entwicklung einer alternativen GC-MS-Analyse_____	89
5.2.2.1	Anwendung einer dynamischen <i>headspace</i> basierten Injektionstechnik_____	91
5.2.2.2	Optimierung und Validierung der <i>large volume</i> -Injektionstechnik_____	93
5.2.3	Optimierung der Probenvorbereitung_____	97
5.3	Zyklische Methylsiloxane im Kapselgewebe von Frauen mit Silikonbrustimplantaten_____	104
5.3.1	Vergleich verschiedener Hersteller von Silikonbrustimplantaten_____	105
5.3.2	Vergleich von GC-EI-MS und GC-APPI-MS zur Analyse zyklischer Methylsiloxane_____	111
5.3.3	Untersuchungen zur Diffusion zyklischer Methylsiloxane in die Gewebezellen____	117
5.4	Zyklische Methylsiloxane in Vollblutproben von Frauen mit Silikonbrustimplantaten_____	121
5.4.1	Quantifizierung mittels LVI-GC-MS_____	122
5.4.2	Die GC-MS basierte Methode als präoperative Diagnostikmethode im Vergleich zur herkömmlichen klinischen Diagnostik_____	128
6	Zusammenfassung und Ausblick_____	132
7	Literatur_____	136
8	Anhang_____	165
	Abbildungsverzeichnis_____	178
	Tabellenverzeichnis_____	182
	Publikationsliste_____	184
	Lebenslauf_____	185

1 Einleitung

Im Zuge des Bekanntwerdens im April bzw. Juni 2010, dass einige Silikonbrustimplantate (engl. *silicone breast implants*, SBI) der Hersteller Poly Implant Prothèse (PIP), Rofil Nederland B. V. und GfE Medizintechnik Industriesilikon beinhalten, gaben sowohl die französische Agentur für die Sicherheit von Gesundheitsprodukten als auch das Bundesinstitut für Arzneimittel- und Medizinprodukte im Winter 2011/2012 eine Empfehlung zum Implantataustausch heraus. Diese hat bis zum heutigen Zeitpunkt noch Bestand und ist unabhängig davon, ob tatsächlich ein Implantatdefekt vorliegt. Im Gegensatz zu *medical-grade*-SBI anderer Hersteller, wie Allergan und Mentor, weisen die PIP- und Rofil-SBI erhöhte Bruchtendenzen, erhöhte Raten bezüglich Gel-Bluten und erhöhte Konzentrationen an zyklischen, flüchtigen Methylsiloxanen (engl. *cyclic volatile methylsiloxanes*, cVMS) auf. Ein erhöhtes gesundheitliches Risiko für die betroffenen Patienten besteht nach Meinung des wissenschaftlichen Ausschusses der europäischen Kommission und auf Grundlagen verschiedener medizinischer und toxikologischer Studien jedoch nicht [1–6]. Einer nachweisbaren Silikon-Diffusion und anschließende Akkumulation im lymphatischen System, verschiedenen Gewebekompartimenten und in einigen Organen mit cVMS-Konzentrationen bis in den unteren µg/g-Bereich zugrunde liegend [7–12], ist unter Berücksichtigung der entzündlichen Wirkung von Octamethylcyclotetra (D4)- und Decamethylcyclopentasiloxan (D5) [13–15], sowie der reproduktionstoxischen Eigenschaft von D4 [16–18], die Erfassung des Implantatzustandes von fundamentaler Bedeutung. Zumal die medizinische Wissenschaft bis zum heutigen Zeitpunkt keine Verbindung zwischen den niedermolekularen Silikonen und auftretenden gesundheitlichen Problemen, wie die Kapselkontraktur, widerlegen konnte [19, 20]. In Europa wird in Voruntersuchungen für die Diagnostik defekter Implantate primär die Mammasonographie als Standardmethode eingesetzt, obwohl die Magnetresonanztomografie aufgrund ihrer hohen Sensitivität gerne als „Goldstandard“ bezeichnet wird [21–23]. Diese Verfahren sind mit einem hohen finanziellen Aufwand für das Gesundheitssystem und mit einem zeitlichen Aufwand für den Patienten¹ verbunden. Um eine schnelle Identifizierung von Implantatrupturen zu ermöglichen, wäre die Etablierung eines alternativen, nicht-invasiven und kostengünstigen Diagnoseverfahrens vorteilhaft.

Diese Zielsetzung liegt der vorliegenden Arbeit zugrunde. Im Speziellen gilt es, unter Einsatz von instrumentellen analytischen Methoden eine Marker-Substanz im Blut der Patienten zu identifizieren und anschließend quantitativ zu erfassen.

¹ Zum Zweck der Lesefreundlichkeit wird im Folgenden das generische Maskulinum verwendet, gleichwohl sind stets beide Geschlechter gemeint.

2 Theoretische Grundlagen

Inhaltlich werden in diesem Kapitel die thematischen Grundlagen der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Hierbei handelt es sich um das Thema Silikonbrustimplantate (engl. *silicone breast implants*, SBI) allgemein und die im Vordergrund dieser Arbeit stehenden zyklischen flüchtigen Methylsiloxane (engl. *cyclic volatile methylsiloxanes*, cVMS). Des Weiteren werden mögliche auftretende Komplikationen bei Implantatträgern von Silikonbrustimplantaten, sowie die klinischen Diagnostikmethoden thematisiert. Insbesondere das seltene, aber bei Implantatträgern statistisch signifikant auftretende Non-Hodgkin-Lymphom wird näher diskutiert. Abschließend wird ein Überblick über die im Bereich der Siloxan-Analytik eingesetzten instrumentellen analytischen Methoden gegeben.

2.1 Silikonbrustimplantate

Seit den ersten Brustrekonstruktionen unter Transplantation einer gesunden weiblichen Brust bzw. eines Fettgeschwülstes zwischen 1887-1895 [24, 25] wurden im Bereich der rekonstruktiven und ästhetischen Chirurgie nicht nur Eigengewebe, sondern zunehmend auch Polymere eingesetzt [26]. Hierbei wurden insbesondere im Bereich der Brustvergrößerung verschiedene flüssige und halbflüssige Materialien direkt in das Brustgewebe injiziert. Bis 1914 wurden langkettige Kohlenwasserstoffe (Paraffine), die vor der Injektion erwärmt wurden [27], verwendet. Aufgrund auftretender Komplikationen, wie z. B. Migration, Fisteln, Infektionen, Lungenembolien und Gewebenekrosen [27], die meist erst fünf bis zehn Jahre nach Injektion auftraten, wurden die Paraffine durch verschiedene Öle und Wachse, wie z. B. Mineralöl, Erdnuss- und Sojaöl oder Bienenwachs, ersetzt [25, 28]. Zusätzlich wurden bis 1943 erste Brustimplantate aus Glas, Elfenbein, Epoxidharzen und tierischem Knorpel verwendet, wobei auch bei diesen Materialien bei den Patienten vermehrt chronische Entzündungen, Gewebereaktionen und Infektionen auftraten [28, 29]. Vergleichbare Komplikationen wurden bei Polyether-, Polyethylen- und Polyvinylalkohl-basierten Implantaten beobachtet, die bis Anfang der 1960er Jahre weltweit eingesetzt wurden [30–33]. Mit der Entwicklung des Werkstoffes Silikon, ein synthetisch, vernetztes Polymer auf Basis einzelner methylierter Siloxan-Einheiten ($[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n$; s. unten), während des zweiten Weltkrieges [26, 34] wurde in Japan erstmals Silikonöl² zur Brustaugmentation eingesetzt und 15 Jahre später als Medizinprodukt von Dow Corning vertrieben [28, 35, 36]. Die Injektion von medizinischem, flüssigem Silikon direkt in das Brustgewebe als Maßnahme für eine

² Verwendung von technischem Silikon, das nicht für den medizinischen Gebrauch geeignet war (nicht steril, Verunreinigungen, ungleichmäßige Viskosität) [28].

Langzeit-Brustaugmentation wurde in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) bis zur Untersagung durch die amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) im Jahr 1991 praktiziert [26]. Auftretenden Komplikationen bei der Silikon-Einspritzung in das Brustgewebe waren u. a. Schmerzen, Infektionen, Gewebeverkalkung, Granulome, Migration, Entstellung der Brust, Schwellung der Achsellymphknoten und Lungenembolien und damit Symptome, die bereits von direkt injizierten Vorgängermaterialien bekannt waren [25, 37–44]. Durch die Einführung einer Brustprothese bestehend aus zwei Komponenten mit Hülle und Füllmaterial aus Silikon (Silastic der Firma Dow Corning) im Jahr 1962 von T. D. CRONIN und F. J. GEROW, war erstmalig die Rekonstruktion bzw. die Augmentation der weiblichen Brust mit biologisch inerten und flexiblen Materialien möglich [26, 45, 46]. Insbesondere seit Anfang der 1990er Jahre werden in der rekonstruktiven und ästhetischen Chirurgie zunehmend SBI eingesetzt, z. B. in den USA im Jahr 1999 bei 1,5 Millionen Frauen [25, 47] und 2004 bei 2,0 Millionen Frauen [48]. Im Jahr 2011 erfolgten allein in Deutschland mehr als 25.000 von insgesamt 1,9 Millionen weltweit durchgeführten Operationen zur Brustrekonstruktion nach Mastektomie (20-30 %) und Brustaugmentation (70-80 %) mit SBI [25, 47, 49–51]. Dabei wurde der zunehmende Einsatz von SBI im ästhetischen Bereich und bei durchschnittlich jüngeren Frauen beobachtet [49].

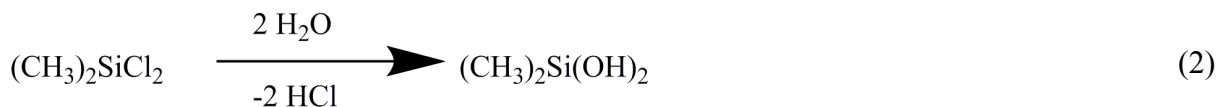
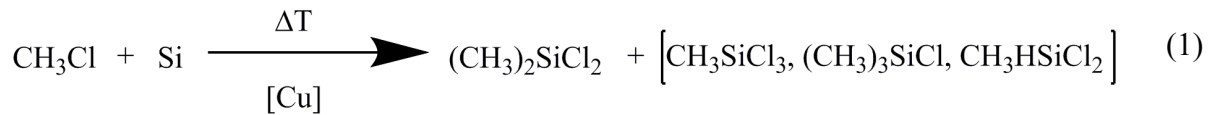
Im Folgenden werden der Aufbau und die chemische Zusammensetzung, verschiedene Implantat-Typen und deren Genese sowie auftretende Komplikationen bei Patienten mit SBI erläutert.

2.1.1 Aufbau und chemische Zusammensetzung

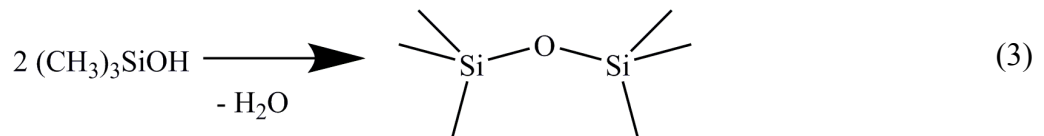
Allgemein bestehen SBI aus einer hydrophoben ein- oder mehrschichtigen Elastomer-Hülle aus hochmolekularen Silikonen, die das Silikongel vom umliegenden Gewebe abschirmt.

Oligomere und Polymere auf Basis einer wiederholenden Silizium-Sauerstoff-Einheit sind rein anthropogene Erzeugnisse, wobei das Siliziumatom organische Substituenten bzw. Wasserstoff aufweist mit $(R_2SiO)_n$ (z. B. $R = H, CH_3, C_2H_5$ und C_6H_5). Ein natürlicher Ursprung dieser Organosiloxane ist in der einschlägigen Fachliteratur nicht bekannt [52–54]. Die technische Herstellung von Silikonen (Poly(organo)siloxan) erfolgt über die Synthese und anschließende Hydrolyse der Organylchlorsilane in zwei Schritten. Erstmals durchgeführt von E. G. ROCHOW und E. MÜLLER erfolgt nach dem Direktverfahren unter Einwirkung von elementarem Kupfer als Katalysator bei erhöhten Temperaturen (280-320 °C) eine oxidative Addition von Chlormethan (H_3CCl) an Silizium (Si). Mit einer Ausbeute von 80-85 %

entstehen bei dieser Reaktion Dimethyldichlorsilan ($((\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2)$) als Haupt- und Methyltrichlorsilan ($(\text{CH}_3\text{SiCl}_3$; 10-15 %), Trimethylchlorsilan sowie Methylhydrogendichlorsilan ($((\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ und $\text{CH}_3\text{HSiCl}_2$; jeweils 3-4 %) als Nebenprodukte (s. Gleichung 1). Im zweiten Schritt werden die gebildeten Organylchlorsilane mit Wasser (Hydrolyse) bzw. Methanol (Methanolyse) zu Silanolen ($\text{R}_2\text{Si}(\text{OH})_2$, bei $\text{R} = \text{CH}_3$: Dimethylsilandiol) umgesetzt (s. Gleichung 2) [53, 55–57].



Direkt im Anschluss folgt eine Kondensation der Silanole unter Abspaltung von Wasser zu niedermolekularen zyklischen und linearen Siloxanen (s. Gleichung 3, modifiziert nach [26, 53]).



Die Größe bzw. die Kettenlänge der einzelnen Siloxane sowie die Zusammensetzung des Produktgemisches sind abhängig von den Reaktionsbedingungen. Da großtechnisch hauptsächlich die methylierten Silanole zum Einsatz kommen, führt die Polymerisierung der Cyclosiloxane (mit $n \leq 5$) sowie die Polykondensation der linearen Siloxane ($n > 5$) zur Bildung von Poly(dimethyl)siloxan (PDMS). Die Notation der niedermolekularen Methylsiloxanen erfolgt nach C. B. HURD anhand der Funktionalität der entsprechenden Wiederholungseinheit [58]. Eine monovalente $\text{Me}_3\text{SiO}_{(1/2)}$ -Einheit, wie z. B. Trimethylsilanol, fungiert als Endgruppe und wird mit „M“ abgekürzt. Die bivalenten mittleren Kettenglieder (Me_2SiO) hingegen werden mit „D“, die trifunktionalen Gruppen ($\text{MeSiO}_{3/2}$) mit „T“ und die quadrivalenten Gruppen ($\text{SiO}_{4/2}$) mit „Q“ angegeben. Die Anzahl der Methylsiloxan-Einheiten wird durch die Zahl nach dem Kürzel (M, D, T bzw. Q) wiedergegeben. Nach dieser Benennung folgen für das zyklische Methylsiloxan Octamethylcyclotetrasiloxan das Kürzel D4 (s. Abbildung 1a), M4Q für das in der vorliegenden Arbeit als interner Standard verwendete Tetrakis(trimethylsiloxy)silan (s. Abbildung 1b) und MDM für das lineare

Methylsiloxan Octamethyltrisiloxan (s. Abbildung 1c). Zusätzlich werden lineare Methylsiloxane zur Vereinfachung mit „L“ (L3: Octamethyltrisiloxan) abgekürzt [54].

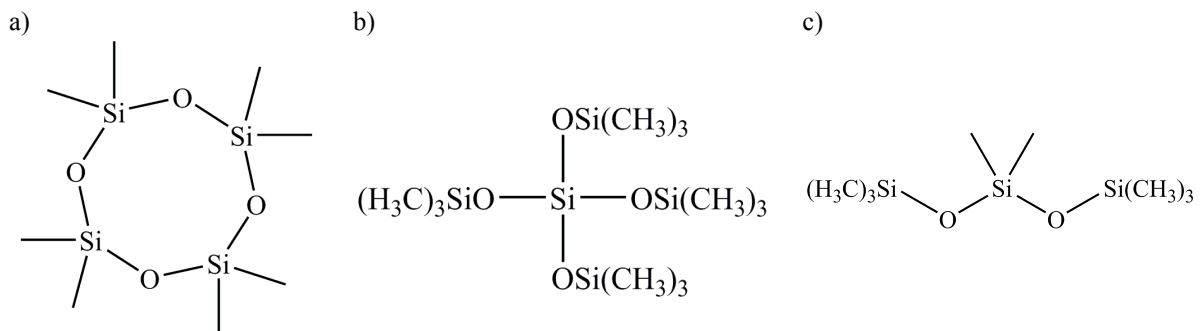


Abbildung 1: Strukturformel von a) Octamethylcyclotetrasiloxan, b) Tetrakis-(trimethylsilyloxy)silan, c) Octamethyltrisiloxan.

Allgemein werden Silikone in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt, die sich durch ihren Vernetzungsgrad und folglich in Bezug auf ihre Viskosität (flüssig bis fest) und Elastizität (elastisch bis starr) unterscheiden. Silikonöl besteht in der Regel aus einzelnen PDMS-Ketten mit ca. 300 Siloxan-Einheiten und einer Trimethylsilyl-Gruppe als terminale Einheit, wobei aus zunehmender Kettenlänge eine verminderte Fließfähigkeit resultiert. Bei Vorlage von Vinyl-, Hydroxid-Gruppen oder Wasserstoff substituierten funktionalisierten PDMS-Ketten können Vernetzungsreaktionen zwischen den einzelnen Ketten erfolgen. Diese meist platin-katalysierten Silikon-Elastomere werden aus bis zu 500 Siloxan-Einheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 500 bis 700 kDa gebildet [59]. Die letzte Gruppe der Silikone stellt das Silikongel dar, das aus einem aufgequollenen dreidimensionalen PDMS-Netzwerk (Massenanteil ca. 15 %) mit einem flüssigen Silikonöl-Anteil (Massenanteil ca. 85 %) besteht [26].

Die Vernetzung einzelner Siloxan-Ketten kann unter einem radikalischen Mechanismus, unter katalytischer Kondensation bei Raumtemperatur oder unter katalytischer Hydrosilylierung erfolgen. Zur kommerziellen Herstellung von SBI werden jedoch überwiegend die letztgenannten zwei Verfahren eingesetzt. Bei der Vulkanisierung der Silikonkautschukmasse bei Raumtemperatur (engl. *room-temperature vulcanization*, RTV) erfolgt die Kondensation von quantivalenten Siloxanen (Si(OR)₄) mit PDMS-Ketten mit endständigen Hydroxid-Gruppen, die bei Anwesenheit von Wasser oder bereits unter Luftfeuchte entstehen können (s. Abbildung 2). Dabei verbleiben die organischen Zinn- oder Titan-Katalysatoren nach Beendigung der Reaktion im Silikon-Elastomer [26, 60, 61].

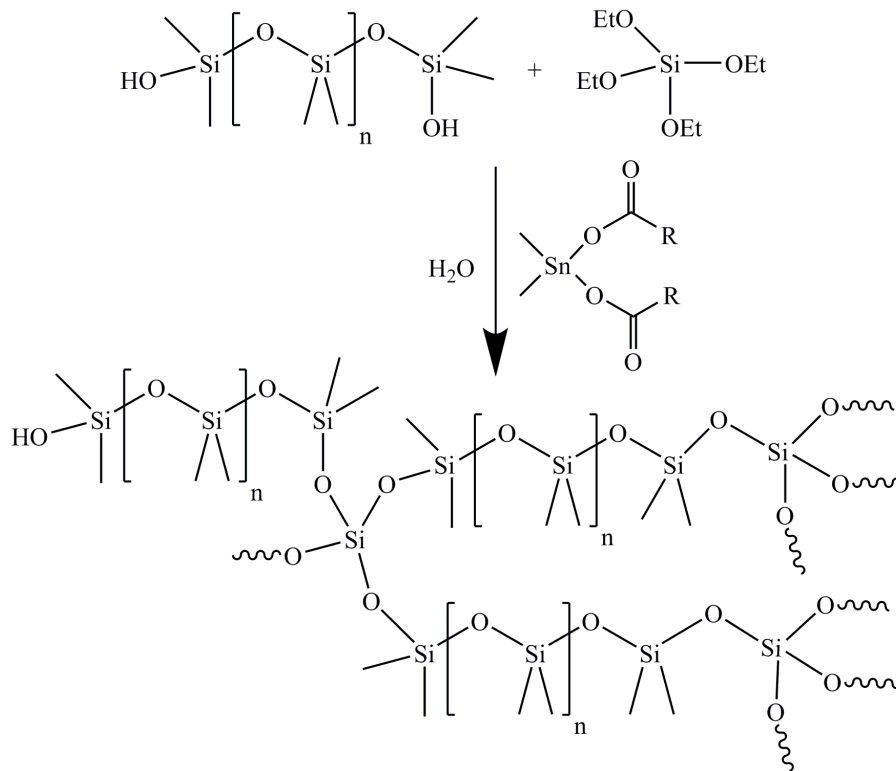


Abbildung 2: Vulkanisierung der Silikonkautschukmasse bei Raumtemperatur und Ausbildung eines Silikon-Elastomer unter Einwirkung eines Zinn-Katalysators ($\text{SnMe}_2(\text{OOR})_2$) und Wasser (H_2O); modifiziert nach [26].

Neben der RTV-Vernetzung können zusätzlich Silikongele und Silikon-Elastomere über die Hydrosilylierungsreaktion dargestellt werden. Hierbei erfolgt eine *syn*-spezifische 1,2-Addition eines Hydrogen-substituierten Siloxans (Polyhydromethylsiloxane mit $[\text{RHSiO}]_n$) an die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung eines Vinyl-Siloxans ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHR}_2\text{SiO}$) unter Ausbildung einer Ethylenbrücke [48] (s. Abbildung 3). Die selektive 1,2-Verknüpfung der Silikon-Polymere wurde bis in die 1970er Jahre unter Zuhilfenahme eines anorganischen Platin-Katalysators³ durchgeführt [62]. Aufgrund der relativ geringen Katalyseaktivität der Hexachloroplatin(+IV)-Säure wurde diese durch einen aktiveren Platin-Katalysator mit organischen Vinyl-Siloxan-Liganden⁴ ersetzt [48, 63, 64]. Der Vernetzungsgrad des Elastomers bzw. des Silikongels, der mit der Netzwerkdichte korreliert, wird in diesem Fall über die Anzahl und die Verteilung der funktionellen Gruppen reguliert.

Für die Verstärkung des dreidimensionalen Elastomer-Netzwerkes werden zusätzlich amorphe Silikat-Nanopartikeln (SiO_2 : 5-100 nm) eingelagert. Bei einem Massenanteil von bis zu 27 % kann eine Erhöhung der Zugfestigkeit der Silikon-Elastomer-Hülle um den Faktor 10 erreicht werden [25, 26, 48, 55, 56, 65–67].

³ Hexachloroplatin(+IV)-Säure: benannt nach J. L. SPEIER [62].

⁴ Mit 1,1,3,3-Tetramethyl-1,3-divinylsiloxan-Liganden: benannt nach B. D. KARSTEDT [63].

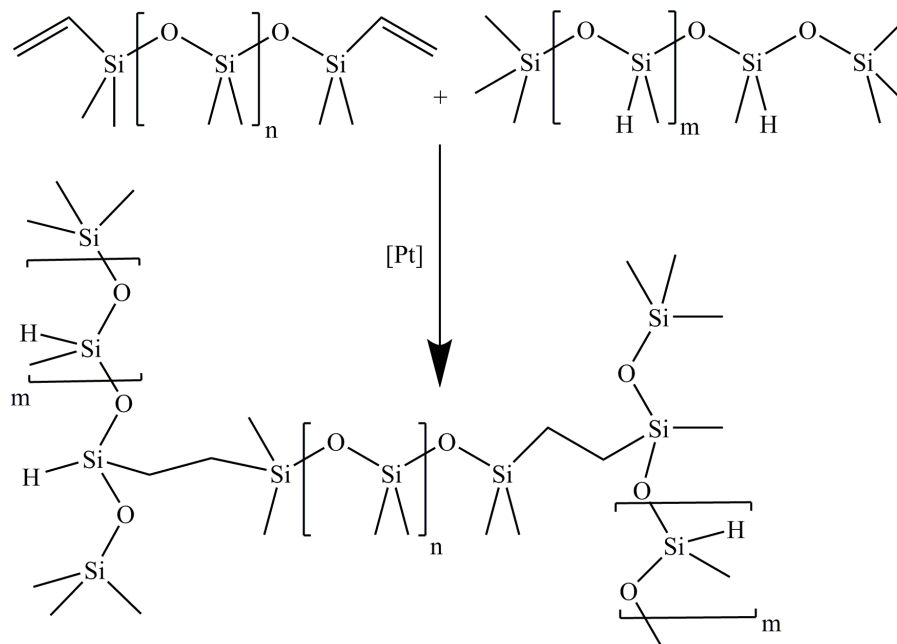


Abbildung 3: Platin-katalysierte Addition eines Vinyl-Siloxans an ein Polyhydromethylsiloxane (Hydrosilylierungsreaktion); modifiziert nach [26].

Neben dem Platin-Katalysator, der nach Beendigung der Hydrosilylierungsreaktion im Silikongel bzw. in der Elastomer-Hülle mit Konzentrationen im unteren ppm-Bereich verbleibt [48, 68, 69], können weitere Schwermetalle, wie z. B. Zink und Blei, im Spurenbereich vorliegen [5]. Abhängig vom SBI-Hersteller wird die entsprechende Flexibilität des Silikon-Materials nicht nur über den Vernetzungsgrad, sondern auch durch die Zugabe von niedermolekularen Methylsiloxanen (zyklische und lineare) reguliert [47, 70, 71]. Die chemische Zusammensetzung von Silikongel unterschiedlicher SBI-Hersteller (Poly Implant Prothèse, McGhan und Eurosilicone) wurde von BERETTA et al. und BERETTA & MALACCO mittels abgeschwächter Totalreflexion-Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie (engl. *attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy*, ATR-FT-IR), Fließinjektion-Elektrospray-Ionenfalle-Massenspektrometrie (FI-ESI-IonTrap-MS) und Gaschromatographie gekoppelt mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (GC-MS) untersucht. In einem Aceton-Extrakt analysierten diese Arbeitsgruppen neben niedermolekularen Methyl-, Vinyl- und Phenylsiloxanen unterschiedliche aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Alkane, Alkene, Xylene, Benzole, Aldehyde und Ketone [72–74].

2.1.2 Implantat-Generationen und weitere Implantat-Varianten

Seit der Markteinführung der ersten SBI Anfang der 1960er Jahre von Dow Corning fand aufgrund der auftretenden Probleme, wie hohen Silioxan-Expositionsraten und Kapselkontraktur (s. Abschnitt 2.1.3), eine Weiterentwicklung der Elastomer-Hülle und der Gel-Zusammensetzung mit dem Ziel der Minimierung von Diffusionseffekten und der Steigerung der Brustgewebe-Authentizität statt. Die tropfenförmigen SBI der ersten Implantat-Generation wurden zunächst aus jeweils zwei dicken Elastomer-Schalen (ca. 0,75 mm [75]), später aus einer platinkatalysierten Silikonhülle (ca. 0,25 mm [75]), in die das hochviskose Silikongel injiziert wurde, hergestellt. Für die optimale Positionierung des Implantats in der Brust wurden zusätzlich Polyethylenterephthalat-Fasern (*Dacron-patch*) auf der Rückseite als Fixierungshilfen angebracht. Bereits nach einer Implantationsdauer (Liegezeit) von einem Jahr wurde bei einigen Patienten zunehmend eine mit Schmerzen verbundene Verhärtung der Brust beobachtet. Dies wurde auf das stark vernetzte Silikongel mit einem Vernetzungsanteil von 50 % zurückgeführt [75]. Da die später als Kapselkontraktur bezeichnete Verhärtung und Kontraktion der Gewebekapsel (s. Abschnitt 2.1.3.3) zu diesem Zeitpunkt unbekannt war, wurde in der zweiten SBI-Generation Anfang der 1970er Jahre ein weniger viskoses Silikongel (Vernetzungsanteil ca. 20 %) verwendet. Auch die Dicke der Silikon-Elastomer-Hülle wurde halbiert (ca. 0,13 mm [75]) und die Fixierungshilfen wurden von den SBI-Herstellern (Dow Corning, Surgitek und Heyer-Schulte) entfernt. Die dünne Elastomer-Hülle in Korrelation mit einem erhöhten Anteil an Silikonöl im Gel führten zu einer vermehrten Diffusion an Silikonmaterial in die Implantattasche und in das umliegende Gewebe, später als Gel-Bluten bezeichnet (engl. *gel-bleeding*; s. Abschnitt 2.1.3.1). Auftretende Komplikationen, wie Gel-Bluten, Kapselkontraktur und vermehrte Implantatruptur, sollten durch die Einführung von mehrschichtigen Elastomer-Hüllen (0,5 mm [75]) und kohäsiven (formstabilen) Silikongelen minimiert werden. Die Firma McGhan entwickelte als erstes ein SBI der dritten Generation mit einer 5-10 µm dicken Diphenyl-substituierten PDMS-Barriere zwischen der inneren und äußeren Elastomer-Schicht, das bereits 1979 auf dem amerikanischen Markt erhältlich war [75]. Auch fluorierte PDMS-Komponenten in der Elastomer-Hülle, beispielsweise bei SBI von Dow Corning (Silastic II, ab 1981), kamen zur Reduktion der Silikondiffusion zum Einsatz. Eine Minimierung der auftretenden Verhärtungen des Kapselgewebes sollte durch die Einführung von texturierten Oberflächen der Elastomer-Hülle und durch Polyurethan-beschichtete Implantate, die bereits 1971 von Heyer-Schulte eingeführt wurden [76], erzielt werden [75, 77, 78].

Aufgrund der vielfältigen Komplikationen, die bereits teilweise bei Patienten mit Flüssig-Silikon-Einspritzungen beobachtet wurden, sowie wegen Auftretens von in der Fachliteratur diskutierten Autoimmun- und Bindegewebserkrankungen im Zusammenhang mit SBI bei ausbleibenden Sicherheitsstudien der Hersteller wurde der Einsatz von SBI in den USA durch die FDA in den Jahren 1992 bis 2006 auf kontrollierte Studien beschränkt [59, 79–83]. Nachfolgende SBI-Generationen ab Anfang der 1990er Jahre wurden demzufolge unter erhöhten Sicherheitsstandards und vermehrt in Anlehnung an die anatomische Form der weiblichen Brust (Festigkeit und Form, fünfte Generation) hergestellt [26, 77].

Mit einem Marktanteil von etwa 40 % (in den USA [26]) finden neben reinen SBI auch mit Kochsalzlösung gefüllte Implantate mit einer Silikon-Elastomer-Hülle aufgrund der Möglichkeit zur flexiblen Volumeneinstellung Anwendung. Des Weiteren werden Doppellumen-Implantate, also mit Kochsalz- und Silikongel-gefüllte Implantate eingesetzt. Insbesondere im Bereich der Brustrekonstruktion werden Expander-Implantate für die Hautdehnung nach Mastektomie meist mit einer äußeren Silikon-Schicht und einem variablen Kern gefüllt mit Kochsalzlösung (sogenannte Becker-Implantate [26]) verwendet. Ende der 1980er Jahre wurden vermehrt Doppellumen-Implantate mit Kochsalzlösung in der äußeren Schicht eingesetzt, da diese Implantat-Variante eine zusätzliche Barriere gegen Silikon-Bluten aufwies. Dieser Effekt konnte von YU et al. jedoch nicht bestätigt werden [84]. Nach 1992 wurden auch in Europa alternative Implantat-Füllungsmaterialien, wie beispielsweise Sojabohnenöl (Trilucent der Firma Lipomatrix) oder verschiedene Hydrogele auf Basis von Hydroxypropyl-Zellulose oder Poly(vinylpyrrolidon), in Brustimplantaten der Hersteller MistiGold, Novagold und PIP verwendet. Aufgrund auftretender Komplikationen, wie genotoxische Oxidationsprodukte der Sojaöl-Implantate oder vermehrte Kapselkontraktur durch starke Quellprozesse einiger Hydrogele, wurden diese Implantate im Jahr 2000 vom Markt genommen [26, 47, 85].

2.1.3 Auftretende Komplikationen bei Patienten mit Silikonbrust-implantaten

Polysiloxane sind aufgrund ihrer vielseitigen Materialeigenschaften, wie Elastizität, Festigkeit, Formstabilität, thermische Stabilität und Biokompatibilität neben SBI auch Bestandteil weiterer Medizinprodukte (u. a. *Stends*, *Shunts*, künstliche Linsen und Herzschrittmacher) [26, 47]. Jedoch werden in der Fachliteratur bereits seit der Einführung der ersten Implantat-Generationen verschiedene Problematiken diskutiert, wie Silikon-Bluten

und Implantatruptur mit lokalen Komplikationen, wie Kapselkontraktur und Silikonoma, aber auch in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen [79, 81, 86–88].

2.1.3.1 Silikon-Bluten

Die spontane Diffusion von Silikonmaterial aus einem intakten SBI durch die Elastomer-Hülle sowie unter Einwirkung eines 5 kg Gewichtes für die Dauer von einer Woche wurde bereits von BARKER et al. im Jahr 1978 mit dem Begriff „*bleeding*“ (Bluten) beschrieben. Zusätzlich untersuchte diese Arbeitsgruppe Gewebeproben des um das SBI gebildeten Kapselgewebes mittels Lichtmikroskopie und fanden dabei intra- und extrazelluläres Silikon sowie die entzündungsbedingte Ausbildung von Granuloma [89]. CAPOZZI et al. beobachteten die Migration von Silikonmaterial und die extensive Ausbildung von Granuloma im Rippen- und Bauchbereich bei einer Patientin mit einem defekten SBI [76]. Auch die Migration des Füllmaterials in das lymphatische System mit abnormaler Vergrößerung der Achsellymphknoten, das als Silikonom bezeichnet wird, wurde beobachtet [90, 91].

In vivo Studien, durchgeführt von GARRIDO et al. und PFLEIDERER & GARRIDO mittels Protonen- und Silizium-Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR), bestätigten nicht nur die Migration und Akkumulation sondern auch die hydrolytische Zersetzung von Silikonen in der Leber von Patienten mit SBI [8, 10]. Eine Abhängigkeit vom Implantatzustand, wie SCHNUR et al. anhand der Silizium-Konzentration im Brustgewebe von Frauen mit SBI ermittelten [92], wurde nicht beobachtet [8, 10]. Jedoch konnte die aus dem SBI diffundierende Silikon-Menge in Bezug auf die Liegezeit in unterschiedlichen histologischen und *in vivo* Studien positiv korreliert werden [91, 93, 94]. Untersuchungen bezüglich der Zusammensetzung der Bleeding-Flüssigkeit wurden von BIRKEFELD et al. mittels NMR-Spektroskopie, die überwiegend lineare und zyklische niedermolekulare Polydimethylsiloxane (engl. *low molecular weight*, LMW) identifizierten, durchgeführt [94, 95]. Neben den LMW-Silikonen konnten von BERETTA et al. auch höhere Homologen dieser Siloxane mittels ATR-FT-IR-Spektroskopie und GC-MS eines Aceton-Extraktes der milchig-weißen, periprothetischen Multiphasen-Mikroemulsion aus der Implantattasche von Frauen mit PIP-Implantaten analysiert werden [73]. Ähnliche Zusammensetzungen der Bleeding-Flüssigkeit mit etwa 4 % an LMW-Silikonen (kleiner 600 Da), 3-15 % sehr hochmolekularen Silikonen (ca. 300.000 Da) und Silikonen mit einem Molekulargewicht kleiner 24.000 Da wurden von BATICH et al. angegeben [96]. *In vitro* Studien zur Erfassung der Diffusionsrate unter simulierten Körperbedingungen (37 °C, salzhaltiges Medium) wurden von YU et al. durchgeführt. In dieser Studie wurden acht intakte Explantate und zwei Implantate über 26

Wochen gelagert und der freigesetzte Silizium-Gehalt in der umgebenden Flüssigkeit alle zwei Wochen mittels induktiv gekoppelter Plasma-Emissionsspektroskopie (engl. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES) bestimmt. Die resultierenden Diffusionsraten wurden mit 0,3-14 mg PDMS in zwei Wochen (entspricht: 0,02-1 mg PDMS pro Tag) angegeben [84]. LYKISSA et al. untersuchten die Silikon-Diffusionsraten aus intakten, explantierten SBI mit jeweils einem Implantat-Gewicht zwischen 240 und 260 g in Abhängigkeit von der Lipophilie des Lagermediums bei 37 °C. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte diese Arbeitsgruppe vornehmlich lineare und zyklische Methylsiloxane mit 3-20-Siloxaneinheiten (200-1.500 Da) und überwiegend die zyklischen Methylsiloxane D3-D7 als Indikator für das Gel-Bluten mittels GC-MS und GC-Atomemissionsdetektion identifizieren. Bei Vorlage von Sojabohnenöl, als Vertreter für ein physiologisch-äquivalentes, lipidreiches Medium, postulieren die Autoren eine Diffusionsrate von 10 mg LMW pro Tag [97]. Inwieweit eine Übertragung auf die tatsächliche Diffusion von LMW-Silikonem in das umliegende Gewebe der Implantatträger und anschließende Akkumulation übertragen werden kann, ist unklar, zumal nach weniger als einem Jahr nahezu 100 % des LMW-Massenanteils in SBI (1-2 %), der von den Autoren angegebenen wird, herausdiffundiert sein müsste [97]. Insbesondere für SBI neuerer Generationen werden Bleeding-Raten mit weniger als einem Massenprozent während der gesamten Liegezeit angegeben [26]. Eine indirekte Untersuchung bezüglich des Silikon-Blutens und der anschließenden Akkumulation im Brustgewebe von Frauen mit intakten SBI wurde von FLASSBECK et al. durchgeführt. Mittels GC-MS quantifizierte diese Arbeitsgruppe den Gehalt an zyklischen Methylsiloxanen D3-D6 in verschiedenen Brustgewebekompartimenten der Implantatträger. Bei Siloxan-Konzentrationen von bis zu 1.300 ng D4/g Gewebe konnte FLASSBECK et al. eine bevorzugte Akkumulation der lipophilen Substanzen im Fettgewebe gegenüber 18 ng D4/g im Muskelgewebe unabhängig von der vorliegenden Implantat-Generation beobachten [7]. Im Gegensatz zu den von LYKISSA et al. untersuchten Diffusionsprozessen erfolgt nach HARDT et al. der Silikon-Transport im menschlichen Organismus aktiv über Makrophagen [19]. Diese umschließen Silikone außerhalb des SBI, woraufhin eine Agglomeration im Kapselgewebe und ein Weitertransport in andere Körperkompartimente, wie lymphatisches System, Blutkreislauf und Organe erfolgen kann [85, 96, 98, 99]. Auch der Transport über Chylomikrone (Lipidproteinpartikel) und Lipidproteine niederer und hoher Dichte (engl. *low/high density lipoproteins*, LDL/HDL) wird in der Literatur diskutiert [100, 101].

2.1.3.2 Ruptur und Diagnostik von Implantatdefekten

Neben dem Gel-Bluten kommt es bei Vorlage einer Implantatruptur, einem Defekt der Elastomer-Hülle, zu einer Freisetzung des Silikonmaterials in die Implantattasche. Eine mechanische Beanspruchung, beispielsweise durch ein Trauma, oder die zu früheren Zeiten durchgeführte Kapselspannung bei Vorlage einer Kapselkontraktur (s. Abschnitt 2.1.3.3) können zu einem Defekt der Elastomer-Hülle führen [102–104]. Auch ein möglicher Implantat-Fehler, wie eine inhomogene Elastomer-Hülle und die Lipidinfiltration und gleichzeitige Schwächung der Hülle durch mögliche Quellprozesse, könnten eine Ruptur hervorrufen [51, 75, 105]. In der Fachliteratur werden je nach Vorlage der Implantat-Generation und der eingesetzten Diagnostikmethode Bruchtendenzen zwischen 0,3 und 77 % aufgeführt [106–108], wobei nach MAROTTA et al. die Wahrscheinlichkeit einer Ruptur mit der Liegezeit der Implantate exponentiell ansteigt [109]. Allgemein werden für SBI der dritten bzw. fünften Generation Rupturraten von 1-4 % nach 5-6 Jahren und 10-15 % nach einer Liegezeit von 10 Jahren im Vergleich zu 50 % vorangehender Implantat-Generationen angegeben [107, 108, 110, 111].

Die häufigsten physischen Symptome im Falle einer Implantatruptur sind nach TARK et al. eine Verformung der Brust (44 %), gefolgt von Dislokation (20 %), Massenzunahme (17 %), Schmerz (13 %) und Entzündungsreaktionen (3 %) [112]. Eine Beurteilung des Implantatzustandes allein anhand der physischen Untersuchung ist jedoch nach JUANPERE et al. nicht ausreichend und führt in bis zu 50 % der Fälle zu einer Fehldiagnose [113]. Zusätzlich werden SBI-Rupturen aufgrund ausbleibender Symptome erst bei der Explantation festgestellt [21, 91, 113, 114]. Da mögliche Krankheitssymptome in Zusammenhang mit defekten SBI kritisch diskutiert werden, ist eine Erfassung des SBI-Status nötig. Zur Diagnostik von SBI werden bildgebende Verfahren, wie die Computertomographie, Mammographie, Ultraschall-Diagnostik (Mammasonographie, SONO) und Magnetresonanztomografie (MRT), eingesetzt. Allgemein werden bei diesen Verfahren eine innere Kapselruptur mit defekter Elastomer-Hülle und intakter Gewebekapsel sowie eine äußere Kapselruptur, die zusätzlich eine defekte Gewebekapsel beinhaltet und mit einer Häufigkeit von 5-20 % auftritt [23, 115–117], unterschieden.

Aufgrund des erschwerten Einsatzes bei Patienten mit einer schmerzhaften Kapselkontraktur und bei Vorlage älterer Implantate mit erhöhter Rupturgefahr nimmt die Mammographie in der Diagnostik nur eine untergeordnete Rolle ein [118]. Insbesondere die Erfassung einer inneren Kapselruptur ist mit dieser diagnostischen Methode nur bedingt mit einer Sensitivität von 25-68 % möglich (äußere Kapselruptur 89% [23]) [113]. Basierend auf der einfachen

Anwendbarkeit, der ubiquitären Präsenz in Kliniken und in vielen Praxen stellt die kostengünstige Mammasonographie hingegen das primäre Untersuchungsverfahren bei Verdacht auf einen SBI-Defekt in Europa dar [4, 21, 22, 119–121]. Mit hoher Präzision können mit dieser Methode eine äußere Kapselruptur anhand des echoreichen Silikonmaterials im Brustgewebe sowie ein stark ausgeprägtes Gel-Bluten mit Silikonmaterial in der Implantattasche diagnostiziert werden. Zusätzlich gelten abnormale Verformungen der Achsellymphknoten bei der SONO-Diagnostik als Indiz für das Vorliegen eines defekten SBI. Echoreiche Linien im Silikongel des SBI, sogenannte Strickleiter-Zeichen (s. Abbildung 4a), verweisen bei dieser diagnostischen Methode auf eine in den Silikonkern kollabierte Elastomer-Hülle und werden allgemein als Anzeichen für eine Implantatruptur angesehen. Die Sensitivität der SONO korreliert stark mit dem Ausmaß des vorliegenden SBI-Defektes und zusätzlich mit der diagnostischen Erfahrung des entsprechenden Untersuchers, woraus eine große Spannweite der Sensitivität von 30-81 % resultiert [23, 91, 106, 107, 116, 121–123]. Insbesondere die Strickleiter-Zeichen werden aktuell kritisch diskutiert. In diesem Zusammenhang verweist eine Studie, durchgeführt von ROCHIRA et al. mit 303 Patienten in den USA, auf die hohe Fehlerquote der SONO-Diagnostik basierend auf diesen Anzeichen. So wurden in 56 % der Fälle Strickleiter-Zeichen im Ultraschallbild beobachtet, obwohl lediglich 1 % der untersuchten Frauen einen Implantatdefekt bei Explantation aufwiesen [22].

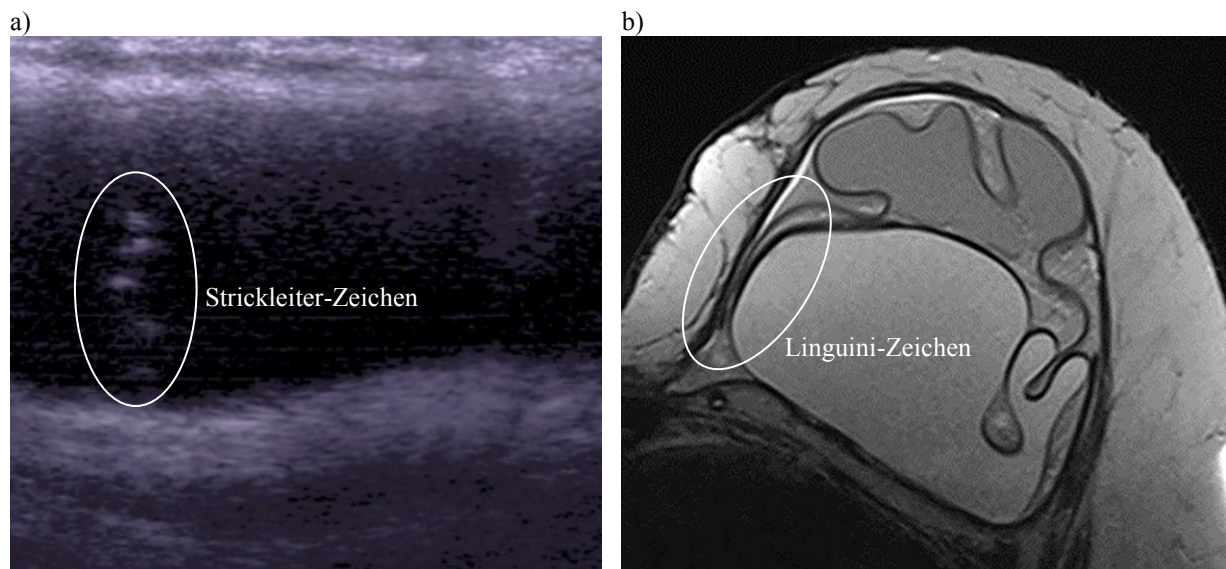


Abbildung 4: Bildgebende Diagnostik eines Patienten mit einem defekten SBI a) Strickleiter-Zeichen im Ultraschallbild, b) Linguini-Zeichen im MRT-Bild (Doppellumen-Implantat). Die SONO- und MRT-Aufnahmen wurden von DR. P. RUSCH und DR. C. JONKMANN-S-NOWACKI vom Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt.

Die Strickleiter-Zeichen korrelieren mit den sogenannten Linguini-Zeichen, die bei der MRT-Diagnostik als hypointense, häufig geschlängelt verlaufende Strukturen innerhalb des Implantates auftreten (s. Abbildung 4b). Auch Faltenbildungen und Schlüsseloch-Zeichen können beobachtet werden, sie sind jedoch keine Indizien für das Vorliegen einer Implantat-Ruptur [91]. Selektive Sequenzen, die den Silikon-Wasser-Kontrast erhöhen, steigern bei der MRT-Diagnostik die Sensitivität auf bis zu 97 %, weshalb diese Methode häufig als „Gold-Standard“ bezeichnet wird. Im Vergleich zur SONO ist das MRT jedoch mit einem größeren Zeitaufwand für die Patienten und mit einem höheren Kostenaufwand verbunden [21, 23, 106, 122].

2.1.3.3 Lokale und systematische gesundheitliche Folgen

Nach Implantation von Silikon- sowie auf anderen Materialien basierten Implantaten treten in ca. 17-36 % der Fälle lokale Komplikationen, wie Asymmetrie, Hämatome, Verformung, Kapselkontraktur, Entzündung, Infektion und Brustschmerzen, auf [26, 124–128].

Bereits ein bis zwei Wochen nach Implantation kommt es zur Ausbildung einer elastischen, dünnwandigen Bindegewebskapsel um das Implantat, wobei es in 4-15 % der Fälle zu einer Verdickung (1-10 mm) und teilweise zu einer mit Schmerzen verbundenen Verhärtung kommen kann. Diese sogenannte Kapselverhärtung bzw. Kapselkontraktur tritt häufiger nach einer Brustrekonstruktion auf als bei einer Brustaugmentation und ist aus medizinischer Sicht einer der Hauptgründe für einen Implantatwechsel [126, 129, 130]. Die klinische Klassifikation der Kapselkontraktur erfolgt nach J. BAKER in vier Graden von einer nicht kontrakten (Grad I) über eine leicht (Grad II) bzw. eindeutig verhärteten (Grad III) bis hin zu einer stark verhärteten Gewebekapsel, verbunden mit einer Dislokation und Deformation des Implantats (Grad IV) [86]. Die Dicke der Gewebekapsel korreliert mit den Baker-Graden, wobei Grad III und IV indikativ für einen Implantataustausch sind. Die Ursachen für die Kapselverhärtung in Verbindung mit dem vermehrten Auftreten von Entzündungszellen und Fremdkörpergranulomen [131] sind bis heute unklar. Jedoch werden Bakterien auf der SBI-Oberfläche sowie Fremdkörperreaktionen, hervorgerufen durch das Gel-Bluten, in der Fachliteratur aufgeführt [20, 66, 132–135]. Die Beeinflussung dieser Fremdkörperreaktionen durch beispielsweise die Oberflächenbeschaffenheit der SBI (glatt oder texturiert), die Dauer der Implantateinlage, das Füllmaterial (Kochsalz oder Silikongel) oder die Lage des Implantates als Ursachen werden kontrovers diskutiert [132, 136–138]. Im Zusammenhang mit lokalen Entzündungsreaktionen wird insbesondere die Rolle der Makrophagen, die zusammen mit Fibroblasten einen erhöhten Anteil in der inneren Schicht des Kapselgewebes

zum Implantat hin aufweisen, hervorgehoben [128, 139]. Hierbei wird nicht nur die Aufnahme der Silikone [19], sondern auch die Zersetzung des hochmolekularen PDMS in LMW-Silikone sowie die Umwandlung in Silikat durch das in Makrophagen vorliegende Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat diskutiert [66, 73, 140]. Diese Vorgänge stellen folglich allgemein die Frage nach der biologischen und chemischen Inertheit von Silikonen in den Vordergrund. Die physikalische und chemische Wechselwirkung von hochmolekularen und LMW-Silikon mit Biomolekülen, wie Plasmaproteine, und die anschließende Denaturierung wurde u. a. von BARTZOKA et al. und SUN et al. anhand von Humanalbumin sowie anhand zweier Glykoproteine, Fibrinogen und Fibronektion, untersucht [141, 142]. TAVAZZANI et al. und weitere Arbeitsgruppen konnten eine stimulierende Wirkung von Silikon auf die Makrophagenaktivität zeigen, die in einer erhöhten Produktion des entzündungsfördernden Zytokins IL-1 resultieren, ohne gleichzeitig T-Zellen zu aktivieren [78, 143, 144]. Nach PRANTL et al. könnte dies auch im Hinblick auf eine Kapsel fibrose relevant sein [139]. Studien an sensibilisierten Meerschweinchen, durchgeführt von HEGGERS et al., verweisen auf eine verstärkte zelluläre immunologische Reaktion bei Vorlage von intrazellulärem PDMS [145]. Dass PDMS nicht selbst immunogen ist, sondern als Adjuvant agiert [141], wurde erstmals von KUMAGEI et al. im Jahr 1984 in Zusammenhang mit Bindegewebsveränderungen bei Frauen mit SBI als „*human adjuvant disease*“ beschrieben [81]. In einer Studie durchgeführt von D. BORENSTEIN wurden weitere klinische Symptome, wie Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen, Müdigkeit, Depression, Haarverlust, Hautirritationen sowie geschwollene und empfindliche Achsellymphknoten, bei etwa 20-30 % der Patienten mit intakten und defekten SBI (Gesamtanzahl: 500) häufig erst nach einer Liegezeit von zehn Jahre beobachtet [79]. Mit einem vergleichbaren Krankheitsbild wie bei einer Autoimmunerkrankung wurden diese Symptome unter dem Namen „Silikonose“ zusammengefasst [79, 87, 146]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und der Einlage von Implantaten wurde nach HADJU et al. basierend auf einer Auswertung verschiedener Studien nicht bestätigt [127]. Patienten, die von der atypischen Immunerkrankung Silikonose betroffen sind, repräsentieren nach HADJU et al. nur eine kleine Minderheit von Frauen mit SBI [127]. Aktuell wird der Zusammenhang zwischen SBI und möglichen Bindegewebs- und Autoimmunerkrankungen in der einschlägigen Literatur auf der Basis zahlreicher Fallberichte sowie einiger Langzeitstudien, u. a. durchgeführt in Schweden und Dänemark, kontrovers diskutieren [147–152].

Im Januar 2011 veröffentlichte die FDA basierend auf der Auswertung von verschiedenen Fallberichten und Studien ein Statement, demzufolge Frauen mit SBI möglicherweise ein sehr

geringes, jedoch signifikantes Risiko für die Entwicklung des Non-Hodgin-Lymphoms (engl. *anaplastic large cell lymphoma*, ALCL) aufweisen [153]. Die FDA identifizierte 34 Fälle, bei denen Frauen mit SBI im Bereich der Gewebekapsel oder in der Flüssigkeit der Implantattasche einen Tumor aufwiesen. Hierbei waren insbesondere die enge Nachbarschaft zum SBI sowie die Tatsache auffällig, dass alle ALCL dem Typ ALK-positiv (Expression der ALK, *anaplastic lymphoma kinase*) zugeordnet werden konnten [152]. Zusätzlich wurde diese Form des Tumors vermehrt bei Frauen mit einem Alter unter 30 Jahren diagnostiziert [87]. Betroffene Patienten wiesen klinische Symptome, wie Brustschmerzen, Knoten in der Brust und Anschwellen der Brust auf, wobei keine Korrelation zu einem bestimmten Implantattyp aufgezeigt werden konnte [87, 154]. Nach Schätzung der FDA liegt die Anzahl der betroffenen Frauen mit ALCL bei 60 von insgesamt 5-10 Millionen Frauen mit SBI. Diese Anzahl ist geringer als die erwartete Patientenzahl mit ALCL an anderen Körperstellen, ist jedoch signifikant erhöht gegenüber der Gesamtbevölkerung [51, 155]. Allgemein ist ALCL eine seltene Krebsform, die das abnormale Wachstum der T-Lymphozyten beinhaltet, wobei u. a. Dioxine und einige Pestizide als Ursachen diskutiert werden [51, 156, 157]. Es gibt nur wenige weitere Studien, die den Zusammenhang zwischen SBI und anderen Krebsarten bei Implantatträgern untersuchen, jedoch wurde von erhöhten Fallzahlen an Cervix- und Vulva-Karzinomen sowie an Lungen- und Hirntumoren berichtet [158].

2.1.3.4 Silikonimplantate der Hersteller Poly Implant Prothèse und Rofil Medical

Nederland B.V.

In Verbindung mit dem Bekanntwerden im April bzw. Juni 2010, dass einige SBI der Hersteller Poly Implant Prothèse, Rofil Medical Nederland B.V. (Rofil) und GfE Medizintechnik (TiBREZZE-Implantate) Industriesilikon beinhalteten, gaben sowohl die französische Agentur für die Sicherheit von Gesundheitsprodukten (franz. *Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé*, Afssaps⁵), als auch das Bundesinstitut für Arzneimittel- und Medizinprodukte (BfArM) die Empfehlung zur regelmäßigen Kontrolle auf Intaktheit der SBI mittels SONO heraus. Eine allgemeine, weiterhin aktuelle Empfehlung zur Explantation dieser SBI als Vorsichtsmaßnahme wurde erst im Dezember 2011 bzw. Januar 2012 auf Basis zahlreicher Fallberichte, die ein erhöhtes Gel-Bluten bei diesen Implantaten aufzeigten, herausgegeben. Weitere Komplikationen, wie lokale Entzündungsreaktionen und angeschwollene Achsellymphknoten, die bereits von anderen SBI-Herstellern bekannt sind, wurden nur in einigen Fällen diagnostiziert. Weltweit sind etwa 400.000 Frauen und etwa

⁵ Seit Mai 2012: *Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé* (ANSM)

5.000 Frauen in Deutschland (ca. 9.200 Frauen mit SBI der Hersteller Rofil, TiBREZZE und PIP) vom sogenannten „PIP-Skandal“ betroffen [1, 2].

Im Gegensatz zu SBI mit kohäsiven, *medical-grade* Silikongel⁶, beispielsweise der amerikanischen Hersteller Allergan und Mentor wurden insbesondere für die PIP-Implantate, die nach dem Jahr 2003 implantiert wurden, höhere Rupturraten ermittelt. Diese variieren von 4 % nach CROUZET et al. [159] bis hin zu 32 % nach einer Liegezeit von 10 Jahren nach BERRY & STANEK [160]. Im Abschlussbericht der EU-Kommission von Mai 2014 wird eine gemittelte Rupturrate von 17 % nach einer Implantationsdauer von ca. 6 Jahren angegeben, die gegenüber der Rupturrate anderer Hersteller (1-4 %) signifikant erhöht ist [1, 108, 110, 111]). Die höhere Rupturrate dieser SBI könnte nach SWARTS et al. mit der reduzierten Zugfestigkeit, die einer variablen Schichtdicke (kleiner 0,57 mm) und dem vermehrten Auftreten von Fehlstellen in der Elastomer-Hülle zugrunde liegt, begründet werden [161]. Eine erhöhte Permeabilität der SBI-Hülle wurde von BERETTA et al. identifiziert, die Cholesterol im Gel explantierter PIP-SBI analysierten [73]. Des Weiteren ergab die Untersuchung des PIP-Silikongels, dass das vermehrte Auftreten von Silikon-Bluten mit einem geringeren Vernetzungsgrad des Silikongels und dem Vorliegen einzelner Silikon-Polymeren korreliert [72]. Im Vergleich zu *medical-grade* SBI anderer Hersteller wurden in diesen Implantaten keine anderen Substanzen, jedoch vermehrt LMW-Siloxane, insbesondere zyklische Methylsiloxane, D4-D6, mit Konzentrationen zwischen 130-600 µg D4-D6/g Silikongel, gefunden [1, 72].

2.2 Niedermolekulare zyklische Methylsiloxane

Mit einem Molekulargewicht kleiner 600 Da gehören die zyklischen Methylsiloxane D3-D6⁷ (cVMS) zu der Gruppe der niedermolekularen, flüchtigen Siloxane. Im Vergleich zu den Alkanen, besitzen cVMS eine kleine, nicht polarisierbare Moleküloberfläche, weshalb sie untereinander nur schwach wechselwirken und einen hohen Dampfdruck (4-1147 Pa), sowie eine geringe Oberflächenspannung (17,5-18,8 mN/m) aufweisen (s. Tabelle 1). Aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit zwischen 5 und 1560 µg/L [162], die in Salzwasser und mit steigendem Molekulargewicht weiter abnimmt, sind diese Verbindungen lipophil [54]. Neben der Wasserlöslichkeit werden die Verteilungskoeffizienten zwischen dem Zweiphasensystem

⁶ Silikongel für den medizinischen Einsatz (nach Richtlinie 93/42/EWG) wird nach ISO 14949 zusätzlich aufgearbeitet.

⁷ An dieser Stelle ist anzumerken, das Tetradecamethylcycloheptasiloxan (D7) mit einem Molekulargewicht von 519,08 g/mol auch zu der cVMS-Gruppe zählt. Es ist jedoch nicht kommerziell erhältlich und spielt im Bereich der Umweltanalytik eher eine untergeordnete Rolle.

1-Oktanol und Wasser (bzw. $\log K_{OW}$) zur Beschreibung der Lipophilie bzw. zur Beschreibung einer möglichen Anreicherung dieser Substanzen in verschiedenen Umweltmatrices herangezogen. Je nach experimentellem Aufbau (flüssigkeitschromatographisch-basierte Retentionsmethode oder im geschlossenen Multiphasensystem [163]) werden für D4-D6 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten zwischen 4,5-5,9 [164], 7,0-8,9 [165] und 6,5-9,1 [166] angegeben. Die Affinität an organischen Materialien in einem Wasser-Feststoff-System zu adsorbieren, wie aufgeschlämmte Sedimentpartikel, wird allgemein durch den Wasser-organischen Kohlenstoff-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OC}$) angegeben. Der $\log K_{OC}$ zwischen 4,2-6 für D4-D6 [167], verweist auf eine starke Tendenz in einem wässrigen System mit hohem organischen Anteil beispielsweise an Böden und Sedimenten zu binden [163].

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften von zyklischen Methylsiloxanen; zusammen gestellt nach [54, 163, 164, 166–171].

	D3	D4	D5	D6
Molekulargewicht [g/mol]	222,46	296,62	370,77	444,92
Dichte (20 °C) [g/cm ³]	1,02	0,95	0,96	0,96
Dampfdruck [Pa]	1147	132	23	4
Wasserlöslichkeit (23 °C) [µg/L]	1560	56	17	5
Oberflächenspannung (25 °C) [mN/m]	17,5	18,4	18,0	18,8
Verteilungskoeffizienten: $\log K_{OW}$	4,5	6,5	8,0	9,1
$\log K_{OC}$	/	4,2	5,2	6,0

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit, der geringen Oberflächenspannung, der Farb- und Geruchlosigkeit und der guten Kompatibilität mit unterschiedlichen Lösungsmitteln finden zyklische Methylsiloxane, neben dem bereits aufgezeigten Einsatz als Zusätze und Ausgangssubstanzen für PDMS, Anwendung in unterschiedlichen industriellen Prozessen (Herstellung von Lebensmitteln, Zusatz für Antischaumbildung, Oberflächenbehandlung) und in kommerziellen Produkten (Reinigungsmittel, Schmier- und Kriechöle, Klebstoffe, Pflegeprodukte) [172–178]. Daher fallen diese Verbindungen in die Kategorie Chemikalien mit hohem Produktionsvolumen. Im Jahr 2009 war China der weltweit größte Silikon-Hersteller ($2,7 \times 10^5$ Tonnen) und Konsument ($2,7 \times 10^5$ Tonnen), wobei auch in Europa zwischen $2-19 \times 10^3$ Tonnen zyklische Siloxane verarbeitet wurden [163]. Insbesondere die Homologen D4-D6 werden seit den 1940er Jahren mit der Markteinführung von PDMS und zunehmend seit den 1970er Jahren aufgrund ihrer geschmeidig, seidig-glänzenden Wirkung in Körperpflegeprodukten (engl. *personal care products*, PCP) und Kosmetika eingesetzt [179, 180]. Maximale Konzentrationen von 9,4 mg D4/g, 81,8 mg D5/g und 43,1 mg D6/g Nassgewicht

wurden in Kosmetika und PCP von HORRI & KANNAN mittels GC-MS ermittelt. Insgesamt wurde überwiegend D4 in Hygieneartikeln und D6 in Kosmetika und Toilettenartikeln analysiert [176]. Das Siloxan D5 dominiert gegenüber den anderen cVMS mit einem Massenanteil zwischen 0,01 % in Handlotionen bis hin zu 35% in Deodorants [176, 181, 182]. Das als toxisch eingestufte D4 wurde in den letzten Jahren in PCP und Kosmetika, nicht jedoch in Industrieprodukten vermehrt durch die beiden Siloxane D5 und D6 ersetzt [183, 184]. Hingegen treten das kleinste und das größte Homologe der cVMS, nämlich D3 und D7, nur als Verunreinigung in PCP auf [185]. Da zyklische Methylsiloxane zusätzlich zur Verdunstung u. a. auch durch Waschvorgänge in das Abwassersystem gelangen, z. B. etwa 40-50 % des Siloxans D5, das mit einer Hautlotion oder Deodorant aufgetragen wurde, sind PCP wichtige Expositionsquellen für aquatische Ökosysteme [182, 186].

2.2.1 Vorkommen in Umweltmatrices: Exposition und Akkumulation

Die vielfältigen Einsatzbereiche der anthropogenen zyklischen Methylsiloxane begründen warum diese in der Umwelt omnipräsent sind. Insbesondere die Kontamination des Abwassers und final die Exposition von Fließgewässern sind Bestandteil mehrere Studien, in denen das in PCP dominierende D5 vermehrt auftritt [163, 166, 173, 187, 188]. Während in Flussgewässern in Spanien relativ geringe D3-D5-Konzentrationen von ARAMENDIA et al. zwischen 8 und 102 ng D3-D5/L ermittelt wurden [189], quantifizierten TRIMBORN et al. im Industrieabwasser einer Kosmetikfirma in Deutschland Siloxan-Konzentrationen zwischen 0,15-0,94 mg D4/L und 1,3-26,5 mg D5/L [190]. Auch im Zulauf einer Kläranlage in den USA wurden erhöhte Konzentrationen von bis zu 714 µg PDMS/L analysiert. Der Effluent derselben Anlage wies eine um den Faktor 50 geringere PDMS-Konzentration auf (5-13 µg PDMS/L), hingegen konnte eine zunehmende Anreicherung der Substanzen im Klärschlamm mit PDMS-Konzentrationen im g/kg-Bereich beobachtet werden [191]. Nahezu unbelastete Sedimente aus dem Adventfjord in Norwegen mit cVMS-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 1 ng D4-D6/g Nassgewicht wurden von WARNER et al. analysiert [192]. Siloxan-Konzentrationen in marine Biota aus dem Nordatlantik wurden zwischen 180-530 ng D5/g Fett und 6-14 ng D6/g Fett in Meerestieren, wie Kabeljau, Seeskorpion und Hering, detektiert [192]. Hingegen wurden in Zooplankton und im Fischtran (engl. *blubber*) höherer Säuger, wie Bartrobben und Grindwale, keine bzw. geringe cVMS-Konzentrationen (maximal 42 ng D5/g Fett) gefunden [166, 192].

Zyklische Methylsiloxane gelten als persistent und potentiell bioakkumulativ [193, 194]. Nach der Stockholmer Konvention werden Schadstoffe als persistent bezeichnet (engl.

persistent organic pollutants, POP), wenn die organischen Substanzen eine Halbwertszeit in der Umwelt über zwei Tage, einen Biokonzentrationsfaktor, der das Konzentrationsverhältnis zwischen der Biokonzentration z. B. im Fisch und Wasser angibt (engl. *bioconcentration factor*, BCF), und einen Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW}$ oberhalb von fünf ($\log K_{OW}$ 6-9 für D4-D6) aufweisen [195]. Experimentell wurden ein BCF in verschiedenen Fischen und Säugetieren zwischen 7000-13400 L/kg für D4 [196] und 5900-13700 L/kg für D5 [188, 197] ermittelt. Aufgrund der starken Tendenz in Lipiden zu akkumulieren (vorzugsweise im Fettgewebe, aber auch in verschiedenen Organen [198, 199]), zeigen D4 und D5 einen um Faktor 6-14 höheren BCF als das polychlorierte Biphenyl PCB 180. Allerdings wurde für das Cyclohexasiloxan D6 ein um den Faktor 5-10 kleinerer BCF gegenüber PCB 180 ermittelt [194]. Im Vergleich zu den experimentell bestimmten BCF wurden in Laborversuchen an Dickkopferlitzten und Guppies geringere BCF zwischen 1040-4920 L/kg für D5 bestimmt [200, 201]. Eine Biomagnifikation (Biomagnifikation Faktor $BMF > 1$) für D5 (BMF 0,2-0,8), also eine Anreicherung in der Nahrungskette, konnte bisher nicht eindeutig bestätigt werden [197, 202]. Für die beiden Siloxane D4 und D6 konnten POWELL et al. anhand der Nahrungskette Kabeljau-Hering und Kabeljau-Krabben in Norwegen eine geringe Biomagnifikation mit BMF zwischen 1,0-1,2 für D4 und 0,9-1,75 für D6 aufzeigen [202].

Über Verdampfung gelangen die cVMS in die Atmosphäre, hierzu wurden Hintergrundkonzentrationen in einer ländlichen Region in Schweden im Bereich von 0,3-9 ng D5/m³ Luft von MCLACHLAN et al. bestimmt. Um den Faktor 10⁶ erhöhte cVMS-Konzentrationen wurden von SCHWEIGKOFER & NIESSNER [203] und BADIABO et al. [204] u. a. in Biogas-Anlagen mit 0,1-8,8 mg D3-D5/m³ sowie in Kläranlagen mit 2,7-15 mg D5/m³ detektiert. Insbesondere in Biogas-Anlagen können erhöhte Siloxan-Konzentrationen in der Verbrennungskammer und Umwandlung in mikrokristallinem Quarz (SiO₂) zu erheblichen mechanischen Problemen führen [203–205]. Beträchtliche Konzentrationsvariationen wurden in der Innenraumluft von Wohn-, Schlaf- Bade- und Kinderzimmer sowie in öffentlichen Einrichtungen, wie Bürogebäude, Schulen und Supermärkten, gefunden. Allgemein konnten in Großbritannien höhere lineare und zyklische VMS-Konzentrationen von bis zu 270 µg VMS/m³ gegenüber 170 µg VMS/m³ in Italien und 2,2-6,2 µg VMS/m³ in den USA quantifiziert werden [165, 206, 207]. Aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit wurden zusätzlich höhere D4- und D5-Konzentrationen bis zu 40 µg/m³ gegenüber 15 µg L5-L6/m³ in der Innenraumluft detektiert [165]. Die inhalative und dermale Exposition mit cVMS bei Verwendung von PCP und Kosmetikprodukten und die mögliche Erhöhung der cVMS-Blut- und Brustmilchkonzentration von norwegischen Frauen wurde in drei Studien untersucht.

Sowohl im Blutplasma mit Konzentrationen zwischen 2,5-17,7 ng D4-D6/mL [208], als auch in der Brustmilch mit maximalen Konzentrationen von 5-10 ng D4-D6/mL [166] tritt das Octamethylcyclotetrasiloxan als dominierendes cVMS auf. Eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der PCP-Verwendung bzw. allgemein der Verwendung von PCP und der cVMS-Blut- bzw. Brustmilch-Konzentration konnte von HANSEN et al. und KAJ et al. nicht ermittelt werden [166, 208]. Auch BIESTERBOS et al. konnten keine Korrelation zwischen der Verwendung von PCP und einer erhöhten Siloxan-Konzentration in der ausgeatmeten Luft der Probanden aufzeigen [209]. JOVANOVIĆ et al. postulieren anhand von Tierexperimenten dermale Expositionsraten nach einmaliger Anwendung von Deodorants von etwa 0,5 % der aufgetragenen Gesamtmenge an D4 und 0,04 % an D5 [179, 210]. Der Großteil der aufgetragenen D4- und D5-Menge verdunstet (etwa 90 %), bevor eine Absorption erfolgen kann [210, 211]. Für andere PCP-Zusätze, wie Galaxolid und Xylen, konnten HUTTER et al. sogar eine Korrelation zwischen der dermalen Exposition mit PCP und dem Alter der Probanden aufzeigen, wobei eine signifikante Steigerung der Aufnahmerate bei Frauen über 50 Jahren beobachtet wurde [212, 213]. Berechnete Tagesdosen bei Verwendung von PCP und Kosmetika schwanken je nach Studie zwischen 3,7 mg VMS/Tag [181] und 996 mg/Tag [179]. Aufgrund des hohen Dampfdrucks und auf Basis von Physiologie-basierten pharmakokinetischen Modellen ist insbesondere für die beiden Siloxane D4 und D5 die Exposition über die Atemwege für den Menschen von Bedeutung [176]. Hierzu wurden von UTELL et al. bereits 1998 Inhalationsstudien mit D4 angereicherter Luft (122 µg/L) bei zwölf Probanden für eine Stunde durchgeführt und eine durchschnittliche Aufnahme über die Atemwege von etwa 12 % postuliert [214]. Im Gegensatz zu den cVMS in der Innenraumluft dominieren lineare Siloxane nach LU et al. im Hausstaub mit Konzentrationen bis zu 6,2 µg Ln/g bei Expositionsraten allgemein für VMS von 16 ng VMS/Tag [215]. Die vornehmlich inhalativ bedingte Exposition und anschließende Akkumulation im Vollblut und Fettgewebe von Frauen und Männern wurde von XU et al. anhand eines Fallbeispiels einer Silikonfabrik in China untersucht. Bei einer gemittelten Luftkonzentration von 34 µg D6/m³ bis zu 3 mg D4/m³ in der Silikonfabrik gegenüber 0,09-0,71 µg D4-D6/m³ in der Innenraumluft der Kontrollstandorte konnte diese Arbeitsgruppe erhöhte Siloxan-Gehalte im Bauchfett der Mitarbeiter (bis zu 300 ng D4-D6/g) gegenüber der allgemeinen Bevölkerung (bis zu 141 ng D4-D6/g) detektieren. Auch im Blutplasma der Mitarbeiter war eine Anreicherung von cVMS mit Konzentrationen von bis zu 250 ng D4-D6/mL im Vergleich zur Kontrollgruppe mit maximal 8 ng D4-D6/mL Plasma zu beobachten [216, 217].

Neben der externen Exposition über die Raumluft, das Trinkwasser oder die Nahrung kommt es, wie bereits im vorherigen Kapitel angesprochen, bei Implantatträgern von SBI zu einer internen Exposition, u. a. durch Gel-Bluten. Hierbei wurden von FLASSBECK et al. nicht nur eine erhöhte Siloxan-Konzentration im Brustgewebe, sondern zusätzlich eine gegenüber einer Kontrollgruppe erhöhte D3-D6-Konzentration im Vollblut (2-90 ng D3-D6/mL Blut) bzw. im Blutplasma ermittelt (2-50 ng D3-D6/mL Plasma) [98].

2.2.2 Eliminierung und Metabolisierung in der Umwelt und in höheren Organismen

Die Zersetzung von PDMS und zyklischen Methylsiloxanen kann in der Umwelt grundsätzlich abiotisch über Hydrolyse und chemisch reaktive Stoffe sowie enzymatisch mit Trypsin, Esterase und Lipase erfolgen [218, 219]. Zudem tritt eine thermische Zersetzung bei Temperaturen oberhalb von 180 °C sowie eine Alterung von hochmolekularen Silikonen unter Ausbildung zyklischer und linearer VMS, speziell von D4, auf [54].

Insbesondere die kleineren Homologen der zyklischen Methylsiloxane werden aufgrund ihres Dampfdrucks schnell in die Atmosphäre freigesetzt, wo es zu einer chemischen Zersetzung durch reaktive Sauerstoffspezies kommt (engl. *reactive oxygen species*, ROS) [220]. Da die Reaktion mit Ozon oder Nitrat-Radikalen vergleichsweise langsam abläuft, überwiegt die Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen und die anschließende Bildung von Silanolen. Diese können zum einen aufgrund einer erhöhten Wasserlöslichkeit mit dem Niederschlag zurück auf die Erdoberfläche gelangen oder zum anderen mit ROS bis zur vollständigen Mineralisierung reagieren [220–222]. Bei einer Lebensdauer von 6-23 Tagen von D4, 3-15 Tagen von D5 und sechs Tagen von D6 in der Troposphäre werden zyklische Methylsiloxane über eine Distanz von über tausend Kilometer transportiert, was zu einer breitflächigen Kontamination der Umwelt beitragen kann [188, 223]. Die Photolyse hingegen ist aufgrund ausbleibender Absorption im Wellenlängenbereich der Ultraviolettstrahlung (UV: 200-380 nm) für diese Verbindungen nicht relevant [224].

In Böden und Sedimenten erfolgt überwiegend die Ringöffnung der cVMS und anschließende Zersetzung unter hydrolytischer Bindungsspaltung und Bildung des Hauptproduktes Dimethylsilandiol (DMSD) [198, 225]. Die Hydrolyserate variiert hierbei mit der Größe des cVMS, der Vorlage von Katalysatoren, wie zweiwertige Calcium- und dreiwertige Eisen- bzw. Aluminium-Kationen, Säuren und Basen sowie mit dem organischen Anteil des Bodens und der Bodenfeuchte [54, 163, 167, 220, 226, 227]. Bei neutralen Bedingungen (pH 7) und einer Temperatur von 25 °C wurden Hydrolyseraten von 4 Tagen für D4, 74 Tagen für D5

und 400 Tagen für D6 bestimmt [167]. Hingegen wurden geringere Hydrolyseraten zwischen 10-13 Tagen für D5 und 158-202 Tagen für D6 in trockenen Böden mit einem relativen organischen Anteil von 50-90 % erreicht [163]. Zusätzlich wurden in saurer und in basischer Umgebung die schnelle Umwandlung von DMSD unter Kondensation und Dimerisierung zu linearen und zyklischen VMS sowie die vollständige Mineralisierung bis hin zu Siliziumdioxid, Kohlenstoffdioxid und Wasser beobachtet [54, 168, 226, 228, 229]. In einem komplexen System, wie beispielsweise einer Kläranlage, werden cVMS nicht nur über Verdampfung, sondern auch über den mikrobiellen Zerfall eliminiert. Ein Großteil des D4-Anteils in diesem System adsorbiert an organischen Partikeln (ca. die Hälfte) und ist dem Zersetzungsprozess nicht mehr zugänglich [229–232]. Studien zur anaeroben Biodegradierung von D4 im kompostierten Klärschlamm wurden von GRÜMPING et al. durchgeführt. Hierbei konnte diese Arbeitsgruppe eine vollständige Umsetzung von D4 zu DMSD in maximal 100 Tagen nachweisen [230].

Die enzymatische Umsetzung von cVMS in höheren Organismen wurde in verschiedenen Tierexperimenten und Humanstudien über intravenöse, inhalative und orale Exposition vornehmlich mit isotoopenmarkierten Standards untersucht. Erste Experimente zur Metabolisierung von Cyclotetra- und Cyclopentasiloxan in Ratten wurde von VARAPRATH et al. durchgeführt [11, 12, 177, 178, 199]. Nach Injektion einer ^{14}C -D4-Emulsion und anschließender Extraktion des Vollblutes bzw. des Plasmas, der Exkremente (Urin und Kot) sowie der Lunge und Leber der exponierten Fischer-Ratten mit Tetrahydrofuran (THF) analysierte diese Arbeitsgruppe die Extrakte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) und radio-metrischer Detektion bzw. nach Derivatisierung mittels GC-MS. Während der Ausgangsstoff übermäßig nur im THF-Extrakt der Lunge analysiert werden konnte, wurden im Blut sowie in den Organen sowohl D4, als auch die hydrolysierten Metabolite identifiziert [11]. Im Urin wurden hingegen nur die beiden Hauptprodukte Methylsilantriol (**1**) und DMSD (**2**), jeweils mit einem prozentualen Anteil von 30-38 % bzw. 30-50 %, sowie die Nebenprodukte Tetramethyl-disilandioliol (**3**: 2-10 %), Trimethyl-disilantrioliol (**5**: 4-8 %), Dimethyl-disilantetrol (**4** bzw. **6**: 8-10 %), Methyl-disilanpentol (**7**: 8-10 %) und Hexamethyl-trisilandioliol (**8**: 1%) beobachtet (vgl. Abbildung 5) [177]. Inhalationsstudien weiterer Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass etwa 43-53 % des aufgenommenen D4 über die Atemluft aus dem Organismus entfernt wird [198, 199, 233]. Die Ausscheidung des restlichen isotoopenmarkierten Anteils erfolgt über die Exkremente (30-50 %), wobei ein kleiner prozentualer Anteil auch noch 7 Tage nach Exposition im Skelett analysiert werden konnte [198, 199]. Der Abbau von D4 im

Organismus nach inhalativer Exposition erfolgt analog zu anderen lipophilen Stoffen, wie beispielsweise Styrol. Während eine schnelle D4-Eliminierung aus dem Blutplasma in ca. 7-8 Stunden auch anhand einer Human-Inhalationsstudie, durchgeführt von UTELL et al., beobachtet werden konnte, erfolgt die Eliminierung aus dem Fettgewebe mit Rückdiffusion in das Blutsystem langsam (bis zu 11 Tage) [11, 16, 100, 199, 214, 234]. Bei D4-Ingestion hingegen erfolgt eine langsame Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt und vornehmlich die Eliminierung aus dem Organismus über den Kot [235]. Ein vergleichbares Inhalations-experiment mit ^{14}C -markierter D5 angereicherter Luft führte zu einem vergleichbaren Metabolitprofil für dieses Siloxan, jedoch konnten zusätzlich die beiden Vorstufen mit einem oxidierten D5-Ringsystem (D4D'CH₂OH) und mit einem Hydroxyl-D5 (D4D'OH) im Urin der Ratten identifiziert werden (s. Abbildung 5) [12].

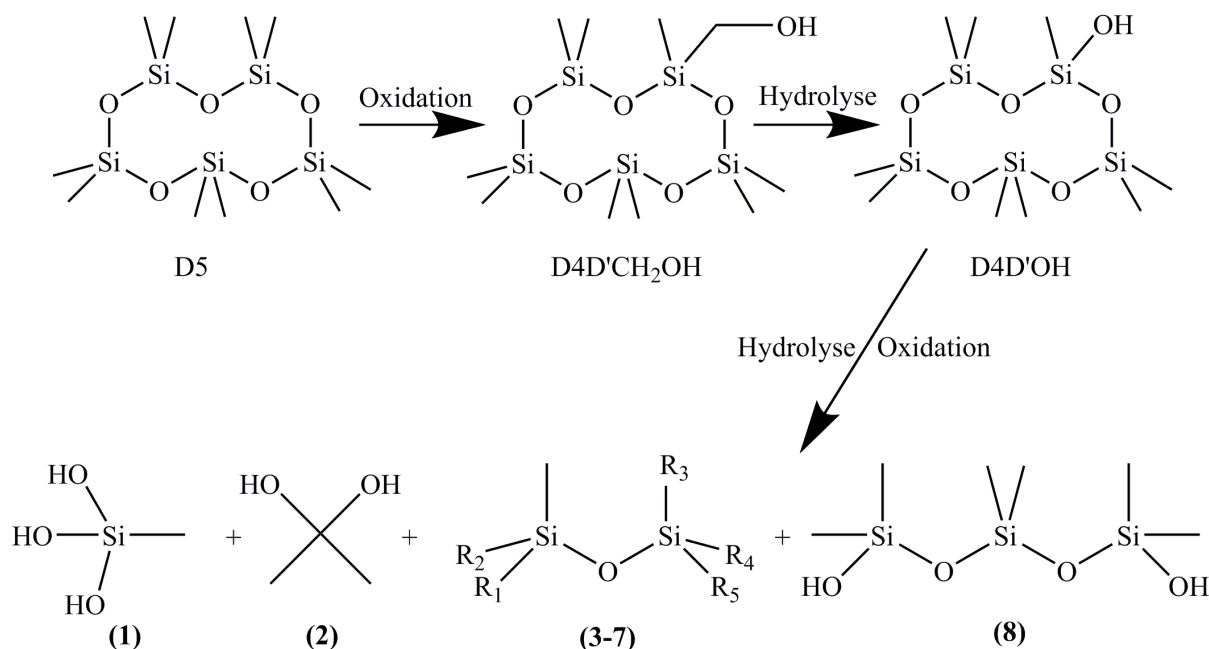


Abbildung 5: Möglicher Reaktionspfad von Cyclopentasiloxan in Fisher-Ratten. Mit (1) Methylsilantriol, (2) Dimethylsilandiol DMSD (3) Tetramethylsilandiol (Dimerdiol) mit $\text{R}_{2,4} = \text{CH}_3$ und $\text{R}_{1,5} = \text{OH}$, (4) Dimethylsilantetrol (Dimertetrol) mit $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ und $\text{R}_{1,3,5} = \text{OH}$, (5) Trimethylsilantriol (Dimertriol) mit $\text{R}_{2,3} = \text{CH}_3$ und $\text{R}_{1,4,5} = \text{OH}$, (6) Dimethylsilantetrol (Dimertetrol) mit $\text{R}_3 = \text{CH}_3$ und $\text{R}_{1,2,4,5} = \text{OH}$, (7) Methylsilanpentol (Dimerpentol) mit $\text{R}_{1,5} = \text{OH}$ und (8) Hexamethyltrisilandiol (Trimerdiol); modifiziert nach [12].

2.2.3 Toxikologische Eigenschaften

Aufgrund des hohen Produktionsvolumens der zyklischen Methylsiloxane, ihrer Omnipräsenz und der damit einhergehenden potentiellen Exposition, wurden verschiedene Tierexperimente zur Bewertung der Toxikologie durchgeführt. Wie bei den Experimenten zur Erfassung der Pharmakokinetik von cVMS (vgl. Kap. 2.2.2) stehen auch in den toxikologischen Studien die beiden Homologen D4 und D5 im Fokus.

Subakute und chronische Inhalationsstudien führten bei den exponierten Ratten sowohl bei D4, als auch bei D5 mit steigender Luftkonzentration ab 420-10.800 mg D4/m³ und ab 400 mg D5/m³ zu einer zunehmenden Reizwirkung auf den Atemtrakt [13, 14]. Das vermehrte Vorliegen von Makrophagen im Lungengewebe deutet zusätzlich auf eine entzündliche Wirkung dieser Stoffe hin [13, 14]. Neben der Schädigung des Lungengewebes konnte bei Kurzzeit-Inhalationsexperimenten über die Dauer von 3-6 Monaten bereits bei geringen D4- bzw. D5-Luftkonzentrationen (83 mg D4/m³ und 380 mg D5/m³ [223]) eine reversible, dosisabhängige Lebervergrößerung (ca. 25-35 % bei D5 [236]) mit einer signifikante Induktion des Leberenzym Cytochrom P450 beobachtet werden. Langzeitschäden oder Tumorbildungen wurden nicht dokumentiert [18, 233, 237, 238]. Geschlechtsspezifisch wurde eine verminderte Fertilität bei weiblichen Ratten durch Verzögerung des Eisprunges bei einer D4-Konzentration oberhalb von 850 mg D4/m³ diagnostiziert [16–18]. Ab einer Expositionskonzentration von 8.400 mg D4/m³ wurden zudem eine erhöhte Peroxidase-Aktivität im Uterus (schwach östrogenen Effekt), eine Zunahme des Uterusgewichtes und eine erhöhte Sterblichkeitsrate um 50 % beobachtet [13, 14, 17, 239]. Für das Cyclopentasiloxan resultieren bei Expositionskonzentrationen von bis zu 2.400 mg D5/m³ vermehrt Gebärmutterkarzinome, jedoch keine reproduktionstoxischen Effekte [16, 18]. Eine mögliche kanzerogene Wirkung von cVMS bei dermalen Exposition wird in der Fachliteratur kontrovers diskutiert. Insbesondere eine mögliche Korrelation zwischen einer um ca. 30 % steigenden Anzahl an Brustkrebs im äußeren Quadranten der Brust und der Verwendung von Deodorants aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und langen Verweilzeit auf der Haut ist Gegenstand der Diskussion [240–242].

In Bezug auf die interne Exposition von Implantatträgern mit SBI wurden bereits Ende der 1990er Jahre zwei Tierstudien durchgeführt. Hierbei konnten KALA et al. nach einmaliger Injektion eines SBI-Destillats⁸ eine Verteilung der VMS im lymphatischen System sowie in unterschiedlichen Organen mit erhöhter Persistenz von D5 und D6 gegenüber D4 beobachten.

⁸ Bestehend aus zyklischen (D3, 30 %; D4, 45 %; D5, 8%; D6 und D7, 2 %) und linearen VMS (L5-L16 mit L6-L13, 80 %) [9]

Im Vergleich zu den linearen VMS wurden im Uterus und in den Ovarien der weiblichen Mäuse vermehrt cVMS wiedergefunden [9]. Die letale Dosis, bei der 50 % der Mauspopulation gestorben sind, wurde von LIEBERMANN et al. mit 28 g D3-D6/kg Körpergewicht nach einmaliger intravenöser Injektion eines cVMS-Destillats mit Siloxan-Konzentrationen von 3,5 bzw. 35 g D3-D6/kg Körpergewicht nach 5-8 Tagen ermittelt. Hierbei entwickelten die exponierten Tiere Entzündungen der Leber und der Lunge sowie Lebernekrosen. Anhand dieser Untersuchungen wurde die letale Dosis von D4 auf 6-7 g D4/kg Körpergewicht geschätzt [15].

Auf Basis der geringen Wasserlöslichkeit und des BCF erfolgt die Einstufung für D4 als nicht oder schwach toxisch für aquatische Lebewesen mit einer Expositionskonzentration, bei der keine signifikante behandlungsbedingte Wirkung beobachtet werden konnte (engl. *no observed effect concentration*, NOEC), von 4,4 µg D4/L (für D5 8,7 µg/L) [200, 243]. Für D6 wurde aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von 5 µg/L kein NOEC bestimmt. NOEC-Werte in Sedimenten wurden für D4 bei 44 µg/g und für D5 bei 69 µg/g festgelegt.

Bezogen auf den menschlichen Organismus wurden vom europäischen wissenschaftlichen Ausschuss für Verbraucherprodukte und von der kanadischen Umwelt- und Gesundheitsbehörde auf Grundlage der zuvor vorgestellten Inhalationsstudien mit auftretenden Lungenläsionen niedrigste beobachtbare Wirkungskonzentrationen (engl. *lowest observed effect level*, LOEL) bei 420 mg D4/m³ und 150 mg D5/m³ festgelegt [223]. Rechtlich verbindliche Arbeitsplatzgrenzwerte wurden bisher nicht angegeben, jedoch wurden vom Umweltbundesamt Vorsorgerichtwerte mit 0,4 mg D3-D6/m³ und Gefahrenrichtwerte mit 4 mg D3-D6/m³ in Innenräumen herausgegeben [223].

2.3 Stand der Forschung: Silikon- und Siloxan-Analytik

Im Bereich der Umwelt- und Bioanalytik werden zur Analyse von hochmolekularen Silikonen und niedermolekularen Methylsiloxanen verschiedene element- und speziesspezifische instrumentell-analytische Verfahren angewendet. Für Analyt-Konzentrationen im mg/g- bis µg/g-Bereich werden häufig elementspezifische Methoden, wie die Atomabsorptions- (AAS) oder Atomemissionsspektrometrie mit Plasmaanregung, elektrothermaler Anregung oder Atomisierung im Graphitrohr, eingesetzt [191, 244, 245]. Bereits in den 1960er und 1970er Jahren wurden spektroskopische Methoden im UV- oder Infrarot-Bereich (IR: 2,5-25 µm bzw. 400-4000 cm⁻¹) u. a. von HORNER et al. und FRICK & BAUDISCH nach Extraktion zum Nachweis von Silikonmaterialien in Nahrungsmitteln sowie Humanproben (Organe, wie Niere und Gehirn) verwendet [246, 247]. Eine Quantifizierung im Spurenbereich ist bei der

IR-Spektroskopie auf der Bande der charakteristischen, symmetrischen Silizium-Dimethyl-Deformationsschwingung bei 1260 cm^{-1} gegeben [248]. *In vitro* Studien zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von PDMS bei Frauen mit bleeding oder defekten SBI wurden mit Protonen- und Silizium-NMR von PFLEIDERER & GARRIDO durchgeführt [8, 10, 249].

Die sensitive, speziesspezifische Analyse von Silikonen und flüchtigen Methylsiloxanen im Spuren- und Ultraspurenbereich wird derzeit maßgeblich durch die Kopplung von chromatographischen Systemen mit Massenspektrometern, Atomemissionsdetektoren oder Flammenionisationsdetektoren (FID) realisiert. Hingegen wurde die direkte Analyse ohne vorherige chromatographische Trennung flüchtiger Methylsiloxane in gasförmigen Proben von BADJAGBO et al. mittels chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) und Tandem-MS durchgeführt [204, 250]. Hochmolekulare Silikone und Siloxan-Metabolite (Silanole) werden beispielsweise mittels Umkehrphasen-Chromatographie oder Gel-Permeations-Chromatographie getrennt und anschließend über einen radiometrischen Detektor oder über ICP-MS mit Bestimmungsgrenzen im unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich detektiert [191, 251]. Aufgrund ihres hohen Dampfdruckes werden VMS überwiegend nach Extraktion mittels GC-MS bei konventioneller split/splitlosen-Injektion eines Extraktes analysiert (s. Tabelle 2). Hierbei werden die zyklischen Siloxane auf einer unpolaren PDMS- oder polaren Polyethylenglycol (PEG [192, 208])-basierten Kapillarsäule getrennt und über einen Elektronenstrahl fragmentiert und ionisiert (Elektronenstoßionisation, EI). Die Identifizierung der cVMS erfolgt zum einen über die Retentionszeit und zum anderen über das spezifische EI-MS-Spektrum im Vergleich zu analytischen Standards. Über die Detektion typischer Masse-Ladungsverhältnisse (m/z) im sogenannten SIM-Modus (engl. *selected ion monitoring*) können die cVMS quantifiziert werden. Für die Extraktion von PDMS und cVMS aus verschiedenen meist zuvor homogenisierten, biologischen Matrices und Umweltproben werden grundsätzlich unpolare, aprotische Lösungsmittel, wie n-Pentan [252], n-Hexan [98, 216, 220], und etwas polarere Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran [214, 253] und Ethylacetat [254, 255], eingesetzt. Je nach Matrix können nach einfacher flüssig-flüssig-Extraktion und anschließender GC-MS-Analyse Nachweisgrenzen (engl. *limit of detection*, LOD) zwischen 0,7-10 ng D4-D6/g Feuchtgewicht in Biota [192] und $2\ \mu\text{g}$ D3-D6/L Blutplasma erzielt werden. Bestimmungsgrenzen (engl. *limit of quantitation*, LOQ) werden zwischen 2-4 ng D4-D6/g in Bodenproben [257] und in Humanproben zwischen 0,4-1 ng D4-D6/g Blutplasma [216, 217] bis hin zu 17 ng D4/g Blutplasma [214] bzw. 1,2-2,5 ng/g im Fettgewebe [217] erreicht.

Tabelle 2: GC-MS basierte Methoden zur cVMS-Analytik in Umweltmatrices und biologischen Proben.

Analyt	Matrix	Proben- vorbereitung	Methode	Wieder- findungs- -rate [%]	LOQ	Referenz
D4-D6	Biota	SPE, Elution n-Hexan	GC-MS	56-78	0,6-1,5 ng/g	[187]
D4-D6	Fisch Biota	n-Hexan- Extraktion	GC-MS	83-91	MDL: 0,7-10 ng/g	[192]
D4-D6	Biota	n-Pentan- Extraktion	LVI- GC-MS	70-91	80-130 ng/g	[252]
D3-D6	Klärschlamm Sedimente	n-Hexan- Extraktion	LVI-GC- MS	80-100	0,03-0,4 ng/g	[256]
D4-D6	Böden	n-Hexan- Extraktion	GC-MS	94-108	2-4 ng/g	[257]
D5	Sedimente	Ethylacetat- Extraktion	<i>on-column</i> - GC-MS	113	110 ng/g	[255]
D5	Flusswasser	/	HS-GC-MS	86-100	10 ng/L	[188]
D3-D6	Abwasser	/	SPME- GC-MS	59-93	MDL: 3-8 ng/L	[258]
D3-D6	Flusswasser	/	SPME- GC-MS	k. A.	18-34 ng/L	[173]
D4-D6	Blutplasma Bauchfett	n-Hexan- Extraktion	GC-MS	89-95 71-84	0,4-1 ng/g 1,2-2,5 ng/g	[216, 217]
D4-D6	Blutplasma	n-Hexan- Extraktion	GC-MS	95-97	1,3-2,7 µg/L	[208]
D3-D6	Blutplasma Gewebe	n-Hexan- Extraktion	GC-MS	80-100	LOD: 2,0 µg/L	[7, 98]
D4	Blutplasma	THF- Extraktion	GC-MS	90	17,0 ng/g	[214]

MDL: Nachweisgrenze der Methode (engl. *method detection limit*)

k. A.: keine Angaben

Aufgrund der breiten Verwendung von PDMS und VMS ist das Hauptproblem bei der Silikon- und Siloxan-Analytik die Kontaminationsgefahr der Proben, des Analysensystems und der verwendeten Chemikalien. Begründet mit der hohen Evaporationsrate aus z. B. PCP und der damit verbundenen möglichen Probenkontamination durch die Innenraumluft werden in der Fachliteratur der Einsatz von Reinraumwerkbänken mit Aktivkohlefiltern, Laminar Flow Boxen oder selbst gebaute Purge-und-Trap-Systeme aufgeführt [187, 192, 255, 259]. Auch die direkte Kontamination durch das Analysesystem bzw. durch die verwendeten Verbrauchsmaterialien, wie Silikon-Septa, mit Glaswolle gefüllte Glasverdampferrohre und PDMS-basierte GC-Kapillare, werden diskutiert [168, 176, 178, 260].

Die Analyse kleinster Analyt-Konzentrationen kann allgemein durch die Reduktion des Lösungsmittels erfolgen. Im Hinblick auf die hohe Flüchtigkeit der VMS stellt das Einengen des Extraktionsmittels mittels Rotationsverdampfer oder über einen Stickstoffstrom aufgrund des resultierenden Analytverlustes keine Möglichkeit dar [162, 188, 255]. Deshalb werden andere Anreicherungstechniken, wie die Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) unter Verwendung von Polystyren-, Polyacrylat- oder Alkylsilan⁹-Materialien, bei der Analyse von Biomaterialien und wässrigen Umweltproben genutzt [187, 236, 259]. Auch die Anreicherung zyklischer Methylsiloxane aus einer gasförmigen Probe in einem Lösungsmittel oder die Anreicherung in einer Kühlfalle (Kryotrap) können zu einer Sensitivitätssteigerung führen [166, 261]. Neben dem hohen Zeitaufwand für diesen zusätzlichen Schritt in der Probenvorbereitung beinhalten diese Techniken aufgrund der erhöhten cVMS-Konzentrationen in der Innenraumluft, insbesondere in der Laborluft auch eine zusätzliche Kontaminationsgefahr der Proben [162, 176, 179, 188, 203].

Mit Quantifizierungsgrenzen im ng/L-Bereich finden vermehrt alternative GC-Injektionstechniken Anwendung. Insbesondere Techniken zur Analyse des Dampfraumes (engl. *headspace*, HS), bei der die flüssige Probe kontinuierlich durchmischt wird [262], werden häufig zur Analyse zyklischer Methylsiloxane in Gewässerproben eingesetzt [173, 186, 188]. Mit einer Bestimmungsgrenze von 10 ng D5/L bei Inkubationsbedingungen von 80 °C (10 min.) analysierten SPARHAM et al. Fluss- und Abwasserproben mittels HS-GC-MS [188]. Eine Kopplung zwischen der Gasphasen-Analyse und Anreicherung der Analyten auf einem Trägermaterial stellt die statische HS-Festphasenmikroextraktionstechnik (engl. *solid phase microextraction*, SPME) dar. Hierbei adsorbieren die flüchtigen Analyten in der Gasphase an eine Adsorber-Faser, häufig PDMS/Divinylbenzol oder ein Diphenylen-Oxid-Polymer [188, 263]. Die Überführung der Analyten auf die chromatographische Trennsäule erfolgt im Injektor mittels thermischer Desorption [262, 264, 265]. Mit dieser Technik und unter Verwendung von PDMS-basierten SPME-Fasern konnten von den Arbeitsgruppen COMPANIONI-DAMAS et al. und XU et al. MDL zwischen 3-8 ng D3-D6/L Probe bzw. LOQ von 18-34 ng D3-D6/L Probe in Abwasser- und Gewässerproben erreicht werden [173, 258]. Eine Sensitivitätssteigerung kann auch durch die Injektion größerer Probenvolumina bei der Flüssigaufgabe erzielt werden. Mit Injektionsvolumina von 10-800 µL [175, 256] basiert diese sogenannte *large volume injection* (LVI)-Technik allgemein auf der Verdampfung des organischen Lösungsmittels, der Abführung der lösungsmittelreichen Gasphase und der Anreicherung der Analyten im Glasverdampferrohr bzw. auf der stationären Phase [266]. Bei

⁹ Häufiger Einsatz von C4 (Butylsilan)- und C18 (Octadecylsilan)-PDMS-basierte Materialien [236]

den beiden häufigsten zum Einsatz kommenden LVI-Techniken handelt es sich erstens um die im Jahr 1985 von GROB et al. publizierte *on-column*-Technik [267], bei der die Injektion (Probenvolumina zwischen 100 und 800 μL [175]) direkt auf die GC-Säule mit anschließender Lösungsmittelausblendung erfolgt. Zweitens können bei der Verwendung eines temperaturprogrammierbaren Injektionssystem (engl. *programmed temperature vaporization*, PTV) mit aktiver Kühlung, erstmals publiziert von VOGT et al. im Jahr 1979 [268], bis zu 150 μL Probenlösung im solvent-split-, splitlosen- bzw. *vapor overflow*-Modus injiziert werden. Bei der meist verbreiteten solvent-split-Variante erfolgt die Injektion der Probe in das Glasverdampferrohr bei Temperaturen unterhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels. Anschließend wird das Lösungsmittel mit einem Gegenstrom über den Split-Ausgang ausgeblendet, wobei die höher siedenden Analyten im Liner verbleiben. Erst durch eine schnelle Aufheizung des Liners und Umschalten in den splitlos-Modus werden die Analyten auf die Trennsäule überführt [175]. Insbesondere bei komplexen Probenmatrices mit höher-siedenden Komponenten, die die Überführung leichtflüchtiger Komponenten beeinflussen können, ist die PTV-Variante im Vorteil. Jedoch werden sehr flüchtige Analyten mit einer Siedepunktdifferenz kleiner 150 $^{\circ}\text{C}$ zum Lösungsmittel über den Split-Ausgang entfernt [269]. Nach n-Pentan-Extraktion und bei einem Injektionsvolumen von 15 μL erzielten WANG et al. mit dieser PTV-Technik im solvent-split-Modus LOQ zwischen 80-130 ng D4-D6/g Probe in verschiedenen Umweltproben, wie Biota, Sedimente und Böden [252]. Auf der Basis einer splitlosen-LVI-PTV-Methode¹⁰ konnten COMPANIONI-DAMAS et al. LOQ für die zyklischen Methylsiloxane D3-D6 im mittleren pg/g-Bereich in Klärschlamm und Bodenproben erreichen [256].

Der unspezifische, aber kostengünstige Flammenionisationsdetektor gekoppelt an ein GC-System zur Analyse organischer Verbindungen mit LOD im unteren bis mittleren $\mu\text{g/g}$ -Bereich ist insbesondere in der Industrie weit verbreitet. Die GC-FID-Analyse zyklischer Methylsiloxane beispielsweise in Biogas, Petroleum oder Rohbenzin ist jedoch aufgrund der auftretenden Coelution von Siloxanen und Kohlenwasserstoffverbindungen nicht ohne weiteres möglich [270]. Um den Einsatz von massenspektrometrischen Detektionseinheiten zu umgehen, nutzten CHAINET et al. ein multidimensionales GC-System, das aus zwei Trennsäulen mit orthogonalen Trenneigenschaften besteht, die über einen Deans Switch gekoppelt sind [271]. Diese Form der zweidimensionalen GC, die als „*Heart-cutting*“ oder „*Cutting*“-Gaschromatographie (GC-GC) bezeichnet wird [272], beinhaltet das Ausschneiden und die Überführung eines oder mehrerer Teilbereiche des Chromatogramms aus der

¹⁰ Gleichzeitige Lösungsmittel-Ausblendung und Kondensierung in einer Rückhalteschleife (engl. *retention gap*) [256].

eindimensionalen Analyse einer komplexen Probe [273–275]. Um eine umfassende Analyse des von der ersten Trenndimension kommenden Effluenten ohne vorherige Bestimmung der Retentionszeiten der cVMS zu erhalten [276, 277], analysierten GHOSH et al. Biogasproben mittels der sogenannten komprehensiven zweidimensionalen GC (engl. *comprehensive two-dimensional gas chromatography*, GCxGC) [270]. Vergleichbar zu einem konventionellen eindimensionalen GC-System besteht die GCxGC, erstmals vorgestellt von LIU & PHILLIPS im Jahr 1991 [275], aus einer Injektionseinheit, einem Säulenofen¹¹ und einer Detektionseinheit (s. Abbildung 6a). Im Gegensatz zu einer GC-GC erfolgt die Überführung des Effluenten von einer meist unpolaren langen Trennsäule¹² (1D) auf eine kurze, polare Trennsäule bei der GCxGC nicht über einen *Heart-cut*, sondern über einen Modulator [277, 278, 281–283]. Der Modulator übernimmt in diesem Fall die Funktionen des Fraktionierens der von der 1D-Säule eluierenden Substanzen, des Fokussierens und der Injektion der einzelnen Fraktionen in die 2D-Säule, weshalb er häufig auch als „*the heart of the GCxGC system*“¹³ [284] bezeichnet wird. Allgemein wird zwischen thermisch und pneumatisch basierten Modulatoren unterschieden, wobei in der vorliegenden Arbeit für den Bereich der *non-target*-Analytik von SBI-Gel- und Humanproben ein *Loop*-Modulator, in Form eines Zwei-Düsen-Systems der Firma Zoex Corporation, verwendet wurde (s. Abbildung 6b).

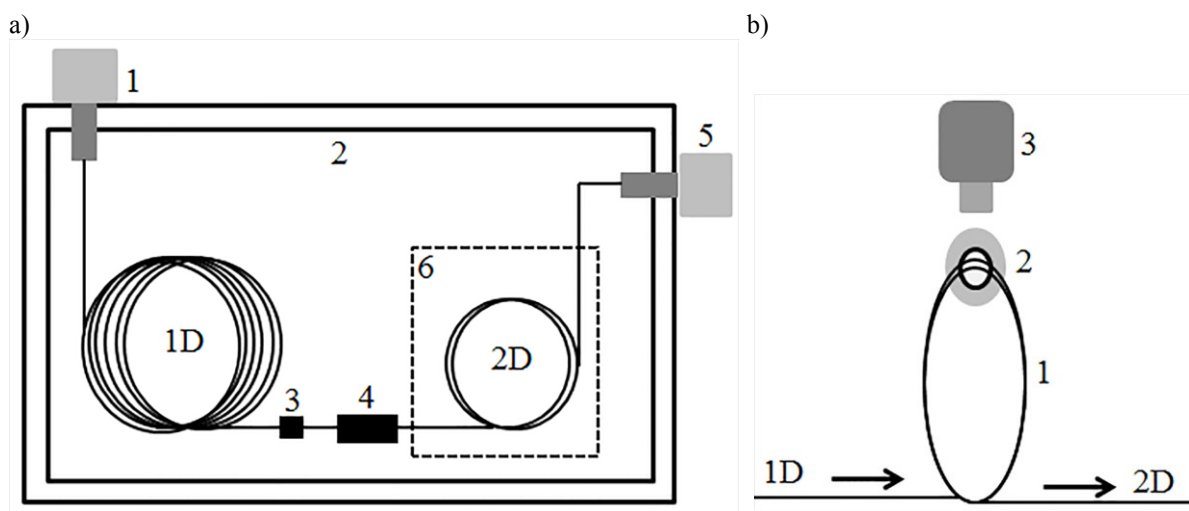


Abbildung 6: Schematische Darstellung a) eines GCxGC-Systems mit Injektor (1), Säulenofen (2), Trennsäulen (1D, 2D), Säulenverbinder (3), Modulator (4), Auslass zum MS (5), 2. Säulenofen (6: optional); modifiziert nach [278, 279]; b) eines Loop-Modulators mit in einer Schleife geföhrt Trennsäule (1), Kaltdüse (2), Heizdüse (3); modifiziert nach [280].

¹¹ Je nach Hersteller kann ein zweiter Säulenofen für die zweite Trennsäule vorliegen.

¹² 1D: 10-30 m mit einem Innendurchmesser von 250-320 μm .

¹³ Deutsch: das Herzstück des GCxGC-Systems.

Die in einem 90°-Winkel zueinander stehenden Düsen sind auf die in einer Schleife geführte Trennsäule¹⁴ fokussiert. Durch einen konstanten Stickstoffstrom (Kaltdüse, engl. *cold-jet*) werden die Analyten in der Schleife eingeschlossen und vor dem Schleifenende fokussiert. Erst durch einen kurzen Wärmepuls der Heizdüse (engl. *hot-jet*, Dauer ca. 200-375 ms [284]) erfolgt die Remobilisierung der Analyten und Injektion in die zweite Trennsäule, wobei die Schleife von der ersten Dimension zeitgleich erneut befüllt wird. Solch ein Modulationsprozess erfolgt, abhängig von der Zusammensetzung der zu analysierenden Probe und der Länge der 2D-Säule alle 1-8 s [277, 278, 284]. Bei durchschnittlichen 1D-Peakbreiten von 10-30 s und einer Modulationszeit von 3-4 s folgen etwa 3-8 Einzelpeaks mit 2D-Peakbreiten zwischen 50-250 ms, die eine schnelle Aufnahmerate des Detektors¹⁵ voraussetzen [277, 285–288]. Üblicherweise wird für eine übersichtliche Darstellung nach erfolgter GCxGC-FID- oder MS-Analyse das erhaltene Chromatogramm mit Hilfe einer Software verarbeitet und in einer zweidimensionalen Konturplot wiedergegeben. Dabei entspricht die x-Achse der Analysezeit der 1D-Säule (mit der Retentionszeit der Analyten in Minuten, t_R) und die y-Achse der Retentionszeit in der 2D-Säule (mit der Retentionszeit der Analyten in Sekunden t_R : maximal die Modulationszeit) [281, 282].

Erste Studien zur Identifizierung defekter Implantate anhand erhöhter Konzentrationen eines chemischen Markers auf Grundlage von instrumentell-analytischen Methoden wurden bereits Mitte der 1990er Jahre von GARRIDO et al. durchgeführt. *In vivo* Protonen-NMR-Messungen der Leber verwiesen bei zwei von insgesamt fünf Patienten mit defekten SBI auf erhöhte Silikon-Konzentrationen [8]. Die Blutanalyse mittels Silizium-NMR ergab hingegen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Patienten mit defekten und intakten SBI gegenüber der Kontrollgruppe [8]. Auch die Arbeitsgruppen um PETERS et al. und SEMPLE et al. analysierten Vollblut von Patienten mit und ohne SBI mittels Grafitrohr-AAS. Beide Arbeitsgruppen konnten keine Unterschiede in den Vollblut-Konzentrationen zwischen 24-103 µg Si/L bei den Kontrollpersonen und 39-79 µg Si/L bei den Implantatträgern mit relativen Standardabweichungen von bis zu 100 % aufzeigen [244, 289]. Da insbesondere die Ernährung, aber auch Umwelteinflüsse den Silizium-Gehalt im Humanblut beeinflussen können, wird Silizium als chemischer Marker für defekte SBI in der Fachliteratur eher kritisch diskutiert [290].

Hingegen konnten LUGOWSKI et al. deutliche Unterschiede des Silizium-Gehalts in Brustgewebeproben von Implantatträgern mit 13-25 mg Si/g Gewebe gegenüber denen der

¹⁴ Meist 1D-Säule, ca. 0,5-1 m [284, 367].

¹⁵ FID: 50-300 Hz; Flugzeit-MS: 100-500 Hz; Quadrupol-MS: 50 Hz.

Kontrollpersonen (235 ng Si/g Gewebe) messen [291]. PETERS et al. konnten zusätzlich intakte (0,04-89 mg Si/g), bleeding (3,2-65 mg Si/g) und defekte SBI (1,7-152 mg Si/g) anhand der Silizium-Konzentration im Brustgewebe der Patienten unterscheiden [244].

Signifikante Konzentrationsunterschiede in n-Hexan-Extrakten von Vollblut- und Blutplasmaproben von Frauen mit SBI konnten FLASSBECK et al. mittels GC-MS aufzeigen. Während die zyklischen Methylsiloxane D3-D6 im Humanblut von Kontrollpersonen bei LOD von 2 µg D3-D6/L Blutplasma nicht nachgewiesen werden konnten, wurden in den meisten Proben der Frauen mit SBI erhöhte Siloxan-Konzentrationen zwischen 2-50 ng D3-D4/g Plasma bzw. 28-92 ng D3-D4/g Vollblut detektiert. Eine Korrelation zwischen dem intraoperativen Implantat-Befund und der D3- bzw. D4-Konzentration im Blut war in dieser Studie nicht gegeben [98].

3 Problemstellung und Zielsetzung

Mit dem vermehrten Auftreten defekter SBI im Zuge des PIP-Skandals ab 2010 in Verbindung mit der geringen Sensitivität des primär eingesetzten Untersuchungsverfahrens, der Mammasonographie, gegenüber der kostenintensiven Magnetresonanztomografie werden alternative Vorsorge- und Diagnoseverfahren zunehmend eingefordert.

An diese Forderungen knüpft die vorliegende Arbeit an, denn diese verfolgt das Ziel, eine nicht-invasive Diagnostikmethode zu entwickeln, um defekte SBI anhand einer einfachen Blutanalyse der Patienten auf Basis von GC-MS basierten Methoden zu identifizieren.

Um diese Ziel zu erreichen, sollen zunächst geeignete Marker-Substanzen in Humanproben von Frauen mit intakten, bleeding und defekten SBI (Vollblut, Kapselgewebe) identifiziert werden, wobei zwei unterschiedliche *screening*-Ansätze zum Einsatz kommen werden (vgl. Kap. 5.1). Zum einen sollen chemische Additive, die im Silikongel von SBI verschiedener Hersteller vorzufinden sind, qualitativ mittels komprehensiver Gaschromatographie erfasst werden. Um eine mögliche Diffusion und Akkumulation dieser Stoffe im menschlichen Organismus aufzuzeigen, sollen die Gewebe- und Blutproben analog analysiert werden. Neben dieser *suspected-target*-Analyse soll zusätzlich eine *non-target*-Analyse der Blutproben von Frauen mit defekten und intakten SBI durchgeführt werden. Gegebenenfalls werden Marker-Substanzen, die nur in den Blutproben von Frauen mit defekten SBI vorkommen, über den Vergleich mit analytischen Standards eindeutig analysiert.

In Anlehnung an und aufbauend auf den Arbeiten von FLASSBECK et al., die zyklische Methylsiloxane eindeutig als Indikator im Brustgewebe von Implantatträgern identifizierten und erhöhte D3- und D4-Konzentrationen im Blutplasma bzw. Vollblut von Frauen mit intakten und defekten SBI detektierten, soll im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich eine sensitive GC-MS-Methode zur Quantifizierung von cVMS entwickelt und validiert werden (vgl. Kap. 5.2). Im Hinblick auf die in der Fachliteratur thematisierten Problematik der Kontamination in Verbindung mit einer Omnipräsenz und Flüchtigkeit von cVMS, gilt es, im Folgenden mittels einer stetigen Blindwertüberwachung mögliche Kontaminationen der Proben zu erfassen, die durch die Probenentnahme und -vorbereitung bzw. durch das Analysegerät selbst auftreten.

Anschließend soll die entwickelte Methode auf die Blut- und Gewebeproben der Patienten angewendet und die Ergebnisse werden mit dem intraoperativen Implantatbefund korreliert werden (vgl. Kap. 5.3 und Kap. 5.4.). Bestenfalls sollen Grenzwerte im Vollblut der Patienten definiert werden, die bei Überschreitung auf das Vorliegen eines defekten SBI hinweisen und die Indikation für einen Implantataustausch zusätzlich erhärten. Final sollen die Ergebnisse

der entwickelten analytischen Diagnostikmethode den Ergebnisse der Mammasonographie gegenübergestellt werden.

4 Experimenteller Teil

Der experimentelle Teil dieser Arbeit bezieht sich zum einen auf die *non-target*-Analytik von Silikonbrustimplantaten bzw. von Gelproben dieser Implantate, sowie der Wiederfindung in Vollblut- und Kapselgewebeproben von Implantatträgern. Zum anderen behandelt diese Arbeit erstens die quantitative Bestimmung von zyklischen Siloxanen mittels GC-MS basierten Methoden in Vollblut und im Kapselgewebe von Frauen mit SBI. Aufgrund der unterschiedlichen Siloxan-Konzentrationen in Gewebe- und Vollblut von Frauen mit SBI wurden zwei unterschiedliche GC-MS-Methoden entwickelt und validiert. Im Folgenden wird die auf einer splitlosen Injektion basierenden GC-MS-Methode als Methode 1 (M1) und die auf der *large volume injection* (LVI)-Technik basierenden GC-MS-Methode als Methode 2 (M2) bezeichnet. Alle Einstellungen, Anleitungen zur Probenvorbereitung und Angaben zur Qualitätssicherung wurden, wie in den nachfolgenden Abschnitten angegeben, ausgeführt.

4.1 Probenaufstellung

Die Analyse von Vollblut- und Gewebeproben von Frauen mit SBI erfolgte im Rahmen einer zwischen August 2013 und Juni 2015 durchgeführten Studie, an der insgesamt 40 Frauen teilgenommen haben. Zudem stand zur Entwicklung einer geeigneten Methode zur Probenvorbereitung, sowie als Kontrolle Vollblut einer Frau ohne SBI zur Verfügung. Für die Analyse chemischer Additive von SBI wurden explantierte und Demo-Implantate verwendet.

4.1.1 Vollblut- und Kapselgewebeproben von Implantatträgern

Gemäß des Antrags¹⁶ bei der zuständigen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen (Standort Essen) wurden in die Studie solche Patientinnen¹⁷ eingeschlossen, für die ein Implantatwechsel aus vorliegenden medizinischen Gründen (z. B. lange Liegezeit, Verdacht auf Implantatdefekt, Kapselfibrose Baker Grad III-IV, Dislokation, Empfehlung zur Implantatentfernung nach BfArM) indiziert war. Auf medizinischer Seite erfolgte die Koordination des Projektes durch Dr. Peter Rusch (Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen). Alle Handlungen wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Standards des Weltärztebundes (institutionell

¹⁶ Der Ethik-Antrag mit dem Titel „Etablierung eines Algorithmus zur Bewertung der Qualität und Funktion von Silikonimplantaten der Brust (im Zusammenhang mit dem PIP/Rofil-Skandal)“ wurde nach Ergänzung mit dem Datum 06.05.2013 unter dem AZ 13-5384-BO genehmigt.

¹⁷ Siehe Fußnote 1: Auch wenn in der vorliegenden Studie ausschließlich weibliche Patienten teilgenommen haben, wird nachfolgend das generische Maskulinum verwendet.

und national) und der Deklaration von 1975 (überarbeitet im Jahr 2000) durchgeführt. Die Zustimmung der Patienten war in allen Fällen vorhanden.

Die Blutproben der Patienten wurden in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen jeweils von dem behandelten Arzt einen Tag bzw. unmittelbar vor oder während der Operation entnommen, bei der die Explantation des Implantates erfolgte und gleichzeitig der tatsächliche Zustand des Implantates verifiziert wurde. Die Blutentnahme erfolgte unter Zuhilfenahme von Citrat-Monovetten der Firma Sarstedt. Bei vollständiger Füllung der Monovette bis zur Markierung wurde eine Verdünnung des Blutes mit 0,106 molare Citrat-Lösung in einem Verhältnis 1:10 eingehalten, so dass eine mehrmonatige Lagerung der Proben ohne Blutgerinnung möglich war. Die etwa 1-Cent-Stück-großen Kapselgewebeproben wurden während der Operation von dem behandelten Arzt dorsal in der Nähe des Einschnittes entfernt und nativ in sterilen Kunststoffröhrchen gelagert. Die Blut- und Gewebeproben wurden getrennt voneinander in mit *crushed-ice* gefüllten Styroporboxen bis zur Abholung und während des Transportes gekühlt. Im Labor wurden die Blutproben zur Analyse vorbereitet (vgl. hierzu Kap. 4.4.2) bzw. in den Citrat-Monovetten bis zur Analyse bei 5 °C im Kühlschrank (Firma Liebherr-International) gelagert. Die Implantatträger waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 28 und 85 Jahre alt und hatten Implantate unterschiedlicher Hersteller (Allergan, Impax, Mentor, Nagotex Polytech, Rofil, Silastic, unbekannt), unterschiedlichen Gewichts (zwischen 110 und 500 g) und unterschiedlicher Liegezeiten (1-38 Jahre). Die Einordnung der Blutproben in die entsprechende Kategorie „intakt“ und „defekt“ erfolgte anhand des intraoperativen Befundes der Silikonhülle. Bei Vorlage eines intakten und eines defekten Explantates erfolgte die Zuordnung der Blutprobe in die Kategorie „defekt“. Für die Gewebeproben wurde der intraoperative Befund „intakt“ bei der Vorlage von *bleeding*-Flüssigkeit in der Implantattasche um den Vermerk „bleeding“ erweitert. Die Eckdaten der vierzig Patienten sind Tabelle 3 und Tabelle 4 zu entnehmen.

Analog zur Blutentnahme der Implantatträger erfolgte die Blutentnahme bei der Kontrollperson und zwar ebenfalls im Universitätsklinikum Essen unter Zuhilfenahme von Citrat-Monovetten. Da die Blutproben der Kontrollperson nicht nur für die Optimierung der Probenvorbereitung dienen, sondern auch zur Kontrolle (*field blank*) genutzt wurden, wurden diese wie die Blutproben der Implantatträger transportiert und gelagert (bis zu acht Monate bei 5 °C).

Tabelle 3: Charakteristika der Implantatträger (Teil 1), deren Vollblut und Kapselgewebe auf ihren Siloxan-Gehalt hin untersucht wurden.

Pat. Nr.	Implantate		SONO-Ergebnisse		operativer Befund		Blutproben ^a	
	Liegezeit [Jahre]	Hersteller	li	re	li	re	Lagerdauer [Monate]	Kategorie
1	9	Rofil	intakt	intakt	intakt	bleeding		intakt
2	4	Rofil	defekt	intakt	bleeding	intakt		intakt
3	5	Rofil	intakt	intakt	intakt	bleeding		intakt
4	10	Rofil	intakt	intakt	bleeding	bleeding		intakt
5	8	Rofil	intakt	intakt	intakt	intakt		intakt
6	6	Rofil	intakt	intakt	bleeding	bleeding		intakt
7	7	unbekannt	intakt	intakt	intakt	intakt		intakt
8	11	Rofil	intakt	intakt	bleeding	bleeding	15	intakt
9	3	unbekannt	intakt	intakt	bleeding	intakt		intakt
10	24	unbekannt	intakt	intakt	bleeding	defekt	14	defekt
11	8	Rofil	intakt	intakt	intakt	defekt	14	defekt
12	17	unbekannt	intakt	intakt	bleeding	bleeding		intakt
13	25	unbekannt	k. A.	intakt	n. o.	defekt	14	defekt
14	15	unbekannt	intakt	intakt	intakt	bleeding		intakt
15	16	unbekannt	intakt	intakt	intakt	intakt	12	intakt
16	12	Rofil	intakt	intakt	bleeding	bleeding	12	intakt
17	24	Silastic	defekt	k. A.	bleeding	n. o.	11	intakt
18	10	Rofil	intakt	intakt	bleeding	bleeding	11	intakt
19	1	Polytech	intakt	k. A.	defekt	n. o.	8	defekt
20	14	Rofil	intakt	intakt	bleeding	defekt	7	defekt
21	4	Allergan	intakt	k. A.	intakt	n. o.	6	intakt
22	10	Rofil	intakt	intakt	intakt	intakt	6	intakt
23	uk	Polytech	intakt	intakt	defekt	defekt	6	defekt
24	17	unbekannt	intakt	intakt	intakt	intakt	6	intakt
25	38	unbekannt	intakt	intakt	defekt	defekt	6	defekt
26	14	Rofil	intakt	intakt	defekt	bleeding	4	defekt
27	15	Rofil	intakt	intakt	bleeding	bleeding	4	intakt
28	2	Mentor	intakt	intakt	intakt	intakt	4	intakt
29	18	Unbekannt ^b	intakt	intakt	defekt	intakt	3	defekt
30 ^c	7 bzw. 11	Rofil	intakt	intakt	bleeding	defekt	2	defekt
31	28	unbekannt	defekt	defekt	defekt	defekt	1	defekt
32	3	Allergan	intakt	intakt	intakt	intakt	1	intakt
33	4	Allergan	k. A.	intakt	n. o.	intakt	1	intakt
34	8	Allergan	intakt	k. A.	intakt	n. o.	0	intakt

^aDie Blutproben einiger Patienten wurden mittels LVI-GC-MS analysiert. Diese wurden bis zur Analyse bei 5 °C für mehrere Monate gelagert.

^bExpander-Implantat

^cImplantateinlage von Pat. Nr 30: rechte Seite im Jahr 2004 und linke Seite im Jahr 2008

re: rechte Brustseite; li: linke Brustseite

k. A.: keine Angabe; n. o.: nicht operiert

Da die Patienten Nr. 36 bis 40 Hydrogel-, Bilumen-Implantate oder einen Mix hieraus implantiert hatten, wurden lediglich die Kapselgewebeprouben auf ihren Siloxan-Gehalt hin untersucht (zur Analyse der Kapselgewebeprouben vgl. Kap. 4.4.2).

Tabelle 4: Charakteristika der Implantatträger (Teil 2) , deren Kapselgewebe auf ihren Siloxan-Gehalt hin untersucht wurden.

Pat. Nr.	Implantate		SONO- Ergebnisse		intraoperativer SBI-Befund	
	Liegezeit [Jahre]	Hersteller	li	re	li	re
35	32	unbekannt	defekt	defekt	defekt	defekt
36	13	Rofil (B-H)	k. A.	defekt	n. o.	defekt
37	15	Nagotex (H)	intakt	defekt	intakt	defekt
38	18	Nagotex (B)	defekt	intakt	intakt	intakt
39	20	Impax (B)	defekt	k. A.	intakt	n. o.
40	4	unbekannt (H)	intakt	intakt	intakt	intakt

B-H: Bilumen-Hydrogel-Implantat; H: Hydrogel-Implantat; B: Bilumen-Implantat

4.1.2 Silikonimplantate und –explantate

Für die *non-target*-Analyse der Silikonbrustimplantate bzw. des Silikongels standen zehn Explantate, sowie drei neue Implantate verschiedener Hersteller zur Verfügung. Die nachstehend zu den Herstellern angegebenen Gewichtsangaben beziehen sich auf die im Labor vorgenommene Einwaage der einzelnen Im- bzw. Explantate. Die Lagerung dieser Implantate erfolgte in mit Wasser, anschließend dreimalig mit Dichlormethan (drei Gläser für Implantate) bzw. n-Hexan (zehn Gläser für Explantate) gereinigten Einmachglasern (mit Glasdeckel, Gummidichtung und Metallklemmen) bei 33 °C in einem Inkubator der Firma Memmert.

- Implantate (jeweils ein Exemplar pro Hersteller):
 McGhan (310 g), ehemals Inamed Asthetics (Allergan Germany), Frankfurt am Main, D
 Perthese (260 g), Groupe Perouse Plastique (Mentor Germany), Hallbergmoos, D
 Siltex (325 g), Mentor Germany, Hallbergmoos, D
- Explantate:
 Mentor (n = 1: 465 g), Hallbergmoos, D
 McGhan (n = 2: 370 g; n = 1: 445 g), ehemals Inamed Asthetics (Allergan Germany),
 Frankfurt am Main, D
 PIP (n = 1: 170 g), Poly Implant Prothèse, La Seyne-sur-Mer, FR
 Rofil (n = 5: 165, 270, 285, 290 und 330 g), Rofil Medical Nederland, Teteringen, NL

4.2 Wahl des organischen Lösungsmittels und Herstellung von Standardlösungen

Da zyklische Siloxane in der Umwelt omnipräsent sind und u. a. durch Aufreinigungsprozesse in organische Lösungsmittel gelangen, wurden zu Beginn der experimentellen Arbeit verschiedene, bereits in der Literatur diskutierte Lösungsmittel (n-Hexan, n-Pentan, Dichlormethan, vgl. Kap. 2.3) unterschiedlicher Hersteller (Merck, Acros Organics, Fluka) und Reinheitsgrade (HPLC-grade, SupraSolv, LC-MS-grade, *for analysis*) getestet. Hierzu wurden die Lösungsmittel mehrfach mittels GC-MS bei splitloser Injektion (Agilent Technologies; M1 Einstellungen vgl. Kap. 4.7.1.1) analysiert und anhand der erhaltenen, absoluten Signalintensitäten der zyklischen Siloxane D3-D6 auf mögliche Verunreinigungen untersucht. Aufgrund der relativ geringen Siloxan-Signalintensitäten in Dichlormethan gegenüber n-Hexan (s. Abbildung 7a) und vergleichbaren Signalintensitäten bei der Injektion eines Mikroliters Laborluft (s. Abbildung 7b), wurde im weiteren Verlauf Dichlormethan als organisches Lösungsmittel eingesetzt.

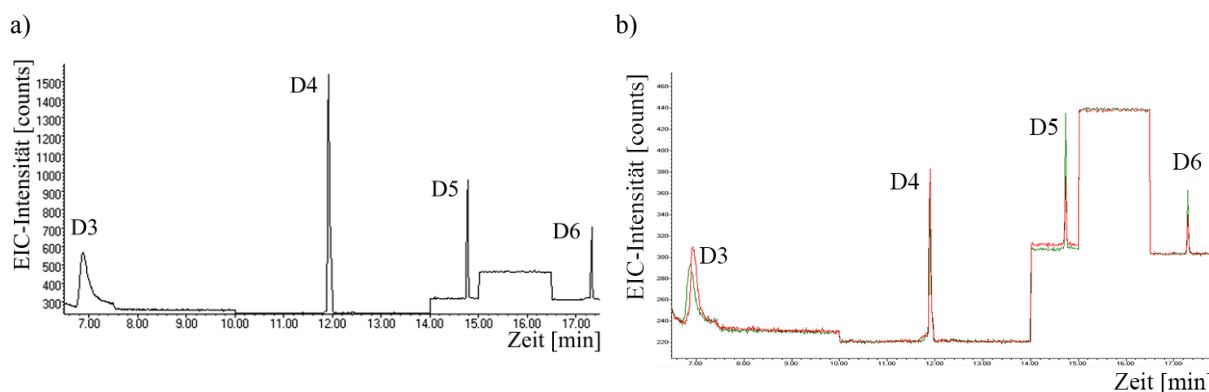


Abbildung 7: *Extracted ion*-Chromatogramme (EIC) zweier unterschiedlicher Lösungsmittel nach erfolgter GC-MS-Analyse (M1) a) n-Hexan (SupraSolv *for* GC-FID, Merck, Darmstadt, D), b) Dichlormethan (HPLC-grade, Acros Organics, Geel, BEL; rot) und Raumluft (Injektionsvolumen 1 µL; grün) übereinander gelegt.

Grundsätzlich erfolgte die Herstellung der verwendeten Standard-Lösungen unter Zuhilfenahme einer Analysenwaage der Firma Sartorius, sowie verschiedener Pipetten der Firma Brand und einem Metallspatel im Abzug.

- Siloxan-Stammlösungen und Siloxan-Standardlösungen:

Zum Ansetzen der Stammlösungen der einzelnen zyklischen Siloxane D3-D6 und des internen Standards (Tetrakis(trimethylsiloxy)silan, kurz M4Q; Notation nach General Electric [58]) wurden jeweils 50 mg der Reinstsubstanz in einem Glaskolben eingewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von n-Hexan (Merck, Darmstadt), sodass eine End-

konzentration von 1 g/L erhalten wurde. Diese Stammlösungen wurden, solange sie nicht gebraucht wurden, bei -20 °C in einer Gefriertruhe der Firma Alaska bis zu sechs Monate gelagert. Siloxan-Standardlösungen zur Kalibration des GC-Massenspektrometers und für die Leistungsüberprüfung vor jeder quantitativen Analyse wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Dichlormethan (Acros Organics, Geel) im Konzentrationsbereich 1-1000 µg/L (M1) bzw. 0,05-4,0 µg/L (M2) und einer Konzentration des internen Standards (M4Q) von 54 µg/L (M1) und 667 ng/L (M2) direkt vor dem Gebrauch hergestellt. Zwischen den Messungen wurden die Siloxan- und die M4Q-Standardlösung im Kühlschrank der Firma Elektrolux bei 5 °C gelagert. Für die Aufstock-Experimente im Blut bzw. in der Vergleichsmatrix des Kapselgewebes erfolgte der letzte Verdünnungsschritt der M4Q- bzw. D3-D6-Stammlösung in Methanol (VWR International, Darmstadt).

- Standardlösungen für die GCxGC-MS-Analyse:

Die Herstellung einer 2 g/L-Dodecamethylpentasiloxan (L5)-Stammlösung erfolgte durch Einwaage von 0,02 g Reinstsubstanz in einem 10 mL-Messkolben und durch Zugabe von 10 mL Dichlormethan. Vor der GCxGC-MS-Analyse wurde die L5-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 200 µg L5/L mit Dichlormethan verdünnt. Für die Herstellung der Standard-Mixlösung wurden für Lösung A jeweils 0,02 g der einzelnen n-Alkylbenzole (n = 4-10) und des 2(Methylthio)-benzothiazols in einem 10 mL-Messkolben eingewogen und anschließend in Dichlormethan gelöst, sodass eine Konzentration von 2 g Substanz/L Dichlormethan erreicht wurde. Das Ansetzen der Coffein-Stammlösung erfolgte in Methanol (Lösung B: 2 g Coffein/L). Beide Lösungen wurden zusammen mit Dichlormethan auf eine Endkonzentration von 500 µg Substanz/L verdünnt.

- Silandiol-Stammlösung

Für die Silandiol-Stammlösung bestehend aus den drei Silandiolen, Dimethylsilandiol, Tetramethyldisiloxan-1,3-diol und Hexamethyltrisiloxan-1,3-diol, wurden, modifiziert nach VARAPRATH et al. [177], 20 µL Dimethoxydimethylsilan in 1 mL (Mix B) bzw. in 10 mL (Mix B) Reinstwasser gelöst und das Reaktionsgemisch jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Zuhilfenahme eines Vortexers geschüttelt.

- Alkan-Standardlösung

Die Herstellung einer n-Alkan-Stammlösung erfolgte durch Einwaage der Reinstsubstanzen (ca. 0,02 g) und anschließender Verdünnung mit Dichlormethan in einem 10 mL-Messkolben. Vor der GC-MS-Analyse (M1) wurde die Stammlösung auf eine Endkonzentration von 1 mg n-Alkan/L Dichlormethan verdünnt.

4.3 Probenentnahme und Extraktion von Silikongel aus Im- und Explantaten

Für die Analyse des Silikongels dreier Implantate und zehn Explantate der Hersteller Mentor McGhan (Allergan), Perthese, PIP, Rofil und Siltex auf ihre chemischen Additive wurde zunächst die SBI-Hülle (ca. 5 x 5 cm) mit Hilfe eines Keramikskalpells und einer Plastik-Pinzette an einer Stelle des Implantats entfernt. Anschließend wurde aus einer Tiefe von etwa einem Zentimeter eine Gel-Probe entnommen und in einem Schraubdeckelglas eingewogen ($0.075 \text{ g} \pm 0.005 \text{ g}$). Nach Zugabe von 2 mL Dichlormethan wurde das Schraubdeckelglas mit einer Teflon-Kappe verschlossen und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Die unverdünnten Dichlormethan-Gelextrakte der Hersteller Mentor, McGhan, Perthese und Siltex und die mit Dichlormethan in einem Verhältnis 1:4 verdünnten Gelextrakte der Hersteller PIP und Rofil wurden in GC-Vials überführt und bis zur Analyse mittels komprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie der Firma Shimadzu (GCxGC-MS-Einstellungen vgl. Kap. 4.7.1.4) bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Tiefkühlschrank der Firma Heraeus gelagert. Um eine Absicherung der Ergebnisse zu erhalten, wurden je Im- bzw. Explantat zwei Gelproben an unterschiedlichen Stellen entnommen und diese jeweils zweifach mittels GCxGC-MS analysiert. Um mögliche Kontaminationen im Lösungsmittel oder durch Verbrauchsmaterialien etc. zu erfassen, wurde für jedes Im- bzw. Explantat zusätzlich ein *instrumental* und ein *procedural blank* gemessen.

4.4 Probenvorbereitung der Blut- und Kapselgewebeproben

Unter Zuhilfenahme einer Analysenwaage (Firma Sartorius), einer Metallpinzette, verschiedener Pipetten (Firma Brandt) und Pipettenspitzen (Firma VWR International) erfolgte die Probenvorbereitung des Vollblutes und des Kapselgewebes in einem zuvor gereinigten Abzug.

4.4.1 Optimierung der Lager- und Extraktionsbedingungen

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit (insbesondere der kleineren Siloxan-Homologen) und der unterschiedlichen Festigkeit der Gewebeproben verschiedener Patienten (weich bis kristallin verhärtet) wurden die Aufbereitungsschritte in Bezug auf die Siloxan-Wiederfindungsraten mit aufgestockten Blutproben bzw. Gewebeproben optimiert. Bereits im Vorfeld durchgeführte Messreihen zur Wiederholbarkeit ($n = 5$) von Siloxan-Standardlösungen mittels GC-MS-Analyse (M1) zeigten einen positiven Effekt der Lagertemperatur von $5 \text{ }^\circ\text{C}$ gegen-

über 22 °C. Bei durchgängiger Kühlung einer 20 µg D3-D6/L-Standardlösung in Dichlormethan konnte eine Minimierung der relativen Standardabweichung der Siloxan-Signalintensitäten von 10-25 % auf 3-10 % bei einer Standardabweichung des internen Standards M4Q kleiner 5 % erzielt werden. Aufgrund dessen wurde auch bei der Probenvorbereitung auf eine nahezu durchgängige Kühlung geachtet.

4.4.1.1 Aufstockexperimente mit Kontrollblut

Die Optimierung der Probenvorbereitung zur Analyse von Vollblut erfolgte durch Variation der Lagertemperatur und des Volumenverhältnisses zwischen Vollblut und dem Extraktionsmittel Dichlormethan. Im Hinblick auf die erforderliche Lagerdauer zwischen der Blutentnahme und Analyse im Labor wurde anhand von aufgestockten Blutproben eine geeignete Variante hinsichtlich der Lagerungsbedingungen entwickelt. Hierzu wurden in sterilen 15 mL-Kunststoffgefäßen der Firma Greiner Bio-One jeweils 0,761 mL Vollblut eingewogen (entspricht 0,7-0,8 g) und mit einer 10 mg/L methanolischen D3-D6-Siloxan-Standardlösung bzw. mit einer äquivalenten Menge Methanol für die Blindproben versetzt. In ersten Untersuchungen zur internen cVMS-Exposition von Frauen mit SBI, durchgeführt von FLASSBECK et al., wurden die beiden Homologen D3 und D4 im Blut in einem Konzentrationsbereich zwischen 2-92 ng D3-D4/mL quantifiziert [98]. Die aufgestockten Siloxan-Konzentrationen von 53 bzw. 83 ng D3-D6/g Blut lagen somit in Bezug auf die oben genannte Studie im mittleren Konzentrationsbereich. Da die Quantifizierung der aufgestockten zyklischen Siloxane im Kontrollblut mittels internen Standard und externer Kalibrierung erfolgte, wurden zusätzlich 40 µL (bei 0,9 w/w, s. unten) bzw. 80 µL (bei 0,4 w/w s. unten) einer 1 mg/L M4Q-Standardlösung hinzugegeben (Endkonzentration 54 µg M4Q/L). Anschließend wurden die Gefäße verschlossen, geschüttelt und für eine Stunde bei Temperaturen zwischen 5 °C (Variante A, D, s. unten) bzw. zwischen 1-5 °C (Variante B, C, s. unten) gelagert. Im Vergleich zu Variante A, wo die Proben im Probenständer bei 5 °C gekühlt wurden, wurden die Proben bei Variante B in einer Styroporbox zusammen mit drei Kühl-packs bzw. mit *crushed ice* (C) im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden jeweils 0,750 mL Dichlormethan zugegeben und eingewogen. Die beiden Phasen wurden mittels Vortexer durchmischt und für ca. 14 h bzw. 62 h bei unterschiedlichen Temperaturen im Kühlschrank (Variante A-C) bzw. im Gefrierschrank (Variante D) gelagert (s. Tabelle 5). Analog zu FLASSBECK et al. [98], die ein äquivalentes Volumenverhältnis von Extraktionsmittel zu Vollblut bzw. die zweifache Menge an Extraktionsmittel einsetzten, wurde bei einem Teil der Proben erneut 0,750 mL Dichlor-

methan hinzugegeben und gewogen (1; Verhältnis Blut-Dichlormethan 0,4 w/w). Mit dem zweiten Teil der Proben wurde direkt weiter verfahren (2; Mischungsverhältnis von 0,9 w/w). Alle aufgestockten Blut- und Blindproben wurden mit einem Vortexer auf höchster Stufe jeweils zweimal zwei Minuten extrahiert und zwischen den Extraktionsschritten gekühlt. Um eine Phasentrennung der Vollblut-Dichlormethan-Suspension zu erzielen, wurden die Proben bei 14 °C und 4000 Umdrehungen pro Minute fünf Minuten mit einer Allegra 25R-Zentrifuge der Firma Beckman Coulter zentrifugiert. Zuletzt wurde jeweils die untere Dichlormethan-Phase in ein GC-Vial mit Mikroinlet überführt und mit einer Teflon-Schraubkappe verschlossen. Die GC-Vials wurden bis zur GC-MS-Analyse (M1 vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen) in einer mit *crushed ice* gefüllten Styroporbox im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 5: Aufstockexperimente mit Kontrollblut bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen und Mischungsverhältnissen Vollblut-Extraktionsmittel.

Variante	Lagerungsbedingungen	Lagerdauer [h]	w/w- Verhältnis	Endkonzentration [D3-D6 ng/g Blut]
A1-14h	Kühlschrank (5 °C)	14	0,4	83
A2-14h		14	0,9	53
B1-14h	Styroporbox/ Kühlakku; Kühlschrank (< 5 °C)	14	0,4	83
C2-14h	Styroporbox/ <i>crushed ice</i> ; Kühlschrank (< 5 °C)	14	0,9	53
D1-14h	Gefrierschrank (- 20 °C)	14	0,4	83
D2-14h		14	0,9	53
A1-62h	Kühlschrank (5 °C)	62	0,4	83
C2-62h	Styroporbox/ <i>crushed ice</i> ; Kühlschrank (< 5 °C)	62	0,9	53
1: Gesamtvolumen Dichlormethan 1,50 mL		Lagerung über Nacht: ca. 14 h		
2: Gesamtvolumen Dichlormethan 0,75 mL		Lagerung übers Wochenende: ca. 62 h		

Um die Wiederholpräzision der durchgeführten Aufstockexperimente in Abhängigkeit von den Lagerungs- und Extraktionsbedingungen zu bestimmen, wurden für jede Variante A-D jeweils drei Ansätze entsprechend der Angaben durchgeführt. Die Quantifizierung der Siloxane in den Dichlormethan-Extrakten erfolgte über eine externe Kalibrierung zwischen 10-150 µg D3-D6/L (10, 20, 40, 80 und 150 µg/L bei 54 µg M4Q/L). Die Erfassung einer möglichen cVMS-Hintergrundkonzentration im Kontrollblut erfolgte unter Durchführung von je drei Ansätzen pro Lagervariante (A-D) ohne Vollblut nur mit Extraktionsmittel, methanolischen D3-D6-Siloxan-Standard bzw. Methanol (*procedural blank*) und internem Standard. Für die Validierung der entwickelten LVI-GC-MS-Methode (Methode M2) zur Analyse zyklischer Siloxane in Vollblut wurde unter anderem die Wiederfindungsrate für

zwei unterschiedliche Konzentrationen (a) 2,0 ng D3-D6/g und (b) 0,3 ng D3-D6/ g Vollblut bestimmt. Hierzu wurden, wie oben beschrieben, in sterilen 15 mL-Kunststoffgefäßen jeweils 0,92 mL Vollblut eingewogen (entspricht 0,8-0,9 g) und die methanolischen D3-D6-Siloxan-Standardlösung mit einer Konzentration von 50 µg/L bzw. eine äquivalente Menge Methanol für die Blindproben, sowie eine 100 µg/L M4Q-Standardlösung hinzugegeben (Endkonzentration 667 ng M4Q/L). Anschließend wurden die Gefäße verschlossen, geschüttelt und für eine Stunde in einer mit *crushed ice* gefüllten Styroporbox im Kühlschrank gelagert. Nach Zugabe und Einwaage des Extraktionsmittels (0,75 mL Dichlormethan) wurden alle Proben extrahiert (s. oben) und zusätzlich zwischen den Extraktionsschritten mittels *crushed ice* gekühlt. Nach Zentrifugation (s. oben) wurde jeweils die untere Dichlormethan-Phase in ein GC-Vial mit Mikroinlet überführt, mit einer Teflon-Schraubkappe verschlossen und bis zur LVI-GC-MS-Analyse (M2 vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen) in einem kühlbaren Tray-Halter bei 8 °C gelagert. Die Quantifizierung der Siloxane in den Dichlormethan-Extrakten erfolgte über eine externe Kalibrierung zwischen 0,2-3,5 µg D3-D6/L (0,2, 0,4, 0,7, 1,5 und 3,5 µg/L bei 667 ng M4Q/L). Über einen dreifachen Ansatz je aufgestockter Siloxan-Konzentration wurde die Wiederholpräzision bei einer einfachen LVI-GC-MS-Analyse des Dichlormethan-Extraktes bestimmt.

4.4.1.2 Aufstockexperimente mit einer Gewebe-Vergleichsmatrix

Aufgrund fehlender Kontrollproben und der physiologischen Ähnlichkeit zum Menschen [292] (u. a. auch der Haut [293]) wurde für die Entwicklung einer geeigneten Probenvorbereitung zur Analyse von Kapselgewebeproben von Frauen mit SBI als Vergleichsmatrix Schweine-Stielkotelett der Firma Wilhelm Brandenburg (Rewe Markt) verwendet. Die Optimierung der Probenvorbereitung erfolgte anhand der Wiederfindungsrate der Analyten in der aufgestockten Vergleichsmatrix. Hierbei wurde die einfache fest-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan einer vorangehenden Homogenisierung des Gewebes (Zellaufschluss) und anschließender Extraktion gegenübergestellt. Für den Aufschluss kleinerer Probenmengen (Probeneinwaage weniger als 0,5 g), sowie im Hinblick auf eine mögliche Kontaminationsgefahr durch die Raumluft bei offenen Aufschlussgefäßen, erfolgte das Homogenisieren der Proben unter Zuhilfenahme der SpeedMill Plus und entsprechenden Aufschlussgefäßen mit Keramikperlen (sogenannte Lysis Tubes), beides von der Firma Analytik Jena. In Vorversuchen wurden die Intervalle des Aufschlussprogrammes bezüglich Homogenität der bearbeiteten Gewebemasse optimiert. Da keine aktive Kühlung der Proben während des Aufschlusses möglich war und eine Überhitzung der Proben aufgrund von Reibung erfolgen

könnte, wurden zwischen den Zyklen auf Kühlphasen geachtet. Die finalen Einstellungen des Aufschlussprogrammes sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Aufschlussprogramm der SpeedMill zum Homogenisieren der Gewebeproben.

Intervall	Dauer [min]	Zyklen	Pausen zwischen den Zyklen
1	0,4	4	0,4 min
2	0,2	1	0,4 min
3	0,1	1	0,4 min
Gesamtdauer: 6,5 min			

Nach Einwaage von jeweils 0,1-0,2 g Gewebe-Vergleichsmatrix in sterilen 15 mL-Kunststoffgefäßen erfolgte die Zugabe von einer 10 mg/L methanolischen D3-D6-Siloxan-Standardlösung bzw. die Zugabe einer äquivalenten Menge Methanol für die Blindproben, sodass eine Siloxan-Endkonzentration von ca. 250 ng/g simuliert wurde. Die Orientierung der aufzustockenden Siloxan-Konzentration richtete sich an erste Untersuchungen, durchgeführt von FLASSBECK et al., zu Siloxan-Konzentrationen in der Bindegewebskapsel sowie in anderen Burstgewebeproben von Implantatträgern. In dieser Studie wurden D3-D6-Konzentrationen zwischen 9 und 1334 ng/g Gewebe, nach Homogenisierung unter Zuhilfenahme eines Dispergiergerätes (Ultra Turrax) und Extraktion mit n-Hexan quantifiziert [7].

Nach Zugabe von 80 µL einer 1 mg/L M4Q-Standardlösung wurden die Gefäße verschlossen und für drei Stunden bei Temperaturen zwischen 1-5 °C gelagert. Anschließend wurden jeweils 0,75 mL Dichlormethan zugegeben, eingewogen und die Gefäße nach dem Verschließen kurz geschüttelt. Um eine mögliche Verzögerung zwischen Erhalt der Kapselgewebeproben und Analyse zu simulieren, wurden diese anschließend für 14 Stunden bei -20 C° in einem Gefrierschrank gelagert. Vor der Analyse wurde zu einem Teil der Probe erneut 0,75 mL Dichlormethan hinzugegeben und diese anschließend extrahiert (s. unten). Da das Homogenisieren mittels SpeedMill nicht mit organischem Lösungsmittel durchgeführt werden konnte, wurden die Gewebeproben in Lysis Tubes überführt, eingewogen und (A) direkt bzw. (B) nach Zugabe und Einwaage von 0,20 mL destilliertem Wasser im Intervall-Modus homogenisiert (Aufschlussprogramm, s. Tabelle 6). Nach Zugabe und Einwaage des während des Aufschlusses in *crushed ice* gelagerten Dichlormethans und weiteren 0,75 mL Dichlormethan zu der aufgeschlossenen Gewebemasse in die Lysis Tubes erfolgte die Extraktion. Hierfür wurden alle aufgestockten und aufgeschlossenen Gewebeproben, sowie Kontrollproben mit einem Vortexer auf höchster Stufe jeweils zweimal zwei Minuten extrahiert und zwischen den Extraktionsschritten gekühlt. Um eine Phasentrennung der Gewebemasse-Dichlormethan-Mischung zu erzielen, wurden die Proben bei Raumtemperatur

und 14.500 Umdrehungen pro Minute 5 min mit einer Laborzentrifuge der Firma Eppendorf (Variante Homogenisieren) zentrifugiert. Die Proben der Extraktionsvariante wurden 5 min bei 14 °C und 4000 Umdrehungen pro Minute mit einer Zentrifuge der Firma Beckman Coulter zentrifugiert. Zuletzt wurden jeweils 150 µL der unteren Dichlormethan-Phase in ein GC-Vial mit Mikroinlet überführt, mit 150 µL einer 54 µg M4Q/L-Standardlösung verdünnt und mit einer Teflon-Schraubkappe verschlossen. Die GC-Vials wurden bis zur GC-MS-Analyse (M1 vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen) in einer mit *crushed ice* gefüllten Styroporbox im Kühlschrank gelagert. Um die Wiederholpräzision der durchgeführten Aufstockexperimente in Abhängigkeit von den Aufschlussbedingungen zu bestimmen, wurden für jede Variante jeweils drei Ansätze entsprechend der Angaben durchgeführt. Die Quantifizierung der Siloxane in den Dichlormethan-Extrakten erfolgte über eine externe Kalibrierung zwischen 10-150 µg D3-D6/L (10, 20, 40, 80 und 150 µg/L bei 54 µg M4Q/L). Die Erfassung einer möglichen cVMS-Hintergrundkonzentration in der Gewebe-Vergleichsmatrix erfolgte unter Durchführung von je drei Ansätzen pro Aufschlussvariante (Extraktion, Homogenisieren A und B) ohne Gewebematrix nur mit Extraktionsmittel, methanolischem D3-D6-Siloxan-Standard bzw. Methanol (*procedural blank*) und internem Standard.

4.4.2 Probenvorbereitung zur quantitativen und qualitativen GC-Analyse von Vollblut und Kapselgewebeproben von Implantatträgern

Nach Erhalt der Blut- und Kapselgewebeproben wurden diese im Labor getrennt voneinander für die Analyse vorbereitet.

Für die Quantifizierung zyklischer Siloxane im Vollblut von Frauen mit SBI mittels GC-MS (M1) sowie LVI-GC-MS (M2) wurden die Vollblutproben direkt nach Erhalt (Pat. Nr. 1-18 bzw. 19-23) bzw. nach Lagerung in den Citrat-Monovetten bei 5 °C über mehrere Monate hinweg (0-15 Monate vgl. Tabelle 3; 8. Spalte; Pat. Nr. 8, 10, 11, 13, 15-34) im Labor entsprechend der optimierten Probenvorbereitung (vgl. Kap. 4.4.1.1) vorbereitet. Hierzu wurden jeweils dreimal 0,761 mL (M1) bzw. 0,920 mL (M2) des Vollblutes (aus derselben Citrat-Monovette) eingewogen, mit 0,75 mL internen Standard in Dichlormethan (M1: 54 µg M4Q/L; M2: 667 ng M4Q/L) versetzt und erneut eingewogen. Anschließend wurden die Blutproben extrahiert, zentrifugiert und nach Überführung in GC-Vials mit Mikroinlets und Teflon-Schraubkappen mittels GC-MS (M1, vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen) bzw. LVI-GC-MS (M2, vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen bzw. abweichende Parameter s. Tabelle 7) analysiert. Die Vollblutproben der Kontrollperson wurden, wie oben beschrieben,

direkt nach der Blutentnahme, sowie nach einer 8-monatigen Lagerung bei 5 °C extrahiert, zentrifugiert und analysiert (M1 und M2, vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen). Auch in diesem Fall wurde ein dreifacher Ansatz je Analyse durchgeführt. Die Quantifizierung der Siloxane in den Dichlormethan-Extrakten erfolgte über eine externe Fünf-Punkt-Kalibrierung zwischen 10-150 µg D3-D6/L (M1, s. oben) und 0,2-3,0 µg D3-D6/L (M2, s. oben). Nach erfolgter Quantifizierung wurden die Dichlormethan-Extrakte der Vollblutproben von Frauen mit intakten (n = 11 bzw. 13) und defekten SBI (n = 9 bzw. 11), sowie zweier Hydrogel-Implantate (Pat. Nr. 36, 40) bis zur *suspected-target* und *non-target*-Analyse via komprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie bei -80 °C in einem Tiefkühlschrank der Firma Heraeus gelagert. Jedes Dichlormethan-Extrakt der Vollblutproben wurde jeweils zweimal mittels GCxGC-MS (vgl. Kap. 4.7.1.4) analysiert.

Die Probenvorbereitung der Kapselgewebeproben der Implantatträgern (Pat. Nr. 1-29 und Nr. 35-40) erfolgte entsprechend der optimierten Probenvorbereitung (vgl. Kap. 4.4.1.2). Nach Erhalt der Kapselgewebeproben wurden diese im Labor in sterilen Kunststoffgefäßen eingewogen, mit 0,75 mL internem Standard in Dichlormethan (M1: 54 µg M4Q/L) versetzt, erneut eingewogen und bis zur weiteren Probenvorbereitung bei -20 °C (14 bis max. 62 h) gelagert. Anschließend wurden jeweils zwei Gewebeproben derselben Implantat-Seite in einer Lysis Tube eingewogen, mit 0,2 mL Wasser versetzt und homogenisiert (s. oben und Tabelle 6). Nach Zugabe und Einwaage des Dichlormethans (von beiden Proben, insgesamt 1,50 mL) erfolgte die Extraktion und Zentrifugation. Alle Dichlormethan-Extrakte der Gewebeproben wurde in drei GC-Vials mit Mikroinlets und Teflon-Schraubkappen überführt, gegebenenfalls mit 54 µg M4Q/L-Standardlösung in Dichlormethan verdünnt (Verdünnungsfaktor zwischen 2-20) und mittels GC-MS (M1 vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen) analysiert. Zum Vergleich wurden die Dichlormethan-Extrakte der beidseitigen Kapselgewebeproben der Implantatträgern Nr. 26, 28 und 29 direkt im Anschluss an die GC-EI-MS-Analyse mit 54 µg M4Q/L-Standardlösung in Dichlormethan verdünnt (drei Ansätze je Extrakt) und zusätzlich mittels GC-APPI-Orbitrap-MS quantifiziert (vgl. Kap. 4.7.1.2 finale Einstellungen). Die Quantifizierung der Siloxane in den Dichlormethan-Extrakten erfolgte über eine externe Fünf-Punkt-Kalibrierung zwischen 10-150 µg D3-D6/L (M1, s. oben). Für die *suspected-target* und *non-target*-Analyse mittels komprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurden die Dichlormethan-Extrakte der Kapselgewebeproben von Frauen mit intakten SBI (n = 10) und defekten SBI (n = 6), sowie einem defekten Bilumen-Hydrogel-Implantat (Pat. Nr. 36) bis zur Analyse bei -80 °C in einem Tiefkühlschrank der

Firma Heraeus gelagert. Die Dichlormethan-Extrakte wurden jeweils zweifach mittels GCxGC-MS (vgl. Kap. 4.7.1.4) analysiert.

Tabelle 7: Übersicht über die angewendeten GC-MS basierten Methoden zur quantitativen und qualitativen Analyse von Vollblut- und Kapselgewebeproben der Implantatträger.

Patient Nr.	Analysegerät	abweichende GC-Parameter
Blutproben		
1-18	M1	
19-23	M2	Trennsäule: Rxi 5Sil-MS (30 m; 0,25 mm ID; 0,25 µm)
8, 10, 11, 13, 15-34	M2	
5,6,8-13,19-29, 35, 36, 40 (bzw. 15, 16, 30, 31)	GCxGC-MS	
Gewebeproben		
1-29, 35-40	GC-MS (M1)	
26, 28, 29	GC-APPI-MS	
5, 6, 8-11, 13, 19, 20, 23	GCxGC-MS	

4.4.3 Probenvorbereitung der Blutplasmaproben für die qualitative *non-target*-Analytik

Für die Untersuchung möglicher Siloxan-Metabolite (u. a. Silandiol, Disiloxan- und Trisiloxandiol) in Plasmaproben von Patienten mit defekten und intakten SBI (jeweils zwei), wurden die Blutproben bei 14 °C und 4000 Umdrehungen pro Minute fünf Minuten zentrifugiert und das Blutplasma in drei Aliquote je 0,95 mL in 15 mL-Kunststoffgefäße überführt. Zur Kontrolle wurde das Vollblut der Kontrollperson zentrifugiert und das Plasma in neun Aliquote je 0,95 mL aufgeteilt. Jeweils drei Aliquote der Kontrollperson wurden mit jeweils 50 µL Silandiol-Stammlösung A bzw. B und die übrigen drei Aliquote sowie die Plasmaproben der Implantatträger als auch der *procedural blank* (0,95 mL Reinstwasser) mit 50 µL Reinstwasser versetzt. Nach Zugabe einer methanolischen M4Q-Lösung wurden alle Gefäße unter Zuhilfenahme einer Laborschüttelplatte fünf Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Analog zu VARAPRATH et al. [177, 294] wurden die Proben jeweils dreimal mit 1 mL Extraktionsmittel (hier Acetonitril) und unter Zugabe von 0,1 g Natriumchlorid zur Phasentrennung eine Minute extrahiert. Die Acetonitril-Phasen wurden vereinigt und mit 0,5 g Magnesiumsulfat mittels Vortexer eine Minute getrocknet. Für die Derivatisierung wurde jeweils 1 mL der getrockneten Acetonitril-Extrakte in Glas-Vials überführt und mit 100 µL N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) versetzt. Das Gemisch wurde für 30 min. bei 60 °C und 200 Umdrehungen pro Minuten geschüttelt. Durch Zugabe von Methanol wurden überschüssiges BSTFA deaktiviert und die Reaktionsgemische verdünnt

und anschließend mittels GCxGC-MS (vgl. Kap. 4.7.1.4) analysiert (Silanol-Endkonzentration 37,5 und 375 µg/L Plasma; M4Q-Endkonzentration 61 µg/L Plasma).

4.4.4 Probenvorbereitung aufgestocker Vollblutproben für die dynamische *headspace*-GC-Analyse

Für die Überprüfung der Eignung einer dynamischen *headspace*-Injektionstechnik zur gaschromatographischen Analyse zyklischer Siloxane in Vollblut wurden mit einer methanolischen Siloxan-Standardlösung aufgestockte Vollblutproben sowie destilliertes Wasser analysiert. Hierzu wurden in 20 mL-HS-Glasvials jeweils 1,5 mL Vollblut bzw. destilliertes Wasser (Kontrolle) mit 3,48 mL destilliertem Wasser verdünnt und mit 10 µL einer methanolischen 10 mg D3-D6/L-Standardlösung bzw. Methanol (für die Blindproben), sowie mit 10 µL einer methanolischen 10 mg M4Q/L-Standardlösung versetzt. Die HS-Vials wurden anschließend mittels Aluminium-Kappen mit Teflon-Septa verschlossen, geschüttelt und bei Raumtemperatur bis zur Analyse gelagert. Für jede Variante (Vollblut, Kontrolle inklusive Blindproben) wurden fünf Ansätze durchgeführt und mittels GC-*in-tube extraction* (ITEX)-MS analysiert (vgl. Kap. 4.7.1.3).

4.4.5 Durchführung von Wasch-Experimenten bei der Probenvorbereitung von Kapselgewebeproben

Die ermittelten Siloxan-Gehalte in den Dichlormethan-Extrakten der Kapselgewebeproben rücken die Frage nach der Zellgängigkeit dieser Substanzen in den Vordergrund. Um diese zu untersuchen, wurden Wasch-Experimente mit Dichlormethan durchgeführt. Für diese Experimente wurden jeweils zwei Kapselgewebestücke derselben Brustseite (Pat. Nr. 21-25) in einem 15 mL-Kunststoffgefäß eingewogen. Nach Zugabe und Einwaage von 0,75 mL internen Standard in Dichlormethan (M1: 54 µg M4Q/L) erfolgte der erste Waschschrift für eine halbe, eine und zwei Minuten mittels Vortexer auf der höchsten Stufe. Anschließend wurde die Waschlösung in ein neues Kunststoffgefäß überführt und der Waschgang für das Kapselgewebe wiederholt. Die Waschlösungen wurden vereint und mittels GC-MS (M1 vgl. Kap. 4.7.1.1 finale Einstellungen) analysiert. Die gewaschenen Gewebeproben sowie das dritte bisher unbehandelte Kapselgewebestück derselben Implantatseite wurden, wie oben aufgeführt, ohne vorherige Behandlung direkt homogenisiert, extrahiert und die Dichlormethan-Extrakte analysiert (GC-MS M1 s. oben).

4.4.6 Probenvorbereitung der Kapselgewebeproben für die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um den Einfluss von Dichlormethan auf menschliche Gewebezellen zu untersuchen und möglicherweise bei Eintritt eines Zelltodes eine Apoptose¹⁸ oder Nekrose¹⁹ [295] zuordnen zu können, wurden zwei native Kapselgewebeproben direkt nach Erhalt in einem 15%-igen Glycerin-Wasser-Gemisch bei -80 °C bis zur mikroskopischen Untersuchung gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese jeweils zweimal mit 1,5 mL Phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS, zuvor auf 37 °C erwärmt) gewaschen und mit einem Metall-Skalpell in 2 x 2 mm-große Stücke geschnitten. Diese wurden über Nacht bei 37 °C in mit 3 mL DPBS-Lösung befüllten Petrischalen in einem Inkubator mit Schüttelplatte (50 Umdrehungen pro Minute) der Firma Edmund Bühler GmbH aufgetaut. Anschließend erfolgte die Überführung der Gewebestücke auf Petrischalen mit Glasboden (für die Mikroskopie geeignet) und die Zugabe von 1,5 mL DPBS-Lösung, sowie 3,75 µL des Fluoreszenzfarbstoffes 5-Chloromethylfluorescein Diacetate (10 µM CMFD in Dimethylsulfoxid). Nach einer Inkubationszeit von 30 min. bei 37 °C wurden die Zellen gewaschen und für weitere 30 min. in 1,5 mL DPBS-Lösung inkubiert. Vor der mikroskopischen Untersuchung mit einem inversen Epifluoreszenz-Mikroskop der Firma Nikon (vgl. Kap. 4.7.1.5) wurde die Puffer-Lösung abgenommen und die Zellen vorsichtig mit Labortüchern getrocknet.

4.5 Methodvalidierung

Zur Bestimmung der zyklischen Siloxane wurden sowohl die GC-MS-Methoden (M1 und M2), als auch die GC-APPI-MS-Methode validiert. Dafür wurden die analytischen Eckdaten, wie die Linearität, Wiederfindung (vgl. Kap. 4.4.1), Wiederholbarkeit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze ermittelt. Da die Quantifizierung über eine externe Kalibrierung mit internem Standard erfolgte, wurden die analytischen Grenzen über die Analyse von D3-D6-Standardlösungen in Dichlormethan bestimmt. Hierzu wurde eine 8-Punkt-Kalibration in einem Konzentrationsbereich von 2-20 µg/L für die M1- und GC-APPI-MS-Methode (mit 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 und 20 µg D3-D6/L bei 54 µg M4Q/L)²⁰ jeweils zweimal analysiert. Für die LVI-GC-MS-Methode²¹ wurde eine Kalibrationsreihe in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 3,0 µg/L (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 µg D3-D6/L bei

¹⁸ Verringerung des Zellvolumens, Zellschrumpfen.

¹⁹ Zunahme des Zellvolumens bis zur völligen Zellyse (Auflösen, Platzen der Zelle).

²⁰ Die D3-D6-Konzentrationen 0,5 und 1,0 µg/L lagen unterhalb der berechneten Nachweisgrenze.

²¹ Für die Trennsäulen: Optima PXLB (Macherey-Nagel) und Rxi 5Sil-MS (Restek).

667 ng M4Q/L)²² zweifach analysiert. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach der Kalibriergeradenmethode anhand der DIN 32645 [296] ($\alpha = \beta = 0,05$; $k = 2$) berechnet. Um eine übermäßige Kontamination der Analysegeräte zu vermeiden, wurde zur Bestimmung des linearen Bereiches maximal eine 1000 $\mu\text{g/L}$ - (M1 und GC-APPI-MS) bzw. eine 4 $\mu\text{g/L}$ -Standardlösung (M2) injiziert. Die Wiederholbarkeit innerhalb eines Tages und an verschiedenen Tagen (nach Einbau eines neues Glasverdampferrohres) wurde durch dreifache Analyse eines neu angesetzten 15 $\mu\text{g/L}$ (M1, GC-APPI-MS: bei 54 μg M4Q/L) bzw. 0,7 $\mu\text{g/L}$ -Siloxan-Standards (M2: bei 667 ng M4Q/L) ermittelt.

4.6 Qualitätskontrolle

Aufgrund der Omnipräsenz zyklischer Siloxane, insbesondere in der Raumluft von Laboratorien (vgl. Kap. 2.3), musste eine kontinuierliche Überprüfung des Analysegerätes, der Verbrauchsmaterialien, sowie des Lösungsmittels auf mögliche Kontaminationen erfolgen. Dabei wurde zur Vermeidung von Querkontaminationen zwischen den Standardlösungen, den Proben bzw. dem Lösungsmittel auf eine räumliche Trennung von Lagerung, Ansetzen bzw. Präparation der Standardlösungen und Proben geachtet. Zusätzlich wurde während der Probenvorbereitung und während der Analyse von Standardlösungen und Proben auf den Gebrauch von puderfreien Nitril-Handschuhen geachtet. Um mögliche Kontaminationen bei der Probennahme (in diesem Fall nur für die Blutproben möglich) zu erfassen, wurde die Kontrollprobe (Vollblut eines Probanden ohne SBI) entsprechend der Probennahme der Implantatträger entnommen, transportiert und direkt bzw. nach mehrmonatiger Lagerung in der Monovette bei 5 °C analysiert (engl. *field blank*). Zusätzlich wurde jeder Schritt der Probenvorbereitung durch entsprechende Blindproben überwacht (engl. *procedural blanks*). Die Kontrolle auf mögliche Verunreinigungen des Lösungsmittels Dichlormethan bzw. des Analysegerätes erfolgte vor jeder Quantifizierung durch mehrfache Injektion des internen Standards (54 $\mu\text{gM4Q/L}$, meist 3-4 mal, engl. *instrumental blank*). Eine Minimierung der Signalfluktuation der Siloxan-Intensitäten im *instrumental blank* wurde zum einen durch den Einsatz eines Stahlkastens, der den Injektor-Einlass umgibt und vor jeder Injektion mit Argon gespült wurde (vgl. Kap. 5.2.1.1), erzielt. Zum anderen wurde das Dichlormethan, wenn es nicht genutzt wurde, unter Argon gelagert. Aufgrund der auftretenden Siloxan-Hintergrundbelastung wurden *instrumental* bzw. *procedural blanks* und Siloxan-Standardlösungen bzw. Dichlormethan-Extrakte der Vollblut- bzw. Kapselgewebe-

²² D3-D6-Konzentrationen unterhalb der berechneten Nachweisgrenze R_{xi} : 0,05-0,3 $\mu\text{g/L}$ (D3); 0,05-0,1 $\mu\text{g/L}$ (D4, D5), 0,05 $\mu\text{g/L}$ (D6); Optima: 0,05 $\mu\text{g/L}$ (D4, D5).

proben alternierend gemessen. Die Kalibration des GC-MS-Systems erfolgte mindestens nach jedem Wechsel des Glasverdampferrohres (M1 ca. alle 250 und M2 ca. alle 100 Messungen). Zudem wurde vor jeder quantitativen Analyse ein 15 µg/L- (M1 mit 54 µg M4Q/L) bzw. 0,7 µg/L-Siloxan-Standard (M2 mit 54 µg M4Q/L) analysiert, um die Leistung des Analysegerätes zu prüfen.

4.7 Verwendete Geräte und Materialien

In diesem Kapitel werden die verwendeten Labor- und Analysegeräte, sowie Chemikalien und Verbrauchsmaterialien vorgestellt.

4.7.1 Analysegeräte und verwendete Einstellungen

In diesem Abschnitt sind die verwendeten Analysegeräte, sowie die vorgenommenen Einstellungen aufgeführt. Da für die Methodenentwicklung zur quantitativen Analyse zyklischer Siloxane mittels GC-MS einzelne Parameter bezüglich des Injektionssystems, sowie verschiedene Trennsäulen und Temperaturprogramme des Säulenofens getestet wurden, werden die finalen Einstellungen gesondert aufgeführt.

4.7.1.1 Gaschromatographie-Elektronenstoßionisation-Quadrupol-Massenspektrometrie

Die Analyse zyklischer Siloxane in den Kapselgewebe- und Vollblutproben von Frauen mit intakten und defekten SBI erfolgte durch Injektion des Dichlormethan-Extraktes in einen Gaschromatographen der Firma Agilent Technologies (Injektor der Firma Gerstel) und anschließender Elektronenstoßionisation und massenspektrometrischer Detektion mittels eines Quadrupol-Massenspektrometers (qPol-MS) der Firma Agilent Technologies. Die Analyse der Dichlormethan-Extrakte erfolgte zum einen unter Durchführung der Methode 1, die eine splitlose Injektion eines flüssigen Probenvolumens von 1 µL bei einer konstanten Injektortemperatur von 300 °C beinhaltet. Um eine sensitivere Analyse der Dichlormethan-Vollblut-Extrakte zu realisieren, wurde eine *large volume injection* (LVI)-GC-Methode entwickelt, nachfolgend als Methode 2 bezeichnet. Beide Methoden wurden hinsichtlich Sensitivität durch Minimierung des Siloxan-Untergrundes und Verbesserung der Injektionsbedingungen optimiert.

GC-System	6890N, Agilent Technologies, Waldbronn, D
Autosampler	<i>MultiPurposeSampler</i> (MPS 2), Gerstel, Mühlheim, D

Injektor	Temperaturprogrammierbares Injektionssystem (PTV), Kaltaufgabesystem 4 (KAS) und Septumfreier Aufgabekopf jeweils von Gerstel, Mühlheim, D
Trärgas	Helium 5.0 (1 mL/min), Air Liquide, Oberhausen, D
MS-System	5973N, Agilent Technologies, Waldbronn, D
EI-Quelle	70 eV, 230 °C
qPol	150 °C, Start nach 6,4 min (5Sil-MS-Säule) bzw. 2,0 min. (Optima PXLB-Säule), <i>Scan</i> -Modus: 50-600 m/z; <i>SIM</i> -Modus: D3 (207 , 191, 96), D4 (281 , 265, 133), D5 (355 , 267, 73), D6 (341 , 429, 73) und M4Q (281 , 369, 147), die Quantifizierung der zyklischer Methylsiloxane erfolgte über die fett-markierten Masse-Ladungsverhältnisse
Software	Maestro Control Software for Gerstel solutions, Gerstel, Mühlheim, D MSD Chemstation 2.0.1, Agilent Technologies, Santa Clara, US

Die Bestimmung der Totzeit erfolgte anhand der Retentionszeiten der n-Alkane bei isokratischer Trennung (40°C) und MS-Detektion (*scan*-Modus: m/z 85-220) über die Tudler-Franke-de Zeeuw-Gleichung.

GC-Einstellungen bei der splitlosen-Injektion (M1)

Autosampler	10 µL-Mikroliterspritze (Gerstel, Mühlheim, D), Waschgänge vor Injektion: 15 x Dichlormethan und nach Injektion: 15 x n-Hexan, 5 x Dichlormethan; Injektionsvolumen 1 µL (50 µL/s), splitlos
<u>Optimierung</u>	
KAS	Inlet-Temperatur: 200 °C, 250 °C bzw. 300 °C
Inlet/Liner	a) Verwirbelungseinstich, deaktiviert, Gerstel, Mühlheim, D b) Siltek-beschichtet, deaktiviert, Restek, Bad Homburg, D
Trennsäulen	a) Optima PXLB (Macherey-Nagel, Düren, D), Rxi 5Sil-MS und Rtx 1701 (Restek, Bad Homburg, D) jeweils 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm b) Rxi 5Sil-MS (Restek, Bad Homburg, D), 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm c) SLB-IL60 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D), 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm
Temperaturprogramm	a) Rxi 5Sil-MS (0,25 µm): 40 °C (6,5 min), 20 °/min auf 55 °C, 40 °/min auf 130 °C (0,5 min), 10 °/min auf 158 °C, 70 °/min auf 300 °C (5,0 min) b) Rxi 5Sil-MS (0,10 µm): 40 °C (0,5 min), 10 °/min auf 140 °C, 60 °/min auf 210 °C (1,0 min)

	<p>c) Rtx 1701: 40 °C (0,5 min), 30 °/min auf 200 °C, 60 °/min auf 210 °C (1,0 min)</p> <p>d) Optima PXLB: 45 °C (0,5 min), 30 °/min auf 100 °C, 5 °/min auf 110 °C (0,5 min), 30 °/min auf 160 °C, 60 °/min auf 210 °C (1,0 min)</p> <p>e) SLB-IL60: 40 °C (0,5 min), 10 °/min auf 65 °C, 30 °/min auf 110 °C, 60 °/min auf 210 °C (1,0 min)</p>
--	---

Finale Einstellungen nach erfolgter Optimierung von M1:

Inlet/Liner	Siltek-beschichtet
KAS	300°C (1,0 min), 10 °C/s auf 320 °C (5,0 min)
Trennsäule	Rxi 5Sil-MS (Filmdicke 0.25 µm): 40 °C (6,5 min), 20 °/min auf 55 °C, 40 °/min auf 130 °C (0,5 min), 10 °/min auf 158 °C, 70 °/min auf 300 °C (5,0 min)

GC-Einstellungen bei der LVI-Technik (M2)

Autosampler	250 µL-Mikroliterspritze, Gerstel, Mühlheim, D Waschgänge vor Injektion: 5 x Dichlormethan und nach Injektion: 5 x n-Hexan, 3 x Dichlormethan; kühlbarer Tray-Halter (8°C), CTC Analytics AG bzw. Axel Semrau (Sprockhövel,D)
Injektion	Injektionsvolumen 100 µL, splitlos <i>solvent vent</i> Modus, 0 kPa (0,3 min), <i>purge flow</i> : 30 mL/min, PTV-Kühlung mit flüssigem Stickstoff, Air Liquide, Oberhausen, D
Inlet/Liner	Siltek-beschichtet (s. oben)
<u>Optimierung</u>	
Injektion	Injektionsgeschwindigkeit: 2,59-5,11 µL/s; <i>Vent flow</i> : 330, 410, 500, 650 mL/min; <i>Purge time</i> nach 0,65-1,3 min
KAS	Inlet-Temperatur (Start): -6 °C, 2 °C, 10 °C
Trennsäule	Rxi 5Sil-MS (Filmdicke: 0,25 µm); Optima PXLB (Temperaturprogramme s. oben)

Finale Einstellungen nach erfolgter Optimierung von M2:

Injektion	100 µL (3,22 µl/s), <i>vent flow</i> 410 mL/min, <i>purge time</i> nach 1,05 min
KAS	2 °C (0,3 min), 16 °/s auf 150 °C, 10 °/s auf 320 °C (12,0 min)
Trennsäule	Optima PXLB: 45 °C (0,5 min), 30 °/min auf 100 °C, 5 °/min auf 110 °C (0,5 min), 30 °/min auf 160 °C, 60 °/min auf 300 °C (5,0 min)

4.7.1.2 Gaschromatographie-Atmosphärendruck-Photoionisation-Orbitrap-Massenspektrometrie

Als zusätzliche Methode zur Quantifizierung zyklischer Siloxane in Humanproben erfolgte die Analyse mittels GC-Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI)-Orbitrap-MS. Nach gaschromatographischer Trennung der Analyten in einen Gaschromatographen der Firma Agilent Technologies (Injektor der Firma SIM) erfolgte die Ionisation bei Atmosphärendruck unter Einwirkung einer Krypton-VUV²³-Lampe (Firma Heraeus Noblelight) in einem Prototyp einer APPI-Quelle der Firma iGenTraX. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mit einem Orbitrap-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific. Auch für diese GC-MS basierte Methode wurde eine Optimierung hinsichtlich des Siloxan-Untergrundes und zusätzlich bezüglich der Ionisierungsbedingungen in der Quelle vorgenommen.

GC-System	7890A, Agilent Technologies, Waldbronn, D
Autosampler	G4513A, Agilent Technologies, Waldbronn, D mit einer 10 µL-Mikroliter-Injektionspritze, Hamilton, Bonaduz, CH; Waschgänge vor Injektion: 5 x Dichlormethan und nach Injektion: 5 x n-Hexan, 3 x Dichlormethan
Injektor	Split/splitlos, SIM Scientific Instruments Manufacturer, Oberhausen, D Silikon-Septum, Thermogreen, Shimadzu, Duisburg, D
Inlet/Liner	Sky-beschichtet, deaktiviert, Restek, Bad Homburg, D
Injektion	1 µL (100 µL/s), splitlos, 300 °C
Trärgas	Helium 5.0 (1 mL/min), Air Liquide, Oberhausen, D
APPI-Quelle	Prototyp, iGenTraX, Haan, D mit einer Kr-VUV-Lampe (IE: 10/10.6 eV), Heraeus Noblelight, Hanau, D
<i>Make-up gas</i>	Stickstoff 5.0 (0,65 mL/min)
MS-System	Exactive, Thermo Fischer Scientific, Bremen, D <i>Scan-Bereich</i> : 50-500 m/z bzw. 205-357 m/z; <i>Quantifizierung</i> : D5 (355,022-355,122), D6 (340,972-341,0678) und M4Q (281,020-281,074)
<u>Optimierung</u>	
Trennsäule	a) TR Dioxin-5MS (Thermo Fischer Scientific, Bremen, D), 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm: 40 °C (0,5 min), 30 °/min auf 150 °C, 30 °/min auf 300 °C (1 min) b) Optima PXLB: 40 °C (0,5 min), 30 °/min auf 150 °C, 30 °/min auf

²³ VUV: Vakuumultraviolettstrahlung < 200 nm

Ionenquelle	300 °C (1 min) c) SLB-IL60: 40 °C (0,5 min), 10 °/min auf 75 °C, 30 °/min auf 110°C; 60 °/min auf 300 °C (1 min) Temperatur: 230 °C, 250 °C, 270 °C
Finale Einstellungen nach erfolgter Optimierung der GC-APPI-Orbitrap-MS-Methode:	
Ionenquelle	250 °C
Trennsäule	SLB-IL60: 40 °C (0,5 min), 10 °C/min auf 75 °C, 30 °C/min auf 110°C; 60 °C/min auf 300 °C (5 min)
Software	Xcalibur, Version 2.1, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D MSD Chemstation B04.03, Agilent Technologies, Santa Clara, US

4.7.1.3 Gaschromatographie-*in-tube extraction*-Ion Trap-Massenspektrometrie

Um die Eignung einer dynamischen *Headspace* basierten Injektionstechnik, hier *in-tube extraction* (ITEX), zur Analyse von zyklischen Methylsiloxanen in Vollblut zu überprüfen, wurden Testmessungen zusammen mit Frau XOCHITLI OSORIO (Arbeitskreis Prof. Dr. Thorsten C. Schmidt, Instrumentelle Analytische Chemie, Fakultät Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Hierzu wurden ein GC-Ion Trap-MS-System der Firma ThermoQuest GmbH sowie ein ITEX-System der Firma Axel Semrau verwendet.

GC-System	Thermo Quest Trace GC, ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, D
Autosampler	PAL Combi-xt mit ITEX2 (Axel Semrau, Sprockhövel, D) mit einfachem Magnetprüher (engl. <i>single magnet mixer</i> , SMM), von Chromtech (Idstein, D) mit Spritzenhalter (1,3 mL- <i>Headspace</i> Spritze, Hamilton, Bonaduz, CH) und Trap-Heizung (70°C)
Injektor/Inlet	split/splitlos-Injektor (Axel Semrau, Sprockhövel, D) mit Glasliner mit Verwirbelungseinstich (deaktiviert, BGB Analytik, Rheinfelden, D)
Adsorber	Carbo-Nanotubes (52 mg), Bayer Material Science, Leverkusen, D
ITEX-Modus	Inkubation (40 °C, 10 min, 500 rpm), Extraktion (1000 µL (100 µL/s), 60 Zyklen), Desorption (280 °C bzw. 300 °C, 10 s, 500 µL (50 µL/s)) und Ausheizen des Adsorber-Materials (300 °C, 15 min)
Trägergas	Helium 5.0 (1 mL/min), Air Liquide, Oberhausen, D
Trennsäule	Wax (Restek, Bad Homburg, D), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm: 40 °C (5,0 min), 5 °/min auf 220 °C (5,0 min)

MS-System	Finnigan Polaris Q Ion Trap-MS (ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, D); 200 °C; Start: 7,5 min; <i>Damping gas</i> 0,3 mL Helium/min; <i>Scan-Modus</i> 50-650 m/z
EI-Quelle	70 eV; Temperatur 200 °C
Software	Xcalibur 1.4 Version, Thermo Fischer Scientific, Bremen, D Pal Cycle Composer, CTC Analytics AG, Zwingen, CH

4.7.1.4 Komprehensive zweidimensionale Gaschromatographie-Quadrupol-Massenspektrometrie

Für die *non-target*- und *suspected-target*-Analysen der Silikongelproben und der Humanproben der Implantatträger wurde eine komprehensive zweidimensionale Gaschromatographie-Quadrupol-Massenspektrometrie (GCxGC-MS) der Firma Shimadzu verwendet. Die Modulation des von der ersten Säule kommenden Effluenten erfolgte durch einen Loop-Modulator der Firma Zoex.

GC-MS-System	GCMS QP2010, Shimadzu, Duisburg, D
Autosampler	AOC-20i (Shimadzu, Duisburg, D) mit einer 10 µL-Mikroliterspritze, SGE Analytical Science, Milton Keynes, UK; Waschgänge vor Injektion: 3 x Dichlormethan und nach Injektion: 7 x Dichlormethan
Injektor/Inlet	split/splitlos (split 1:10) mit Silikon-Septum (Thermogreen, Shimadzu, Duisburg, D) und Glasliner mit Glaswolle (deaktiviert, SGE Analytical Science, Milton Keynes, UK); Injektionsvolumen 2 µL, 310 °C
Trennsäule	jeweils Phenomenex, Aschaffenburg, D: ZB-5MSi (1D) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm und ZB-50 (2D) 1,7 m x 0,25 mm x 0,10 µm: 40 °C (1,0 min), 5 °/min auf 300 °C (1,0 min)
Modulation	Loop-Modulator von Zoex Corporation (Houston, US) mit einer Modulationszeit von 4s (<i>cold-jet</i> : kontinuierliche Kühlung mit flüssigem Stickstoff, Air Liquide, Oberhausen, D) bei einem <i>hot-jet</i> von 200 ms (130 °C, nach 10 min auf 280 °C)
Trärgas	Helium 5.0 (1 mL/min), Air Liquide, Oberhausen, D
EI-Quelle	70 eV; Temperatur 200 °C
qPol	150 °C; 11,51 min – 51,00 min; <i>Scan-Modus</i> : 50-650 m/z (0,05 s)

Abweichende Parameter für die GCxGC-MS-Analyse nach BSTFA-Derivatisierung der Blutplasmaproben und Deaktivierung mit Methanol:

Autosampler	Washgänge vor Injektion: 3 x Methanol; nach Injektion: 7 x Methanol
-------------	---

Injektor	Injektionsvolumen: 1 μ L
Trennung	Temperaturprogramm: 40 °C (6,0 min), 5 °/min auf 300 °C (1,0 min) bei einer Modulationszeit von 5 s
qPol	19,51-55,00 min; <i>Scan</i> -Modus: 50-500 m/z (0,05 s)
Software	NIST, Version 08, Standard Referenz MS-Datenbank, National Institute of Standards and Technology Gaithersburg, US Wiley W9N08, Referenz MS-Datenbank, Gaithersburg, US GCMS Solutions 2.21, Shimadzu, Duisburg, D GC-Image Software, Version 2.0, GC-Image LLC, Licoln, US

4.7.1.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzaufnahmen des Kapselgewebes bzw. der human U2OS-Zellen (Osteosarkom-Zelllinie) wurden mit Hilfe von Frau Dr. Olga Müller (Arbeitskreis Prof. Dr. Perihan Nalbant, Molekulare Zellbiologie, Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen) aufgenommen. Die U2OS-Zellen wurden analog zum Vorgehen, das in Kap. 4.4.6 beschrieben wurde, von Frau DR. O. MÜLLER präpariert.

Mikroskop	Eclipse Ti-E, Nikon, Düsseldorf, D (inverse Epifluoreszenz-Messungen)
Objektiv	Plan, Fluor 4x Phl DL, NA: 0,13 (für das Kapselgewebe) und Plan Fluor EL WD 20x DIC NI, NA: 0,45 (für die U2OS-Zellen)
Filterrad	Lambda 10-2 RS232 (Sutter Instrument, Novato, US)
Lampe	TI-PS 100 W
Kamera	CoolSNAP HQ2, 1394, 14-bit, 220 V, mit Sony CCD (Roper Scientific, Tucson, US)
Wellenlängen	Anregung: 492 nm; Emission: 517 nm
Aufnahme	Nach Einstellung der Höhe, Position und Schärfe wurden die Aufnahmen gestartet und etwa 100 μ L Dichlormethan zu den U2OS-Zellen hinzugegeben. Das Gewebe wurde hingegen vor der Aufnahme mit Dichlormethan benetzt.
Software	NIS-Elements AR, Version 3.2, Nikon, Düsseldorf, D

4.7.1.6 Mammasonographie

Bei den an dieser Studie teilnehmenden Patienten erfolgte die klinische Vordiagnose mittels Ultraschall in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen in einem Zeitraum von bis zu vier Wochen vor dem Explantationstermin. Die Untersuchungen wurden von den Oberärzten DR. P. RUSCH, DR. O. HOFFMANN und der Fachärztin DR. C. GOLDNAU durchgeführt. Für die Ultraschall-Aufnahmen wurden das Acuson-Antares und das Acuson X300, beide von der Firma Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland (Mehrfrequenzbildgebung, hochauflösend, 5-13 MHz), eingesetzt. Die erhaltenden SONO-Bilder wurden anschließend nach dem Implantat-Zustand (Beschaffenheit der SBI-Hülle) beurteilt und in die entsprechende Kategorie „intakt“ oder „defekt“ eingeordnet. Folgende Ultraschall-Kriterien wurden als indikativ für das Vorliegen defekter SBI definiert [21, 91, 297]:

- Unterbrechungen der normalerweise scharfen Linie zwischen der SBI-Hülle und der umliegenden Bindegewebskapsel.
- Abnorme echogene Linien im Silikongel (Strickleiter-Zeichen).
- Vergrößerte und anatomisch abnorme Lymphknoten in der Achsel.
- Erhöhte Echogenität und Schallschattenbildung zwischen der Bindegewebskapsel und der SBI-Hülle (Schneesturm-Muster).

4.7.1.7 Weitere verwendete Software

Adobe Photoshop, Version CS 5.1, Adobe Systems

ChemDraw Ultra, Version 10.0, CambridgeSoft

Mendeley Desktop, Version 1.14, Mendeley Ltd.

Office Professional Plus 2010, Microsoft

Origin Pro, Version 8 SR0, OriginLab Corporation

Windows 7 Professional, Microsoft

4.7.2 Laborgeräte und Materialien

Folgende Laborgeräte und Materialien kamen zum Einsatz:

- Aluminium-Kappen mit Teflon/Butyl-Septa, VWR International, Darmstadt, D
- Analysenwaage, AX224 (220 g max; d = 0,1 mg), Sartorius, Göttingen, D
- Argon-Haus: Edelstahlkasten, H 10 cm, L 8 cm, B 8cm, Eigenbau, Universität Duisburg-
- Essen, D. Gespült mit Inertgas: Argon 4.6, Air Liquide, Oberhausen, D
- Aufschlussgefäße, Lysis Tubes E, mit Keramikperlen 2,4-2,8 mm, Analytik Jena, Jena, D

- Einmachgläser, klares Glas mit Glasdeckel, Gummidichtung und Metallklemmen, verschiedene Hersteller und Volumen
- Gefrierschrank (-20 °C), Mediline, Liebherr-International D, Biberach an der Riß, D
- Gefriertruhe (-20 °C), Alaska, Viernheim, D
- Glasvials, 1,5 mL-Volumen mit Gewinde, VWR International, Darmstadt, D
- Handschuhe, Nitril, verschiedene Hersteller
- Handschuhe, Silver Shield, Honeywell Safety Products, Smithfield, US
- Headspace-Glasflaschen, 20 mL mit Rollrand, VWR International, Darmstadt, D
- Homogenisator, SpeedMill Plus, Analytik Jena, Jena, D
- Inkubator, Kompaktschüttler und Inkubationshaube, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
- Inkubator, B 40, Memmert, Schwabach, D
- Kühlschrank (5 °C), Elektrolux, Nürnberg, D
- Kühlschrank (5 °C), Mediline, Liebherr-International D, Biberach an der Riß, D
- Kunststoffröhrchen, steril, Volumen 15 und 50 mL, Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
- Laborschüttelplatte, SM 25, Edmund Bühler, Hechingen, D
- Laborzentrifuge, Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, US
- Laborzentrifuge, MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg, D
- Messkolben, 10 und 50 mL, DURAN-Glas, VWR International, Darmstadt, D
- Monovetten, 3-5 mL-Volumen mit 0,106 mol Natriumcitrat-Lösung (0,3-0,5 mL), EU-Code grün, Sarstedt, Nümbrecht, D
- Petrischalen, mit und ohne Glasboden, zur Verfügung gestellt vom AK Nalbant
- Pipetten, Transferpette® und Transferpette S®, verschiedene Volumina 0.5-1000 µL, Brand, Wertheim, D
- Pipettenspitzen, verschiedene Größen, VWR International, Darmstadt, D
- Präparationsbesteck: Plastik-Pinzette, Metall-Pinzette, Keramik-Skalpell, Metall-Skalpell, verschiedene Hersteller
- Reinraum-Werkbank, biowizard, Kojair Tech Oy, Vilpulla, FIN
- Reinstwasseranlage, Arium pro VF, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
- Schraubgläser, 20 mL-Volumen, mit Gewinde, Macherey-Nagel, Düren, D
- Schraubkappen, Teflon (PTFE), Macherey-Nagel, Düren, D
- Septen, Kurzgewinde Teflon, 1 mm, WICOM, Heppenheim, D
- Styroporboxen, verschiedene Größen, Storopack Hans Reichenecker GmbH, Metzingen, D
- Tiefkühlschrank (-80°C), Herafreeze, Heraeus, Hanau, D

- Ultraschallbad, USR 30 H, Merck Eurolab, Bruchsal, D
- Vortexer, Vortex Genie 2, Scitific Industries, New York, US

4.7.3 Chemikalien

- Siloxan-Standard-Substanzen:
 - Decamethylcyclopentasiloxan (D5); Hexamethylcyclotrisiloxane (D3) und Tetrakis-(trimethylsiloxy)silane (M4Q), jeweils 97 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
 - Dodecamethylcyclohexasiloxan (D6), 95 %, ABCR, Karlsruhe, D
 - Octamethylcyclotetrasiloxan (D4), 98 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- Standard-Substanzen für die GCxGC-MS-Analyse:
 - 2(Methylthio)benzothiazole, 97 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - Coffein, purum, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - Decamethyltetrasiloxan (L4), 97%, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - Dodecamethylpentasiloxan (L5), 97%, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - n-Butyl-, n-Octyl-, und n-Nonylbenzol, jeweils 99 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
 - n-Heptyl- und n-Decylbenzol, jeweils 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - n-Pentyl- und n-Hexylbenzol, jeweils Analytischer Standard, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - Octamethyltrisiloxan (L3), 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Lösungsmittel:
 - Acetonitril, $\geq 99,9$ %, für LC-MS, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - Dichlormethan, 99,8 %, für HPLC stabilisiert mit Amylen, Acros Organics, Geel, BEL
 - Methanol, 99,8 %; HiPerSolv für HPLC, VWR International, Darmstadt, D
 - n-Hexan, 98 %; SupraSolv für GC-ECD/FID, Merck, Darmstadt, D
- weitere Chemikalien:
 - Dimethoxydimethylsilane, 97 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
 - 5-Chloromethylfluorescein Diacetate Dye (CMFDA), CellTracker green, für lebende Zellen, Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, US
 - Glycerin, 99,5%, Carl Roth, Karlsruhe, D
 - Magnesiumsulfat, wasserfrei, ≥ 97 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 - Natriumchlorid, NORMAPUR[®], VWR International, Darmstadt, D
 - N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA), Macherey-Nagel, Düren D bzw. Carl Roth, Karlsruhe, D
 - n-Decan, > 99 %, n-Undecan, > 97 %, und n-Dodecan, > 98 % jeweils für GC, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

n-Heptan, > 99 %, pure, Acros Organics, Geel, BEL

n-Nonan, 99 %, Alfa Aesar, Karlsruhe, D

n-Oktan, > 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Phosphat-gepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines, DPBS), ohne Calcium- und Magnesiumchlorid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

- Vergleichsmatrix für das Kapselgewebe:

Stielkotelett vom Schwein, Wilhelm Brandenburg, Rewe Markt, Köln, D

5 Ergebnisse und Diskussion

Für die Identifizierung einer Marker-Substanz und die Bestimmung einer Grenzkonzentration zyklischer Siloxane im Vollblut der Patienten mit defekten Silikonbrustimplantaten wurden unterschiedliche *screening*-Verfahren und GC-MS basierte Methoden angewendet. Die nachstehenden Ausführungen gliedern sich in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt wird die qualitative Analyse von Silikongel unterschiedlicher SBI-Hersteller sowie die Wiederfindung chemischer Additive in Humanproben von Patienten mit defekten und intakten SBI mittels umfassender zweidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie vorgestellt. In diesem Kontext wurde auch eine sogenannte *non-target*-Analytik zur Identifizierung von Marker-Substanzen in den Blutproben dieser Patienten durchgeführt. Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Methodenentwicklung und Validierung zur sensitiven GC-MS-Analytik zyklischer Methylsiloxane basierend auf der *split/splitlosen*-Injektion bzw. der *large volume injection*-Technik. Im dritten Abschnitt werden die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Kapselgewebe- und Blutproben vorgestellt. Komplementiert wird dieser Abschnitt um einen Vergleich, in dem die Genauigkeit der hier entwickelten analytischen Diagnostikmethode im Kontrast zur gängigen klinischen Methode, der Mammasonographie, beurteilt wird.

5.1 Qualitative Analyse von Silikonbrustimplantaten und Humanproben von Implantatträgern mittels umfassender zweidimensionaler Gaschromatographie

Seit der ersten Veröffentlichung von CREMER & PRIOR zur gaschromatographischen Trennung von Kohlenstoffdioxid, Ethan und Ethin auf einer Kieselsäule und Wasserstoff als Trägergas im Jahr 1951 [298] und der Auftrennung kleinerer Fettsäuren durchgeführt von JAMES & MARTIN [299], wurde diese Trenntechnik insbesondere im Hinblick auf die Trenneffizienz stetig weiter entwickelt [300]. Neben der Verlängerung der Trennsäule, die mit einer erheblichen Zunahme der Analysezeit einhergeht [277], kann eine Erhöhung der Peakkapazität durch die Kopplung mehrerer Trennsäulen erreicht werden [278]. Die erste Veröffentlichung im Bereich der multidimensionalen Gaschromatographie erfolgte bereits im Jahr 1958 von SIMMONS & SNYDER [301], in der die Trennung eines Alkan und Cycloalkan-Gemisches mittels „*two-stage gas-liquid chromatography*“ [301] im Mittelpunkt stand. Bei dieser Trennmethode wurde eine Kopplung zweier Trennsäulen mit orthogonalen Trenneigenschaften und eine Überführung der von der ersten Trennsäule eluierenden Fraktion bzw. Fraktionen auf die zweite Säule durch Umschalten von Kipphebelventilen vorgenommen. Da nur einzelne

Fraktionen auf die zweite Dimension überführt werden, wird die theoretische Peakkapazität eines GC-GC-Systems aus der Summe der Einzelkapazitäten der beiden Trennsäulen zusammen gesetzt, multipliziert mit der Anzahl der *heart-cuts* [302]. Bei einer komprehensiven zweidimensionalen GC hingegen, wird die hohe Trennleistung durch die bestmögliche Orthogonalität der beiden Trennsäulen²⁴ sowie die vollständige Überführung des Effluenten auf die zweite Trennsäule erreicht. Die Peakkapazität ist folglich das Produkt aus den beiden Einzelkapazitäten der beiden Dimensionen [277, 302, 303].

Aufgrund ihrer hohen Trennleistung, chemischen Selektivität und Sensitivität nimmt die GCxGC gekoppelt mit der Massenspektrometrie eine zentrale Rolle in der Analyse komplexer Umwelt- und Humanproben ein, beispielsweise in der Erfassung von Metaboliten und Identifizierung von Biomarkern [278, 304–309]. Aus diesem Grund wird die GCxGC-MS in den nachfolgenden Abschnitten für die *non-* und *suspected-target*-Analytik von Silikongel- und Humanproben verwendet.

5.1.1 Chemische Additive in Silikongel unterschiedlicher SBI-Hersteller

Insbesondere seit dem PIP-Skandal im Jahr 2010 und dem damaligen Bekanntwerden, dass in einigen der von 2001 bis 2010 produzierten Implantate Industrie- anstatt medizinisches Silikongel verwendet wurde [3, 6], werden instrumentell-analytische Verfahren zur Analyse von SBI zunehmend eingesetzt. Neben der gängigen GC-MS-Analyse fanden unterschiedliche spektroskopische Methoden, wie die IR-, Raman- und NMR-Spektroskopie, sowie massenspektrometrische Methoden, u. a. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-MS (MALDI), und analytische Methoden in der flüssigen Phase, wie die Fließinjektion-ESI-MS und die HPLC gekoppelt mit UV/VIS-Detektoren, Anwendung [6, 72–74, 310, 311].

Der vorliegende Abschnitt dieser Arbeit beschreibt die qualitative Analyse von Silikongel aus Silikonbrustimplantaten und -explantaten der Hersteller Allergan (McGhan), Mentor, Siltex, Rofil und PIP mittels komprehensiver zweidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Die in dieser Arbeit verwendeten, zuvor für Demonstrationszwecke eingesetzten Silikonimplantate wurden von Dr. Oliver Hoffmann (Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen) zur Verfügung gestellt. Die Explantate wurden bereits im Jahr 2012 im Sana Krankenhaus Düsseldorf in der Abteilung für Plastische und Ästhetische Chirurgie explantiert und von Dr. Mazen Hagouan bereitgestellt. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit bzw. der homogenen Verteilung der mit Dichlormethan extrahierbaren

²⁴ z. B.: Trennung entsprechend des Dampfdruckes (1D-Säule unpolar) und Trennung nach Polarität (2D-Säule polar) [277, 368, 369]

chemischen Additive wurden jeweils zwei Gelproben desselben SBI an zwei unterschiedlichen Stellen entnommen, mit Dichlormethan extrahiert und die Extrakte je zweifach analysiert. Eine Erfassung möglicher Hintergrund- oder Querkontaminationen erfolgte durch die vorangehende Analyse des *instrumental blanks* (nur Dichlormethan) und des *procedural blanks*. Abbildung 8 zeigt den resultierenden Konturplot beispielhaft für die GCxGC-MS-Analyse einer zuvor verdünnten SBI-Gelprobe des Herstellers Rofil. Nach Vergleich aller Wiederholmessungen eines SBI mit allen zusätzlich gemessenen *instrumental* und *procedural blanks* wurden die Spots (unbekannte Substanzen) markiert, die in mindestens zwei der Gelproben gemessen wurden. Aufgrund der Spot-Verteilung in der resultierenden Konturplot-Darstellung könnten drei homologe Reihen (HR) in dem Gel des Rofil-Explantates vorliegen: 1.) die Substanzen mit den Spot-Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 16 und 18 (HR 1), 2.) die Spots mit den Nummern 8, 10, 13, 15, 17 und 19 (HR 2) und 3.) die Spot-Nr. 25, 27 und 28 (HR 3).

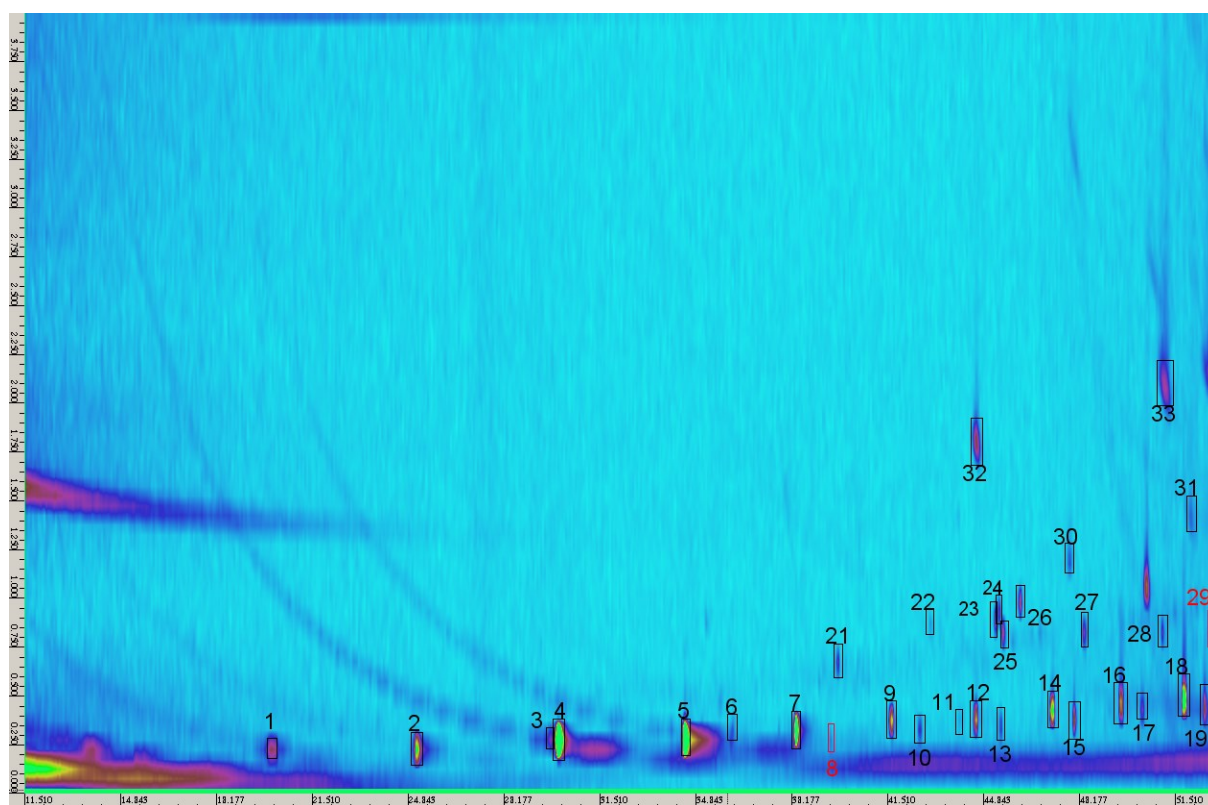


Abbildung 8: GCxGC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer Silikongelprobe eines explantierten Rofil-SBI (Farbskala von ca. $2,5$ bis $7,5 \times 10^5$ Counts). Nach Einwaage von $0,075$ g Silikongel, Extraktion mit 2 mL Dichlormethan und 1:4-Verdünnung des Extraktes mit Dichlormethan vor der Analyse.

Diese Substanzverteilung in einem GCxGC-Chromatogramm resultiert aus der Orthogonalität der Trennphasen, in diesem Fall mit einer unpolaren Säule in der ersten und einer mittelpolaren Säule in der zweiten Dimension. Substanzen einer homologen Klasse eluieren entlang

einer Elutionsbande [279], wobei mit voranschreitender Analyse bzw. Temperatur im GC-Ofen eine Verkürzung der zuvor gleichmäßigen Retentionszeitdifferenzen zwischen zwei Homologen beobachtet werden kann. Neben den Elutionsbanden im GCxGC-Chromatogramm verweisen zusätzlich die EI-Massenspektren der Spots auf das Vorliegen homologer Reihen, wobei typische Fragmente mit Masse-Ladungsverhältnissen für Substanzen mit einem Poly(dimethylsiloxan) (PDMS)-Gerüst vorliegen (für HR 1 und 2: m/z 73, 147, 221, 281, 355, 429 und 503; HR 3 s. unten). Basierend auf der gewählten Zusammenstellung der beiden Trennsäulen könnten zusätzlich aufgrund der längeren Retentionszeiten ($^1t_R > 40$ min; $^2t_R: > 0,5$ s) höhersiedende, etwas polarere Substanzen in den Rofil- und PIP-Explantat-Extrakten (insbesondere Spot-Nr. 32, 33) vorliegen. Die drei möglichen homologen Reihen HR 1-3 wurden auch in den untersuchten SBI der Hersteller Allergan und Mentor wiedergefunden. Abbildung 9 zeigt die zweidimensionale Kontur-Darstellung der GCxGC-MS-Analyse eines McGhan-Dichlormethan-Extraktes. Auch für diese Im- bzw. Explantat-Gruppe wurden nur Spots markiert, die in der zweiten GCxGC-MS-Analyse derselben Gelprobe und nicht in den beiden Blindproben (*instrumental* und *procedural blank*) gemessen wurden. Zusätzlich zu den möglichen homologen Reihen HR 1-3 sind in den zweidimensionalen Konturplots der Gelproben dieser Hersteller (Allergan und Mentor) das Vorliegen einer weiteren möglichen homologen Reihe mit den Spot-Nr. 3, 36, 37, 39, 11, 41, 42 und 43 (HR 4) zu erkennen. Die in der Kontur-Darstellung der verdünnten Rofil- und PIP-Explantate rot markierten Spots Nummer 8 und 29 sind in den Gelproben dieser beiden Hersteller zu finden. Hingegen kommen die rot markierten Spots mit der Nummer 20, 37, 38, 40 und 42 nur oder vermehrt in den *medical-grade* Implantaten [310] der Hersteller Mentor und Allergan vor.

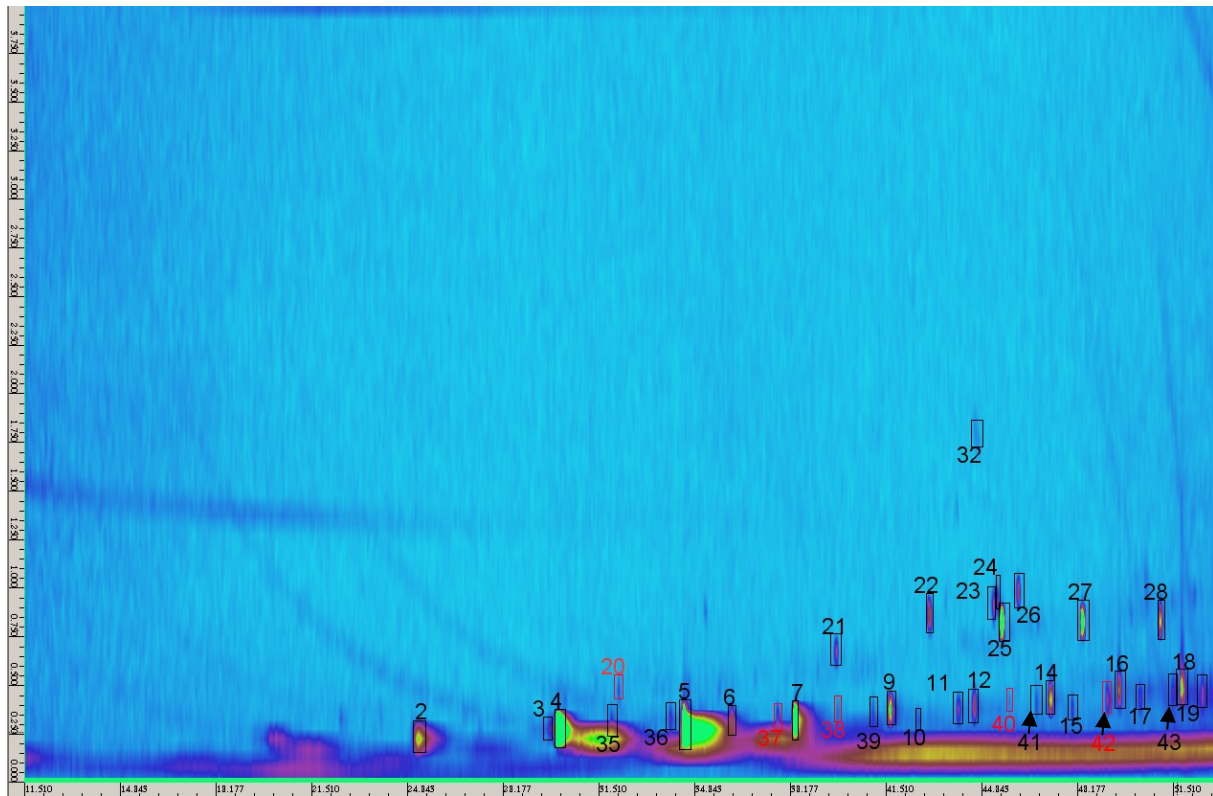


Abbildung 9: GCxGC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer Explantat-Silikongelprobe des Herstellers McGhan (Farbskala von ca. $2,5$ bis $7,5 \times 10^5$ Counts). Nach Einwaage von $0,075$ g Silikongel und Extraktion mit 2 mL Dichlormethan und direkter Analyse des Dichlormethan-Extraktes.

Nach Subtraktion des Signal-Hintergrundes bei dem Modulationspeak mit der höchsten Intensität in den erhaltenen Gesamtionenstrom (engl. *total ion current*, TIC)-Chromatogrammen und nach Abgleich der zu diesen Retentionszeiten vorliegenden EI-Massenspektren ($t_R(\text{TIC})$) mit den beiden Standard Referenz-Datenbanken NIST und Wiley ist anzunehmen, dass neben zyklischen Methylsiloxanen, lineare Methylsiloxane und Phenyl-substituierte Disilane in den Gelproben vorliegen könnten (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Spot-Auflistung der in den Gel-Extrakten vorkommenden möglichen homologen Reihen (HR 1-4).

Spot-Nr.	¹ t _R [min]	² t _R [s]	t _R (TIC) [min]	Vorschlag aus der Datenbank (NIST, Wiley)	Übereinstimmung [%]
1	20,243	0,20	20,247	Octamethylcyclotetrasiloxan (D4)	83-84
	20,242	0,20	20,245	<i>150 µg D4/L Standardlösung in Dichlormethan</i>	
2	25,177	0,20	25,18	Decamethylcyclopentasiloxan (D5)	87-89
	25,176	0,20	25,179	<i>150 µg D5/L Standardlösung in Dichlormethan</i>	
4	30,043	0,25	30,048	Dodecamethylcyclohexasiloxan (D6)	87-90
	30,042	0,25	30,046	<i>150 µg D6/L Standardlösung in Dichlormethan</i>	
5	34,443	0,25	34,448	Tetradecamethylcycloheptasiloxan	89
7	38,31	0,30	38,315	Hexadecamethylcyclooctasiloxan	86
9	41,643	0,35	41,649	Silikatanion Tetramer	86
12	44,577	0,35	44,582	Octadecamethyloctasiloxan	79-80
14	47,243	0,40	47,250	Silikatanion Tetramer	86
				Cyclododecasiloxane	85
16	49,577	0,45	49,584	Silikatanion Tetramer	83
18	51,777	0,45	51,784	Eicosamethylcyclododecasiloxan	81-79
8	39,51	0,25	39,514	Silikatanion Tetramer	81
10	42,643	0,30	42,648	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	81
13	45,443	0,30	45,448	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	82
15	48,043	0,30	48,048	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	81
17	50,31	0,40	50,317	Silikonöl	81-79
19	52,51	0,40	52,517	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	76
25	45,51	0,80	45,523	1,2-Diphenyltetramethyl-disilan; Pentamethyl-Phenyl-Disilane	75 75
27	48,31	0,80	48,323	Pentamethyl-Phenyl-Disilane	73
28	51,043	0,80	51,057	Pentamethyl-Phenyl-Disilane	73
3	29,777	0,25	29,781	Dodecamethylcyclohexasiloxan	85
	29,710	0,25	29,714	<i>200 µg/L Dodecamethylpentasiloxan (L5)-Standardlösung in Dichlormethan</i>	
36	33,977	0,30	33,982	Hexamethyl-Disilane	82
37	37,710	0,25	37,714	Silikatanion Tetramer	85
39	41,043	0,30	41,048	Hexadecamethyl-Octasiloxan	78
11	43,910	0,30	43,915	Silikatanion Tetramer	84-85
41	46,710	0,40	46,717	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	79
42	49,177	0,40	49,183	Silikatanion Tetramer	85
43	51,510	0,45	51,518	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	75

Eine Übereinstimmung der gemessenen EI-Massenspektren mit den in den Datenbank hinterlegten Spektren von lediglich 73 % bis hin zu 90 % und das Auftreten desselben Datenbanken-Vorschlages für verschiedene Spots (z. B. Hexadecamethyl-Heptasiloxan bei Spot-Nr. 10, 13, 15, 19, 29, 41, 43) verdeutlichen, dass eine Zuordnung nicht ohne weiteres möglich ist. Zum einen erschwert das zunehmende Säulenbluten und der damit verbundene

zunehmende Hintergrund im Massenspektrum bei längeren Analysezeiten und erhöhten Temperaturen eine qualitative Analyse von verschiedenen Poly(dimethylsiloxan)-Verbindungsklassen. Zum anderen weist das durch Eliminierung einer Methylgruppe generierte m/z -Fragment höherer Homologen ($[M-15]^+$) im EI-Massenspektrum zunehmend kleinere relative Intensitäten auf²⁵. Durch GCxGC-MS-Analyse einer Siloxan-Standardlösung mit einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/L}$ an Cyclotetra-, Cyclopenta- und Cyclohexasiloxan und dem anschließenden Vergleich der EI-Massenspektren (beispielhaft für D6, s. Abbildung 10) und der Retentionszeiten (s. Tabelle 8) ist eine Identifizierung der Spots mit den Nummern 1, 2, und 4 als zyklische Methylsiloxane (D4, D5 und D6) eindeutig möglich. Auch wenn die Übereinstimmung des gemessenen EI-Spektrums des Cyclohexasiloxans in der Gelprobe eines Rofil-Implantates mit der NIST-Datenbank nur 87 % betrug (insbesondere relative Intensität von m/z 429; $[D6-CH_3]^+$ -Fragment; s. Abbildung 10b), so zeigt das gemessene EI-MS-Spektrum des entsprechenden Standards eine sehr gute Übereinstimmung (s. Abbildung 10 a und c). Analog konnte Spot-Nr. 3 eindeutig als Dodecamethylpentasiloxan (L5) identifiziert werden. Die Differenz der Retentionszeit in der ersten Dimension zwischen Spot Nummer 3 in den Gel-Extrakten (29,777 min) und dem Siloxan-Standard (29,710 min) von 0,067 min entspricht der Modulationszeit von 4 s. Eine Verschiebung der Retention zu kleineren Zeiten in der ersten Dimension ist bei zunehmendem Alter der Trennsäule zu beobachten und hat modulationsbedingt zur Folge, dass schon bei kleinen Abweichungen die entsprechende Fraktion genau einen Modulationsprozess früher detektiert wird. In Korrelation mit dem Auftreten möglicher Homologen könnten bei HR 1 die Reihe der zyklischen Siloxane ab Cyclotetrasiloxan und bei HR 4 die Reihe der linearen Siloxane vorliegen. Da jedoch kommerziell keine analytischen Standards für die höheren Homologen (größer D6) erhältlich sind, ist eine eindeutige Identifizierung nicht möglich.

²⁵ Nach NIST-Datenbank (Version MS-Search 2.0): m/z 429 = $[D6-15]$ Intensität \sim 38%; m/z 504 = $[D7-15]$ Intensität \sim 15%; m/z 651 = $[D9-15]$ Intensität $<$ 10%.

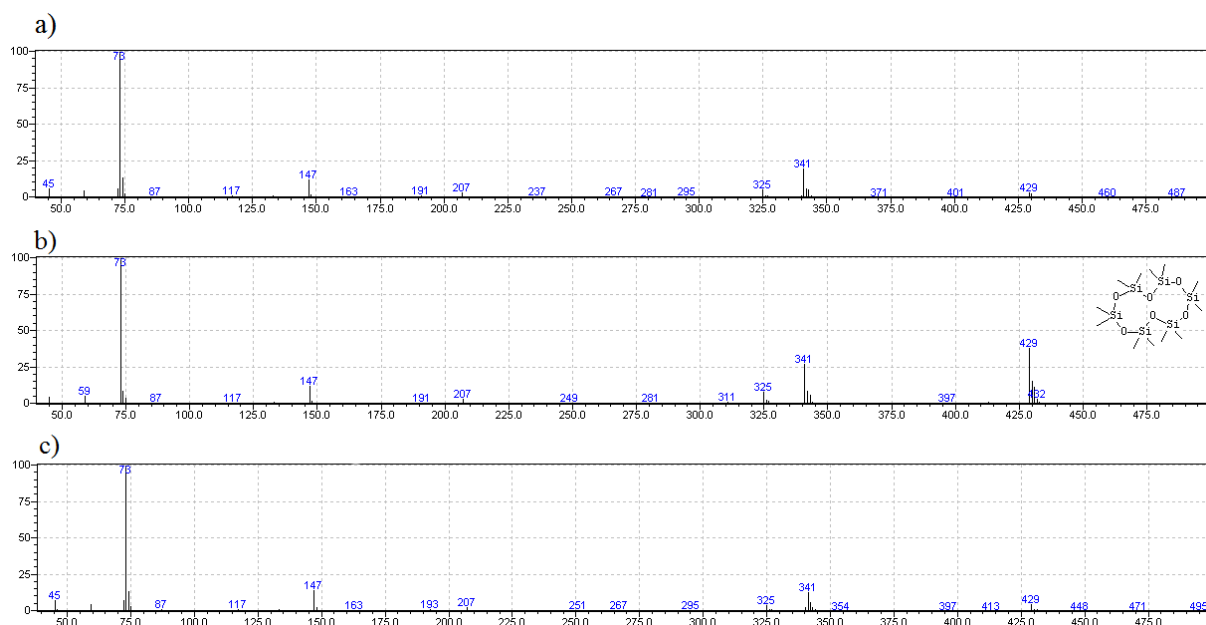


Abbildung 10: Vergleich der EI-Massenspektren (m/z 40-500, jeweils bei $t_R(\text{TIC})$ 30,048 min) zur Identifizierung von D6 in den Extrakten verschiedener SBI-Gelproben nach erfolgter GCxGC-MS-Analyse. a) EI-MS-Spektrum einer Gelprobe des Herstellers Rofil, b) Vorschlag der NIST-Datenbank (Übereinstimmung 87 %), c) EI-MS-Spektrum des D6-Siloxan-Standards.

Der Vergleich der absoluten Signalintensitäten der zyklischen Siloxane D4-D6 (Spot-Nr. 1, 2, 4) und möglicherweise D7 (Spot-Nr. 5) in den Gelproben unterschiedlicher Hersteller zueinander²⁶ zeigt ein vermehrtes Vorkommen dieser Substanzen in PIP- und Rofil-SBI, zumal die Extrakte dieser Hersteller vor der GCxGC-MS-Analyse um einen Faktor 4 verdünnt wurden. Dieses verstärkte Vorkommen der zyklischen Siloxane gegenüber den *medical-grade* SBI ist bereits in der gängigen Fachliteratur bekannt [72, 74, 310, 312] und wird auf zwei Ursachen zurück geführt. Zum einen wird es mit der Abweichung von dem standardisierten Herstellungsverfahren nach ISO 14949 [313] begründet [310]. Diese Norm schreibt das Auswaschen der Edukte bzw. Additive (u. a. zyklischen Siloxane) aufgrund ihrer teils toxischen Eigenschaften bei der medizinischen Nutzung von Silikongelen vor [3, 310]. Die Konzentrationen der im *medical-grade* Silikongel verbleibenden, zyklischen Methylsiloxanen werden zwischen 2 und 1000 ppm angegeben [47, 314, 315]. Zum anderen wird das vermehrte Vorkommen von flüchtigen zyklischen Methylsiloxanen in den Rofil-Implantaten mit dem geringen Vorliegen *crosslinker*-Substanzen in Zusammenhang gebracht [72, 73, 310]. In diesem Fall würde eine geringere Vinyl-Siloxan-Konzentration bei der Vernetzungsreaktion mit einem kleineren Vernetzungsgrad des dreidimensionalen Silikonnetzwerkes einhergehen

²⁶ Anzumerken ist, dass hier bei den GCxGC-MS-Analysen kein interner Standard eingesetzt wurde, weswegen nur absolute Signalintensitäten verglichen werden ($\sim 2 \times 10^6$ Counts für D6).

[48] und folglich freie Silikonkomponenten (Silikonöl) im Silikongel zur Folge haben [72, 310]. Zyklische Siloxane von D5-D7 und D10-D26 wurden unter anderem mittels FI-ESI-MS bzw. D5-D24 mittels GC-MS in einem Aceton-Gel-Extrakt eines PIP-Implantats analysiert [72]. Nicht nur die Verteilung der mutmaßlichen Phenyl-substituierten Silane bzw. Siloxane (Spot-Nr. 25, 27 und 28) im zweidimensionalen Konturplot (gleichmäßige Zunahme der t_R bei gleicher 2t_R) verweist auf das Vorliegen einer homologen Reihe, sondern auch das gleiche Fragmentierungsmuster im unteren Bereich des gemessenen Massenspektrums (m/z -Fragmente 73, 135 und 197; s. Anhang Abbildung 35). Vergleichbare EI-Spektren unbekannter Substanzen mit den m/z 73, 135 und 197 wurden von BERETTA & MALACCO in Aceton-Extrakten von PIP- und McGhan-Silikongelproben mittels GC-MS analysiert, wobei auch in diesem Fall keine eindeutige Identifizierung der Substanzen möglich war [72].

Nach der GCxGC-MS-Analyse von je sechs Im- bzw. Explantaten beider SBI-Hersteller-Gruppen (Mentor/Allergan und Rofil/PIP) können neben den möglichen homologen Reihen HR 1-4 mit einer Übereinstimmung von 75-95 % mit den Datenbanken zusätzlich ein langkettiges n-Alkan (Spot-Nr. 20), sowie unterschiedliche, langkettige Ester (Spot Nr. 34, 24), ein verzweigtes Alken (Spot-Nr. 23) und substituierte Cyclohexanone (Spot-Nr. 21, 26) nur bzw. überwiegend in den Mentor/Allergan-SBI-Gelproben vorliegen (s. Tabelle 9). Mit ausreichenden TIC-Intensitäten ($> 1 \times 10^5$ Counts), jedoch mit einer schlechten Übereinstimmung mit den Datenbanken (fluoriertes Imidazolidin mit < 60 %) konnte in beiden SBI-Gruppen eine weitere Substanz mit der Spot-Nr. 22 analysiert werden. Flüchtige organische Verbindungen, wie Ketone, Aldehyde, Terpene, kurzkettige Ester und organische Säuren, als chemische Zusätze von SBI im Gel sowie in der Elastomer-Hülle von explantierten McGhan- und PIP-Implantaten wurden von BERETTA et al. [74] mittels *Headspace* (HS)-GC-MS untersucht. Nach erfolgter HS-GC-MS-Analyse identifizierte diese Arbeitsgruppe unter anderem Cyclohexanon, Tetradecan und 1-Fluorpropen als vermehrt in den Gelproben des McGhan (Allergan)-Explantates vorkommende flüchtige organische Verbindungen [74].

Tabelle 9: Auflistung der zusätzlich in den Gel-Extrakten vorkommenden möglichen Substanzen.

Spot-Nr.	¹ t _R [min]	² t _R [s]	t _R (TIC) [min]	Vorschlag aus der Datenbank (NIST, Wiley)	Übereinstimmung [%]
Nur in Mentor/Allergan-SBI					
20	32,177	0,45	32,184	langkettiges n-Alkan (C14; C15)	92-95
34	37,510	0,65	37,521	1-Methylethylester-Dodecansäure	85-87
38	39,777	0,35	39,782	Übereinstimmung < 60 %	
40	45,777	0,40	45,783	Silikatanion Tetramer	80
Überwiegend in Mentor/Allergan-SBI					
21	39,777	0,65	39,787	3-Dodecylcyclohexanon	79-80
23	45,243	0,90	45,258	2,4,4-Triethyl-1-Hexene	78
24	45,377	0,90	45,392	Cyclohexylmethylheptylester der schwefeligen Säure	75
26	46,110	0,95	46,126	4-t-Butyl-2-(1-methyl-2-nitroethyl)-Cyclohexanon	82
35	31,910	0,20	31,913	Übereinstimmung < 60 %	
Vergleichbare Häufigkeit bei Mentor/Allergan- und Rofil/PIP-SBI					
22	43,043	0,80	43,057	2-(1'-Fluoro-2'-oxo-2'-heptyl)-2-(perfluorobutyl)-Imidazolidin	55-58
30	47,910	1,15	47,929	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	81-84
31	52,110	1,35	52,133	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	80
Nur in Rofil/PIP-SBI					
29	52,710	0,80	52,723	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	82
32	44,577	1,80	44,607	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	80
33	51,043	2,10	51,078	Hexadecamethyl-Heptasiloxan	79

Unterschiede zwischen den Implantaten und Explantaten der Hersteller McGhan (Allergan) und Mentor (Groupe Perouse Plastique und Siltex) waren nicht zu beobachten. Insbesondere das Vorliegen von biochemischen Metaboliten (z. B. Cholesterol) oder Biomolekülen (z. B. endogene Phospholipide), wie bereits in der Fachliteratur von BERETTA et al. [72] und BIRKEFELD et al. [95] diskutiert, konnte durch die GCxGC-MS-Analyse der Explantat-Gelproben nicht gezeigt werden. Es ist jedoch möglich, dass die Diffusion dieser oder anderer Biomoleküle nur in den direkt an die SBI-Hülle anliegenden Bereich²⁷ erfolgt.

Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeit wurde diese Liste eindeutig identifizierter und möglicher, mit Dichlormethan extrahierbarer Additive in SBI verschiedener Hersteller (Spot-Nr. 1-43) als Grundlage für die Untersuchung von Kapselgewebe- und Blutproben von Frauen mit SBI verwendet.

²⁷ Die Proben wurden aus ca. einem Zentimeter Tiefe des SBI-Gels entnommen.

5.1.2 *Suspected-target*-Analytik von Kapselgewebe- und Vollblutproben von Implantatträgern

Um eine mögliche Diffusion und anschließende Akkumulation flüchtiger SBI-Additive in das umliegende Gewebe und Blutsystem von Implantatträgern zu erfassen, wurden neben den SBI-Gelproben zusätzlich Dichlormethan-Extrakte von Blut- und Kapselgewebeproben der Implantatträger mittels GCxGC-MS analysiert. Hierfür wurden die 21 Blut- und 17 Kapselgewebeproben entsprechend Kap. 4.4.2 mit Dichlormethan extrahiert und die Extrakte analysiert. Die *suspected-target*-Analytik, die die Untersuchung hinsichtlich der Wiederfindung möglicher SBI-Additive (*target*-Liste mit Spot-Nr. 1-43, vgl. Kap. 5.1.1) in den jeweiligen Humanproben beinhaltet, erfolgte durch den Vergleich der entsprechenden Retentionszeiten und EI-Massenspektren. Analog zu den durchgeführten Analysen der Gelproben wurden sowohl für die Gewebe-, als auch für die Blutproben jeweils zwei Messungen je Probe durchgeführt. Zusätzlich wurden mögliche Kontaminationen, die z. B. aus dem Einsatz von Kunststoffgefäßen anstatt von Glasgefäßen (bei den SBI-Gelproben) resultieren könnten, durch wiederholte Analyse des *procedural* und *instrumental blanks* (jeweils $n_{\text{Blut}} = 21$ bzw. $n_{\text{Gewebe}} = 17$) überprüft. Bedingt durch den Einsatz eines Silikon-Septums bei der Injektionseinheit des verwendeten GC-Systems konnten die zyklischen Siloxane D4, D5 und D6, sowie die mutmaßlichen höheren Homologen auch im *instrumental blank* gefunden werden. Um eine mögliche Wiederfindung dieser Substanzen in den beiden Humanproben der Patienten zu erfassen, wurde als Kriterium eine um den Faktor zwei erhöhte Signalintensität in den Proben im Vergleich zu den beiden Blindproben (*instrumental* und *procedural blank*) vorausgesetzt. Beispielhaft für die Dichlormethan-Extraktanalysen der Kapselgewebeproben zeigt Abbildung 11 die resultierende GCxGC-Konturdarstellung einer Kapselgewebeprobe von einem Patienten mit einem defekten SBI unbekanntes Herstellers. Neben den eindeutig identifizierten zyklischen Methylsiloxanen D4, D5 und D6 (Spot-Nr. 1, 2, 4) konnten zusätzlich die mutmaßlich höheren Homologen dieser Substanzklasse (HR 1; Spot-Nr. 5, 7, 9, 12, 14, 16 und 18) mit ausreichenden, absoluten TIC-Signalintensitäten (mindestens 2 x TIC-Intensität des *instrumental blanks*) gefunden werden.

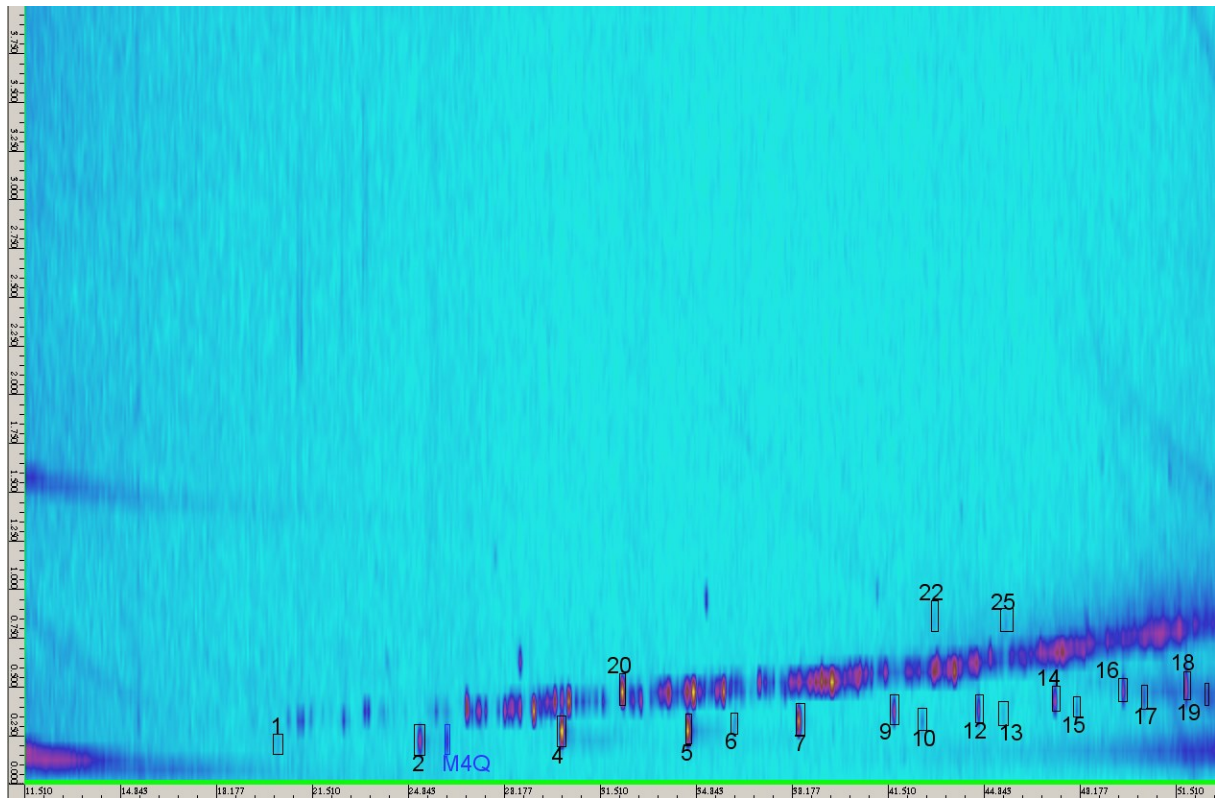


Abbildung 11: *Suspected-target* GCxGC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer Kapselgewebeprobe eines Implantatträgers (Farbskala von ca. $1,6$ bis $6,5 \times 10^5$ Counts). Das entsprechende SBI unbekanntes Herstellers wurde nach Explantation als defekt diagnostiziert.

Die Siloxan-basierten Verbindungen der mutmaßlichen homologen Reihe HR 2 (Spot-Nr. 10, 13, 15, 17 und 19) sind im Vergleich zu den zyklischen Siloxanen nicht in den beiden Blindproben, jedoch in den Dichlormethan-Extrakten der Gewebeproben des Patienten zu beobachten. Ein Vergleich der GCxGC-MS-Analyse der Kapselgewebeproben (mit Zweifachanalyse) von insgesamt zehn Patienten mit intakten SBI und von sieben Patienten mit defekten SBI (s. Tabelle 10) zeigt, dass in den Gewebeproben bei Patienten mit defekten Implantaten überwiegend zyklische Siloxane D4-D6 sowie weitere PDMS-basierte Verbindungen der mutmaßlichen homologen Reihen HR 1 (Spot-Nr. 5, 7, 9, 12, 14, 16 und 18), HR 2 (10, 13, 15, 17 und 19) und HR 3 (Spot-Nr. 25, 27) vorkommen. Insbesondere das zyklische Methylsiloxan D6 und das mutmaßliche Cycloheptasiloxan (D7, Spot-Nr. 5) wurden in fünf der insgesamt sieben Gewebeproben von Patienten mit defekten Implantaten gefunden. Eine Abhängigkeit der vermehrt auftretenden Siloxane von dem vorliegenden Implantat-Hersteller (Rofil, Polytech und unbekannt) konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 10: Auflistung der in den Kapselgewebe- und Blutproben von Patienten mit defekten und intakten SBI, sowie in der Blutprobe der Kontrollperson gefundenen möglichen SBI-Additive.

Wiederfindung in den Humanproben*						
Spot-Nr.	t _R (TIC) [min]	Kapselgewebeproben (n = 17)		Blutproben (n = 22)		Blutprobe Kontrolle (n = 1)
		intakt/bleeding (n = 10)	defekt (n = 7)	intakt/bleeding (n = 12)	defekt (n = 10)	
1 (D4)	20,247	2	2	x	2	x
2 (D5)	25,180	2	4	x	x	x
4 (D6)	30,048	2	5	x	7	x
5	34,448	2	5	x	3	x
7	38,315	x	3	x	1	x
9	41,649	x	3	x	x	x
12	44,582	x	2	x	x	x
14	47,250	x	2	x	x	x
16	49,584	x	1	x	x	x
18	51,784	x	2	x	x	x
10	42,648	x	1	x	x	x
13	45,448	x	1	x	x	x
15	48,048	x	1	x	x	x
17	50,317	x	1	x	x	x
19	52,517	x	2	x	x	x
25	45,523	x	1	x	x	x
27	48,323	x	2	x	x	x
20	32,184	x	x	x	x	1
22	43,057	1	3	1	2	1

* Aufgrund des Vorhandenseins von zyklischen Siloxanen im *instrumental blank* und der Substanzen mit den Spot-Nr. 20 und 22 im *procedural blank* wurde als Kriterium für die Wiederfindung dieser Substanzen in den Humanproben eine um den Faktor 2 erhöhte Signalintensität im TIC-Chromatogramm im Vergleich zu den Blindproben definiert.

Die Substanz mit der Spot-Nr. 20 und 22 konnte nicht nur in den Dichlormethan-Extrakten beider Humanproben, sondern auch in den *procedural blanks* (nicht in den *instrumental blanks*) und in den Blutproben der Kontrollperson analysiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass beide Substanzen (Spot-Nr. 20, 22) chemische Additive in Kunststoffgefäßen sein könnten. Im Gegensatz zum mutmaßlichen Alkan (Spot-Nr. 20), das in allen TIC-Chromatogrammen nach erfolgter GCxGC-Analyse vergleichbare Signalintensitäten aufwies, konnte die Substanz mit der Spot-Nr. 22 nur in wenigen Kapselgewebe- und Blutproben (n = 3 bzw. 2) von Patienten mit defekten Implantaten detektiert werden. Eine Übereinstimmung zwischen dem Auftreten im Kapselgewebe sowie im Vollblut desselben Patienten wurde nicht beobachtet. Sowohl die beiden zyklischen Methylsiloxane D4 und D6 sowie das mutmaßliche Cycloheptasiloxan (D7, Spot-Nr. 5) wurden mit um den Faktor 2 erhöhten TIC-

Signalintensitäten nur in den Blutproben von Patienten mit defekten SBI verschiedener Hersteller, jedoch nicht in den Blutproben der Patienten mit intakten SBI bzw. der Kontrollperson analysiert. Diese Verbindungen (D4, D6 und mutmaßlich D7) könnten folglich als mögliche Marker-Substanzen für die Identifizierung defekter SBI im Vollblut von Patienten verwendet werden.

Eine interne cVMS-Exposition durch SBI und anschließende Wiederfindung in Humanproben von Implantatträgern wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Eine erste qualitative GC-MS-Analyse unterschiedlicher Gewebeproben von SBI-Trägerinnen wurde bereits von FLASSBECK et al. im Jahr 2003 [7] durchgeführt. Nach n-Hexan Extraktion von Fett- und Kapselgewebeproben von Patienten mit intakten und bleeding-SBI wurden die zyklischen Siloxane D4, D5 und D6 in den Extrakten eindeutig identifiziert. Zusätzlich wurden weitere Substanzen (u. a. D7 mit einer Übereinstimmung von 80 %) mit entsprechenden EI-MS-Spektren mit typischen Siloxan-Fragmenten (m/z 73, 147, 221, 281, 355, 429 und 503) gefunden. Die gleichzeitig durchgeführte Analyse der Vollblut- und Plasma-proben derselben Patienten zeigte ein vermehrtes Austreten der kleineren Siloxan-Homologen, D3 und D4 [98]. Eine Korrelation zwischen der Analyse zyklischer Siloxane und dem intraoperativen Implantat-Status wurde von FLASSBECK et al. [7] im Vergleich zu den vorliegenden GCxGC-MS-Analysen der Blut- und Kapselgewebeproben nicht beobachtet. Die Diffusion und Akkumulation von Poly(dimethylsiloxan)-Verbindungen in das um das Implantat liegende Gewebe untersuchten BERETTA et al. [73] über die Analyse von periprothetischer Flüssigkeit mittels ATR-FT-IR-Spektroskopie und GC-MS. Hierbei konnte diese Arbeitsgruppe in der außerhalb der Bindegewebekapsel entnommenen viskosen Emulsion zyklische (D4-D9) und ein lineares Methylsiloxan (L8) analysieren und eindeutig als chemische Markersubstanzen für die Migration von Silikonen durch die SBI-Hülle und anschließende Bindegewebekapsel identifizieren [73].

5.1.3 *Non-target*-Analytik von Vollblutproben von Frauen mit defekten und intakten Implantaten

Um mögliche unbekannte, bisher nicht bekannte Marker-Substanzen für die Erkennung von defekten SBI im Vollblut von Implantatträgern zu identifizieren, wurde zusätzlich eine sogenannte *non-target*-Analyse mittels GCxGC-MS durchgeführt. Hierfür wurden die Vollblutproben von insgesamt 26 Patienten und einer Kontrollperson mit Dichlormethan extrahiert und mittels GCxGC-MS analysiert. Anschließend wurden die erhaltenen Konturplots der Vollblutproben von Frauen mit defekten SBI ($n = 12$) den Konturplots der Frauen mit intakten bzw. bleeding-Implantaten ($n = 14$) sowie der Kontrollperson und den Blindproben (*procedural* und *instrumental blanks*) gegenübergestellt und auf auffällige Substanzen hin untersucht. In Abbildung 12 ist der Konturplot einer GCxGC-MS-Analyse eines Vollblut-Dichlormethan-Extraktes eines Patienten mit einem defekten Rofil-Implantat dargestellt.

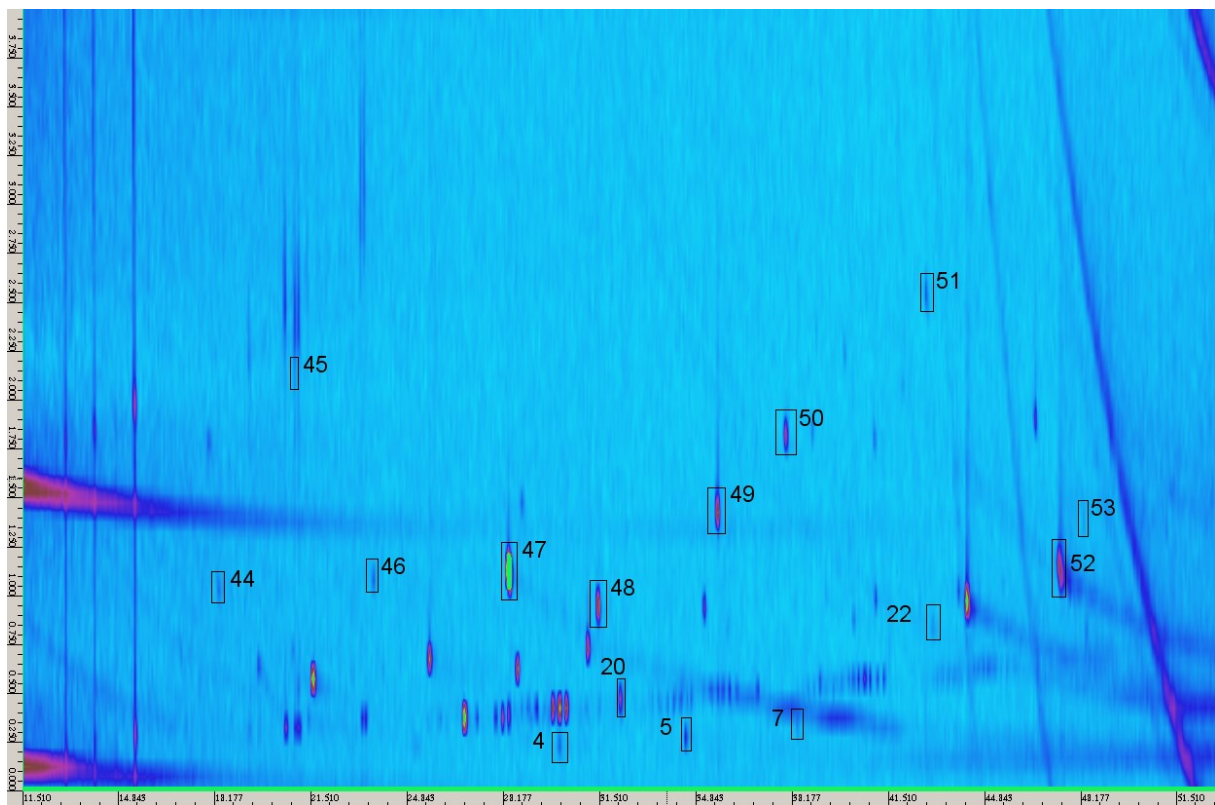


Abbildung 12: *Non-target* GCxGC-MS-Analyse eines Vollblut-Dichlormethan-Extraktes eines Implantatträgers (Farbskala von ca. $1,1$ bis $6,5 \times 10^5$ Counts). Das rechte SBI des Herstellers Rofil wurde nach Explantation als defekt diagnostiziert.

Neben den zyklischen Methylsiloxanen, D6 und mutmaßlich D7 bzw. D8 (Spot-Nr. 5, 7), konnten weitere auffällige Substanzen - die in den Blindproben nicht auftreten - gefunden

werden (Spot 44-53; Ausnahme Spot-Nr. 20, 22 vgl. Kap. 5.1.2). Nach Subtraktion des Signal-Hintergrundes bei dem Modulationspeak mit der höchsten Intensität in den TIC-Chromatogrammen und nach Abgleich der zu diesen Retentionszeiten vorliegenden EI-Massenspektren mit den beiden Standard Referenz-Datenbanken NIST und Wiley ist davon auszugehen, dass im Vollblut dieses Patienten u. a. das Narkotikum Propofol sowie Coffein, n-Butylbenzol, Alkane, Ketone und zwei Schwefel-Verbindungen vorliegen können (s. Tabelle 11). Das Stimulanz Coffein, n-Butylbenzol und 2-Methylthiobenzothiazol wurden eindeutig durch den Vergleich mit analytischen Standards identifiziert.

Tabelle 11: Auflistung der im Vollblut-Extrakt eines Patienten mit defektem Rofil-SBI vorkommenden möglichen Substanzen.

Spot	¹ t _R [min]	² t _R [s]	t _R (TIC) [min]	Vorschlag aus der Datenbank (NIST, Wiley)	Übereinstimmung [%]
44	18,310	1,00	18,327	Dimethylsulfon	74-83
45	20,910	2,00	20,943	Dimethyloctan- bzw. nonan	80-88
46	23,643	1,05	23,661	n-Butylbenzol ^a	74-86
47	28,310	1,10	28,394	Cyclohexylisothiocyanat	90-95
48	31,443	0,90	31,458	Propofol	86-89
49	35,577	1,40	35,599	Cycluron	85-88
50	37,910	1,80	38,006	2-Methylthiobenzothiazol ^a	74-85
51	42,843	2,50	42,885	Coffein ^a	84-88
52	47,443	1,10	47,461	Cyclopentadecanon	75
53	48,243	1,35	48,288	Dodecanamid	75

a: Durch den Vergleich mit analytischen Standards eindeutig identifiziert

Ein Vergleich mit den GCxGC-MS-Analysen weiterer Vollblut-Dichlormethan-Extrakte von Implantatträgern sowohl mit intakten (n = 14) als auch mit defekten (n = 12) SBI zeigt, dass keine dieser möglichen Substanzen ausschließlich im Vollblut von Patienten mit defekten SBI zu finden sind. Werden die Vollblutproben nach mehrmonatiger Lagerung in den Citrat-Monovetten mit Dichlormethan extrahiert und erneut mittels GCxGC-MS analysiert, so kann eine Zunahme der Signalintensitäten für die Spots 47 und 50 beobachtet werden. Dies spricht für eine Alterung der Probe in der Monovette bzw. eine zunehmende Kontamination der Blutproben durch die Lagerung in der Monovette. Die auftretenden Verbindungsklassen der Isothiocyanate und der Benzothiazole werden nicht nur als Härtungsbeschleuniger in der Kautschuk-Industrie [316], sondern auch bei der Verarbeitung bzw. Herstellung von Klebstoffen, Harzen und Elastomeren sowie bei Oberflächenbeschichtungen eingesetzt [317]. Neben n-Butylbenzol konnten zusätzlich die höheren Homologen der Alkylbenzole bis n-

Decylbenzol in einigen Dichlormethan-Extrakten von Patienten mit defekten ($n = 3$, für Spot 46) und intakten Implantaten ($n = 7$, für Spot 46) unterschiedlicher Hersteller analysiert und durch die GCxGC-MS-Analyse von Standard-Substanzen eindeutig identifiziert werden. Eine Korrelation zwischen den SBI-Herstellern, den verwendeten Citrat-Monovetten oder dem Lagerzeitraum konnte nicht beobachtet werden. Zudem konnte das kleinste Homologe dieser Verbindungsklasse (Spot 46) auch in einer zwei Monate alten Vollblutprobe der Kontrollperson analysiert werden. Neben der Alterung bzw. der damit einhergehenden Kontamination der Probe durch die Kunststoff-Monovette kommt erschwerend die Frage der vorliegenden Konzentration möglicher mit Dichlormethan extrahierbarer Marker-Substanzen im Blut hinzu. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 70 kg und einem Blutvolumen von ca. 5 Liter [318] resultiert für das Narkotikum Propofol - bei einem Richtwert zur Narkoseeinleitung von 2-3 mg Propofol/kg Körpergewicht [319, 320] - eine Konzentration zwischen 30 und 40 mg/L Blut. Basierend auf diesem theoretischen Konzentrationsbereich im Blut könnten bei einem durchschnittlichen Signal-zu-Rauschverhältnissen (engl. *signal-to-noise*, S/N) des Spots 48 (mutmaßlich Propofol) zwischen 3-20 in den gemessenen TIC-Chromatogrammen und unter der Annahme vergleichbarer Extraktions- und Ionisationskoeffizienten Konzentrationen möglicher Markersubstanzen im Blut im $\mu\text{g/L}$ - bis mg/L -Bereich abgeleitet werden. Werden diese theoretisch ermittelten Konzentrationen mit anderen bioakkumulativen Substanzen und deren Metaboliten verglichen, wird deutlich dass die Sensitivität der Methode gesteigert werden sollte. WITTSIEPE et al. beispielsweise untersuchten die Kontamination von Frauen, die in einer Region mit industriellem Einfluss leben, und konnten Konzentrationen chlororganischer Pestizide und deren Metabolite im Bereich von 0,036-0,53 ng/L Blut [321] ermitteln.

Ein weiterführender Ansatz zur Analyse von Blutproben von Implantatträgern erfolgte in Anlehnung an VARAPRATH et al. [177, 294], die Urinproben von Ratten nach erfolgter D4-Exposition mittels HPLC gekoppelt mit einer radiometrischen Detektionseinheit sowie GC-MS analysierten. Nach dem Ansäuern der Probe mit Salzsäure, Extraktion mit Tetrahydrofuran und Derivatisierung mit N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) identifizierte diese Arbeitsgruppe zwei Haupt- (u. a. Dimethylsilandiol) und fünf Nebenprodukte (u. a. Dimer- und Trimerdiol) als D4-Metabolite im Urin (vgl. Kap. 2.2.2). Abweichend von dieser Probenvorbereitung [177, 294] wurde, um Kontaminationen zu vermeiden, im Kontext der vorliegenden Untersuchung das Extraktionsmittel Tetrahydrofuran durch Acetonitril ersetzt und zusätzlich nach Silylierung überschüssiges BSTFA mit Methanol deaktiviert. Die Identifizierung der silylierten Silandiole nach erfolgter GCxGC-

MS-Analyse wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten und EI-Massenspektren mit analytischen Standards der linearen Methylsiloxane (L3-L5) vorgenommen. Hierbei wurden die Plasmaproben der Kontrollperson jeweils mit zwei unterschiedlichen Silandiol-Konzentrationen auf eine Endkonzentrationen von 37,5 und 375 µg/L Plasma aufgestockt. Im Vergleich zu den aufgestockten Blutplasmaproben der Kontrollperson, in denen lineare Siloxane eindeutig im resultierenden Konturplot nach erfolgter GCxGC-MS-Analyse identifiziert werden konnten (s. Anhang Abbildung 36), wurden in den Plasmaproben der Patienten mit defekten und intakten SBI keine linearen Methylsiloxane detektiert. Da keine weiteren signifikanten Substanzen gefunden und zusätzlich in den aufgestockten Plasmaproben nur Silandiol-Konzentrationen oberhalb von ca. 40 µg Silandiole/L Plasma detektiert werden konnten, wurde dieser Ansatz zur Identifizierung weiterer Marker-Substanzen verworfen.

Im Gegensatz zu der *suspected-target*-Analytik mittels GCxGC-MS, bei der die zyklischen Methylsiloxane D4 und D6 eindeutig sowie wahrscheinlich D7 (Spot-Nr. 5) als signifikante Substanzen im Vollblut von Frauen mit defekten SBI identifiziert wurden, konnten bei beiden Ansätzen der *non-target*-Analytik keine auffälligen Substanzen detektiert werden. Aufgrund dessen lag für die Entwicklung einer nicht-invasiven, alternativen Diagnostikmethode von defekten Silikonbrustimplantaten der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der sensitiven GC-MS-Analyse zyklischer Methylsiloxane in Vollblut und Kapselgewebeproben von Implantatträgern.

5.2 Methodenentwicklung zur quantitativen Methylsiloxan-Analytik in Humanproben

Die Entwicklung einer sensitiven GC-MS basierten Methode zur quantitativen Analyse niedermolekularer zyklischer Methylsiloxane D3-D6 in Kapselgewebe- und Vollblutproben von Implantatträgern erfolgte zu Beginn der experimentellen Arbeit in Anlehnung an die von FLASSBECK et al. publizierte Methode [7, 98]. Dazu wurden die Extrakte nach Extraktion der Gewebe-, Plasma- bzw. Vollblutproben mit n-Hexan und Zentrifugation analysiert. Die chromatographische Trennung und anschließende massenspektrometrische Detektion der zyklischen Siloxane erfolgte hierbei nach splitloser Injektion eines Mikroliters n-Hexan-Extraktes bei 200 °C mit einer Poly(5%-diphenyl-95%-dimethylsiloxan)-Trennsäule, einer Ofentemperatur von 40 °C mit anschließenden Temperaturgradienten bis 320 °C. Die Nachweisgrenzen wurden mit 2 µg D3-D6/L Plasma bzw. Blut bestimmt.

Im Vorfeld der Untersuchungen wurde bereits n-Hexan als Lösungs- und Extraktionsmittel aufgrund der höheren Kontamination an Analyten ausgeschlossen und durch Dichlormethan ersetzt (vgl. Kap. 4.2). Im ersten Schritt der Methodenentwicklung erfolgte die Steigerung der Sensitivität (Herabsenken der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen) der splitlosen, konventionellen gaschromatographischen Analyse durch Optimierung des Injektionssystems und Reduktion des Siloxan-Untergrundes. Im zweiten Schritt wurde neben der splitlosen-GC-MS-Methode (nachfolgend als M1 bezeichnet) eine alternative GC-MS-Methode, unter Anwendung der *large volume*-Injektionstechnik (LVI-GC-MS, nachfolgend als M2 bezeichnet), optimiert. Allgemein erfolgte die Optimierung des GC-Systems durch Injektion von Siloxan-Standardlösungen in Dichlormethan und innerhalb der in Kap. 4.7.1.1 gesondert aufgeführten Wertebereiche der jeweiligen Parameter. Im dritten Schritt wurde die Probenvorbereitung der Humanproben anhand des aufgestockten Vollblutes der Kontrollperson und einer aufgestockten Gewebe-Vergleichsmatrix hinsichtlich der Wiederfindungsraten optimiert.

5.2.1 Sensitivitätssteigerung der splitlosen GC-MS-Methode

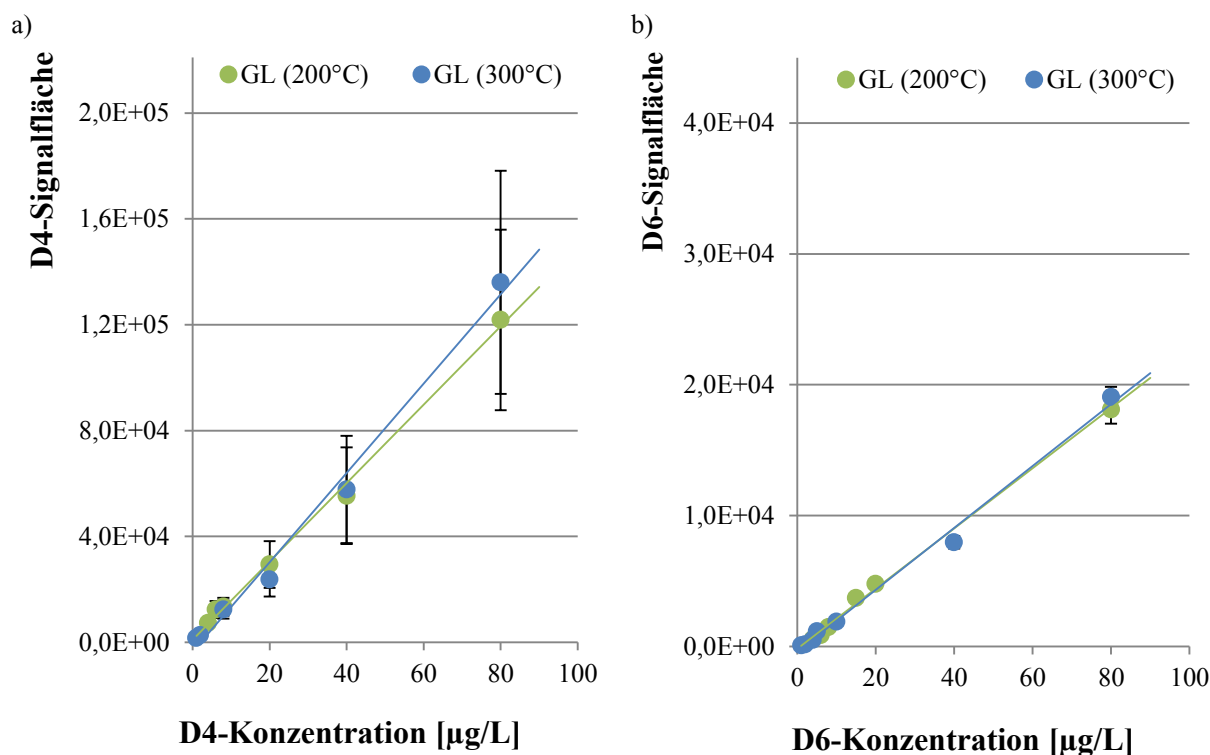
Aufgrund der Omnipräsenz zyklischer Siloxane in der Umwelt und der damit verbundenen Kontaminationsgefahr dieser Verbindungen, wurde die GC-MS-Analyse in Bezug auf die Nachweisstärke zu Beginn der Untersuchungen optimiert. Allgemein kann die Sensitivität bei der gaschromatographischen Analyse u. a. über die Injektionsbedingungen, kurz die Überführung einer flüssigen Probe in die Gasphase, erfolgen. Speziell in Bezug auf die Analytik niedermolekularer Silikone kann der Untergrund durch den Einsatz von *low-bleeding* Trennsäulen und Septen [176, 208, 322] bzw. eines septumfreien Aufgabekopfes²⁸ oder eines Merlin Microseal™ Septums [178, 252] minimiert und damit eine Sensitivitätssteigerung erzielt werden.

5.2.1.1 Einfluss des Injektionssystems und der Raumluft

Um eine optimale Verdampfung der flüssigen Probe in dem beheizten Injektor und damit eine vollständige Überführung der zyklischen Siloxane D3-D6 auf die Trennsäule zu erzielen, wurden die Injektortemperatur (200 °C bzw. 300 °C) und das Glasverdampferrohr (im Folgenden als Liner bezeichnet) variiert. Der Einsatz eines mit silanisierter, deaktivierter Glaswolle gepackten Glasliners wurde bereits in Vorversuchen aufgrund erhöhter Siloxan-Kontamination verworfen. Anhand einer Dreifachbestimmung von Siloxan-Standardlösungen

²⁸ Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit von der Firma Gerstel, Mühlheim, verwendet.

in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 80 μg D3-D6/L Dichlormethan (1, 5, 10, 15, 17,5, 20, 40, und 80 $\mu\text{g/L}$) bei splitloser Injektion wurde der Einfluss der Injektortemperatur auf die Sensitivität der GC-MS-Analyse untersucht. Die resultierenden Kalibrationsgeraden mit jeweils einem Bestimmtheitsmaß $> 0,99$ (bei $m = 6$ bzw. 8 und $n = 3$) sind exemplarisch für die beiden Siloxane D4 und D6 in Abbildung 13 a und 13 b dargestellt (D3, D5 s. Anhang Abbildung 37). Bei Injektion einer 80 $\mu\text{g/L}$ D3-D6-Standardlösung resultiert - unter Verwendung eines einfachen Glasliners (GL) - bei Erhöhung der Injektortemperatur von 200 °C auf 300 °C eine Zunahme der Signalflächen der Siloxane für D3 um 21 %, für D4 um 12 %, für D6 um 5 %. Im Vergleich dazu zeigte das Homologe D5 eine Abnahme der Signalflächen um 9 %.



GL (200 °C): $R^2 = 0,9983$ (RSD 18-33 %)

GL (300 °C): $R^2 = 0,9906$ (RSD 19-35 %)

GL (200 °C): $R^2 = 0,9977$ (RSD 5-7 %)

GL (300 °C): $R^2 = 0,9942$ (RSD 4-9 %)

Abbildung 13: Auftragung der D4 (a)- und D6 (b)-Signalflächen gegen die Konzentration nach GC-MS-Analyse (M1) bei Variation der Injektortemperatur.

Die Einzelmessungen der Siloxan-Standardlösungen zeigten insbesondere für die zyklischen Siloxane D3-D5 erhöhte relative Standardabweichungen (RSD) der erhaltenen Signalfläche zwischen 18-36 %. Hingegen wurden für den internen Standard (M4Q) und für das Homologe D6 RSD kleiner 5 % bzw. RSD zwischen 4-9 % ermittelt. Eine steigende Sensitivität anhand

der über das Kalibriergeradenverfahren nach DIN 32645 [296] ermittelten Bestimmungsgrenzen (s. Anhang Tabelle 18) konnte lediglich für das zyklische Siloxan D6 mit einem Faktor 4 (5 µg/L bei 300 °C bzw. 19 µg/L bei 200 °C) erzielt werden. Für die kleineren Siloxan-Homologen D3-D5 resultieren vergleichbare (D3: 10-11 µg/L), geringere (D4: 13 µg/L bei 300 °C bzw. 20 µg/L bei 200 °C) bzw. höhere (D5: 21 µg/L bei 300 °C bzw. 13 µg/L bei 200 °C) Bestimmungsgrenzen. Neben der starken Streuung der Signalfäche bei Injektion des Siloxan-Standards derselben Konzentration konnten analog starke Fluktuationen der einzelnen D3-D5-Siloxane im *instrumental blank* über mehrere Messungen hinweg beobachtet werden (s. Anhang Abbildung 38a). Mit relativen Standardabweichungen innerhalb eines Tages bis zu 45 % (insbesondere für D5) war folglich eine Erfassung der Blindwerte, auch wenn Blindproben und Siloxan-Standardlösung alternierend gemessen wurden, nur bedingt möglich. Zufällige Fehler bei der Injektion können aufgrund der konstanten Signalintensitäten des internen Standards ($RSD \leq 5\%$) wie auch des zyklischen Siloxans D6 ($RSD < 9\%$) ausgeschlossen werden. Durch die mehrfache GC-MS-Analyse von jeweils einem Mikroliter Raumluft konnte diese als Kontaminationsquelle des Injektionsystems identifiziert werden. Eine Minimierung der Signalfluktuationen im *instrumental blank* mit relativen Standardabweichungen kleiner 10 % (s. Anhang Abbildung 38b), wurde durch den Bau eines Stahlkastens realisiert, der den Injektor-Einlass umgibt und vor der Injektion ca. zwei Minuten mit dem Inertgas Argon gespült wurde (nachfolgend als Argon-Haus bezeichnet, s. Abbildung 14).

Die Problematik kontaminierter Raumluft bei der Analyse zyklischer Siloxane wurde bereits in der einschlägigen Literatur diskutiert [188, 252]. Um Kontaminationen während der Probenvorbereitung und der Analyse zu minimieren, kamen u. a. Laminar Flow Boxen [192, 259], Reinraumwerkbänke mit Aktivkohlefilter [255] oder selbst gebaute Purge-und-Trap-Systeme [187] zum Einsatz. Als Hauptkontaminationsquellen der Laborluft und allgemein der Innenraumluft werden insbesondere Körperpflegeprodukte, wie Hautcremes, Deodorants und Kosmetika genannt [188, 206, 223, 323].

Dabei wurde das zyklische D5, das in Körperpflegeprodukte Konzentrationen bis 82 mg/g aufweisen kann [48, 176] als dominierendes Siloxan identifiziert. Bei Gesamtkonzentrationen flüchtiger Methylsiloxane (linear und zyklisch) zwischen 10-350 µg/m³ wurde ein D5-Anteil von bis zu 50 % in der Raumluft italienischer und englischer Haushalte, Supermärkte, Kindergärten etc. analysiert [206].

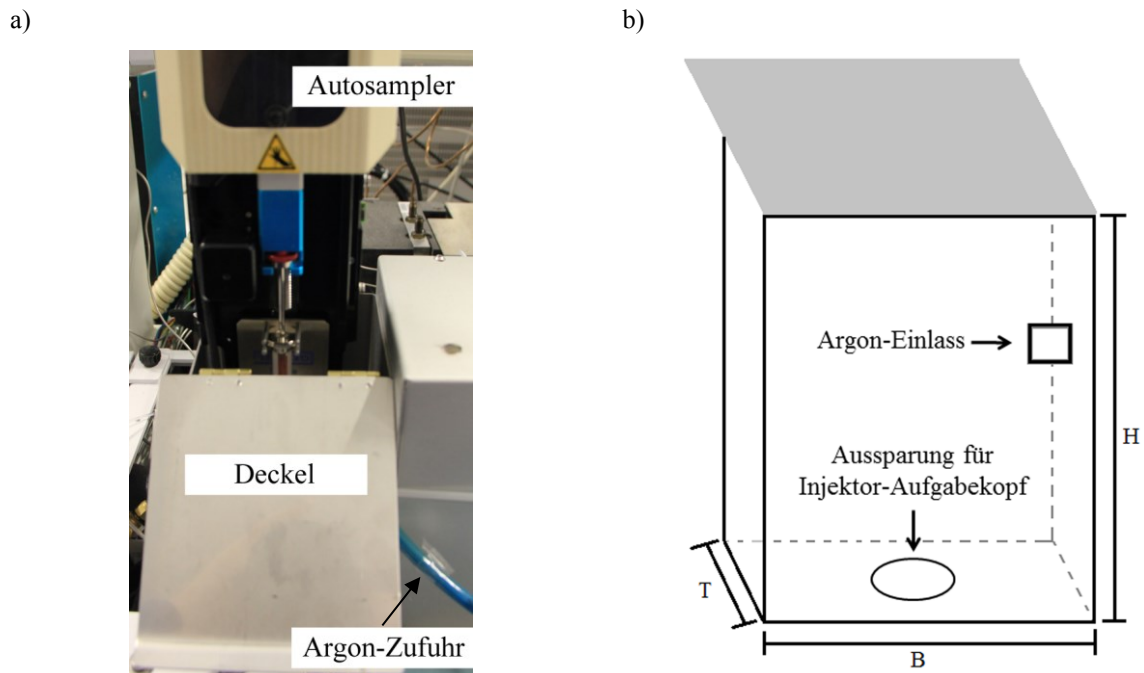


Abbildung 14: a) Offenes Argon-Haus während der Injektion (mit nach vorne aufgeklapptem Deckel und einer blauen Gasleitung für die Argon-Zufuhr), b) schematische Darstellung des Argon-Hauses (mit Deckel in grau und Aussparung am Boden für den Aufgabekopf des Injektors; Abmessungen: Höhe H 10 cm x Breite B 8 cm x Tiefe T 8 cm).

Bei Einsatz des Argon-Hauses und Austausch des einfachen Glasliners durch einen für hohe Temperaturen geeigneten, Siltek-beschichteten Glasliner mit Verwirbelungseinstichen wurde die splitlose GC-MS-Methode validiert. Hierzu wurden Linearität, Wiederholbarkeit an einem und an verschiedenen Tagen, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze ermittelt (s. Tabelle 12; Bestimmung der Wiederfindungsraten vgl. Kap. 5.2.3). Die Linearität wurde über eine wiederholte GC-MS-Analyse ($n = 2$) von Kalibrierlösungen mit 2-1000 μg D3-D6/L Dichlormethan (2, 10, 50, 250 und 1000 $\mu\text{g/L}$) mit einem Bestimmtheitsmaß $> 0,99$ zweifach bestimmt. Die Wiederholbarkeit der Siloxan-Messungen wurde durch dreifache Analyse einer 15 μg D3-D6/L-Standardlösung in Dichlormethan an einem Tag mit einer relativen Standardabweichung der Signalflächen zwischen 2-10 % ermittelt ($M4Q < 5\%$). Für die Wiederholbarkeit zwischen den Tagen resultiert eine RSD der Siloxan-Signalflächen im erhaltenen EIC-Chromatogramm zwischen 3-15 % bei einer relativen Abweichung des internen Standards von $< 7\%$. Die analytischen Grenzen wurden durch Analyse einer 10-Punkt-Kalibrationsreihe zwischen 0,5 und 20 μg D3-D6/L (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 und 20 $\mu\text{g/L}$) nach DIN 32645 [296] mit der Kalibriergeradenmethode bestimmt. Nach Eliminierung der beiden kleinsten Konzentrationen aus den Kalibrationsgeraden (0,5 und 1 μg D3-D6/L) wurden Nachweisgrenzen zwischen 1,0-2,3 μg D3-D6/L und Bestimmungsgrenzen zwischen 2,6-4,8 μg D3-D6/L ermittelt.

Tabelle 12: Validierungsergebnisse der splitlosen GC-MS-Methode (M1) zur Bestimmung von D3-D6 in Dichlormethan.

	D3	D4	D5	D6
Linearität R ²	0,9994	0,9991	0,9992	0,9998
Wiederholbarkeit RSD [%] an einem Tag	4-9	3-8	5-10	2-7
Wiederholbarkeit RSD [%] zwischen den Tagen	5-11	6-13	8-15	3-8
Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]*	2,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$]*	4,1 \pm 0,3	4,8 \pm 0,4	4,7 \pm 0,3	2,6 \pm 0,1

* Die angegebenen Vertrauensbereiche von LOD und LOQ in $\mu\text{g/L}$ wurden mit $\alpha = \beta = 0,05$; $n = 2$ berechnet.

Durch Erhöhung der Injektortemperatur und Einsatz des Argon-Hauses konnte somit eine Steigerung der Sensitivität der GC-MS-Analyse um den Faktor 2-4 erreicht werden. Vergleichbare Bestimmungsgrenzen zwischen 2-4 $\mu\text{g/L}$ wurden von SÁNCHEZ-BRUNETE et al. [257] für die zyklischen Methylsiloxane D4-D6 in n-Hexan ermittelt.

5.2.1.2 Einfluss der stationären Phase

Neben der Kontamination des Injektionssystems durch die Raumluft, die zu einem erhöhten Blindwert führt, werden zyklische Siloxane, bevorzugt D3 und D4, bei thermischem und/oder oxidativem Stress der Polydimethylsiloxan-basierten Trennsäule kontinuierlich generiert. Dieses sogenannte Säulenbluten hat einen stetigen Anstieg der Basislinie im TIC-Chromatogramm (insbesondere m/z 207 und 281) zur Folge [178, 324]. In der GC-MS basierten Analytik niedermolekularer Silikone finden hauptsächlich unpolare PDMS-Trennsäulen mit zusätzlichen Phenylgruppen im PDMS-Gerüst ihre Anwendung [98, 176, 220, 257, 260, 323]. Aufgrund des gezielten Einbaus von Phenylgruppen kommt es zu einer Verstärkung der stationären Phase, die bei thermischer Belastung ein geringeres Säulenbluten generiert [325]. Einige wenige Arbeitsgruppen verwendeten für die chromatographische Trennung zyklischer Siloxane polare Polyethylenglycol-basierte Trennsäulen [188, 208, 261]. Ein Nachteil dieser PEG-Trennsäulen ist die thermische Instabilität, die die maximale Temperatur auf 280 °C limitiert. Um den Einfluss der stationären Phase auf die Sensitivität der Siloxan-Analyse zu untersuchen, wurden fünf Trennsäulen der Hersteller Restek, Macherey-Nagel und Sigma Aldrich gleicher Länge (30 m) und unterschiedlicher Filmdicke (0,1-0,25 μm) verglichen. Basierend auf verschiedenen Modifizierungen des PDMS-Gerüsts mit Di(dimethylsiloxy)phenylene-, Diphenyl-polysilphenylen- und Cyanopropyl-Gruppen (s. Anhang Abbildung 39a-c) unterscheiden sich diese Trennsäulen in ihrer Polarität (unpolar: Rxi 5Sil-MS, Optima PXLB; mittelpolar: Rtx 1701). Zusätzlich wurde eine polare, bis 300 °C

stabile Säule mit einer ionischen Flüssigkeit als stationäre Phase eingesetzt (SLB-IL60; s. Anhang Abbildung 39d). Der Vergleich dieser Trennsäulen erfolgte anhand der Trenneffizienz (Bodenhöhe H [mm]), des Säulenblutens bei 275 °C bzw. 300 °C, des *Tailing*-Faktors und anhand der ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der Kalibriergeradenmethode. Die Trennleistung eines chromatographischen Systems wird durch die theoretische Bodenzahl N beschrieben. Wie bei der Rektifikation beschreibt ein theoretischer Boden einen Bereich der Trennsäule, in dem sich ein Konzentrationsgleichgewicht des Analyten zwischen den beiden Phasen (mobile und stationäre Phase) einstellt. Dabei ist die effektive Bodenzahl N_{eff} proportional zu dem Verhältnis der Netto-Retentionszeit²⁹ t_{R}' zu der Peakbreite in halber Höhe $w_{b0,5}$ (s. Gleichung 4) bzw. proportional zu dem Verhältnis der Säulenlänge L zu der Bodenhöhe H (s. Gleichung 5) [262].

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \times \left(\frac{t_{\text{R}}'}{w_{b0,5}} \right)^2 \quad (4) \quad N_{\text{eff}} = \frac{L}{H} \quad (5) \quad t_0 = \frac{(t_{\text{R}1} \times t_{\text{R}3}) - (t_{\text{R}2})^2}{t_{\text{R}1} + t_{\text{R}3} - (2 \times t_{\text{R}2})} \quad (6)$$

Experimentell wurde die Bodenhöhe durch Dreifachmessung einer 1 mg/L n-Alkan-Standardlösung in Dichlormethan (C_n mit $n = 7-12$) mittels GC-MS unter isothermen Bedingungen (GC-Ofentemperatur 40 °C) und konstanter Flussrate der mobilen Phase (1 mL/min) bestimmt. Unter Anwendung der Tudler-Franke-de-Zeeuw-Gleichung (s. Gleichung 6) [326] erfolgte zunächst die Berechnung der Totzeit t_0 und anschließend die Ermittlung von N_{eff} und H bei gleicher Säulenlänge (30 m) der zu vergleichenden Trennsäulen. Bezogen auf das n-Alkan Nonan (C_9) weist insbesondere die mittelpolare Cyanoisopropyl-Phase Rtx 1701 die geringste Bodenhöhe und folglich die beste Trenn-effizienz auf (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich unterschiedlicher Trennsäulen.

	Rxi 5Sil (0,25 µm)	Rxi 5Sil (0,10 µm)	Optima PXLB	Rtx 1701	SLB-IL 60
Bodenhöhe (n-Nonan) [mm]	0,7	0,9	13,2	0,6	3,7
Säulenbluten (m/z 207)	39	23	4	87	2
<i>Tailing</i> -Faktor (D3-D6)	0,9-2,0	1,0-2,2	1,1-2,0	1,1-2,1	1,1-1,5
Wiederholbarkeit RSD [%] an einem Tag	1-10	7-19	1-5	5-10	2-14
Nachweisgrenzen [µg/L]	0,9-2,5	0,6-2,4	0,7-0,9	0,5-1,9	0,5-1,5
Bestimmungsgrenzen [µg/L]	2,5-5,6	1,9-6,0	1,9-3,0	1,6-5,8	1,6-4,8

²⁹ korrigierte Retentionszeit des Analyten im Chromatogramm um die Totzeit des Systems, mit $t_{\text{R}}' = t_{\text{R}} - t_0$ [262]

Der Grad des Säulenblutens wurde über das S/N-Verhältnis anhand der Signalintensität des zyklischen Siloxans D3 (m/z 207) bei Ofentemperaturen von 40 °C bzw. 300 °C bzw. 275 °C bestimmt. Insbesondere für die ionische Säule sowie für die Optima PXLB-Trennsäule, die zusätzlich zu den Phenylringen in dem PDMS-Grundgerüst (analog Rxi 5Sil-MS) Phenylgruppen in der Seitenkette aufweist, konnte ein geringes Säulenbluten mit einem Faktor 2-4 gegenüber den Rxi/Rtx-Säulen (Faktoren zwischen 23-87) beobachtet werden. Neben dem positiven Einfluss von Phenylgruppen im Grundgerüst resultiert hieraus auch eine Minderung des Säulenblutens um den Faktor 2 bei Vorlage einer kleineren Filmdicke mit 0,10 μm gegenüber 0,25 μm bei gleicher Modifizierung der stationären Phase (Rxi 5Sil-MS). Ein Vergleich der Trennsäulen in Bezug auf die Analyse zyklischer Methylsiloxane erfolgte nach Optimierung des Temperaturprogrammes für jede einzelne Säule. Dabei konnte keine Retention des zyklischen Siloxans D3 auf der ionischen, polaren Trennsäule erzielt werden, wodurch eine GC-MS-Analyse von D3 mit dieser Säule nicht möglich war. Die Wiederholbarkeit der Siloxan-Messungen wurde durch dreifache Analyse einer 10 μg D3-D6/L-Standardlösung in Dichlormethan an einem Tag mit einer relativen Standardabweichung der Signalflächen im EIC-Chromatogramm zwischen 1-19 % bestimmt ($M4Q < 5\%$). Besonders für die Optima PXLB-Säule resultieren sehr kleine RSD mit 1-5 %. Ein Maß für die Peakasymmetrie ist der *Tailing*-Faktor, der die Abweichung von der idealen Gaußkurve bei Vorlage eines steileren Peakanstiegs als Peakabfalls beschreibt und von der IUPAC³⁰ als das Verhältnis zwischen den Peakbreiten hinter und vor dem Lot vom Peakmaximum in 10 % der Peakhöhe angegeben wird [327]. In der vorliegenden Untersuchung wurden *Tailing*-Faktoren zwischen 0,9-1,1 (symmetrische Peakform) und 1,2-2,2 (*Peak-Tailing*) nach mehrfacher GC-MS-Analyse eines 10 μg D3-D6/L Siloxan-Standards ($n = 3$) berechnet (s. Tabelle 13 und Anhang Tabelle 19). Speziell die unpolaren Trennsäulen weisen für das Siloxane D3 bzw. D6 *Tailing*-Faktoren größer 1,3 auf (z. B. Optima PXLB). Hingegen konnte ein *Tailing* für die Siloxane D4 und D5 im EIC-Chromatogramm bei der Verwendung der polareren Trennsäulen (z. B. SLB-IL 60) beobachtet werden (s. Abbildung 15).

Die analytischen Kennzahlen wurden durch mehrfache Analyse einer 8-Punkt-Kalibrationsreihe zwischen 1,0 und 12,5 μg D3-D6/L (1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10 und 12,5 $\mu\text{g/L}$) nach DIN 32645 [15] mit der Kalibriergeradenmethode bestimmt. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden in Konzentrationsbereichen zwischen 0,5-2,5 μg D3-D6/L und 1,6-6,0 μg D3-D6/L ermittelt (s. Tabelle 13).

³⁰ Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC)

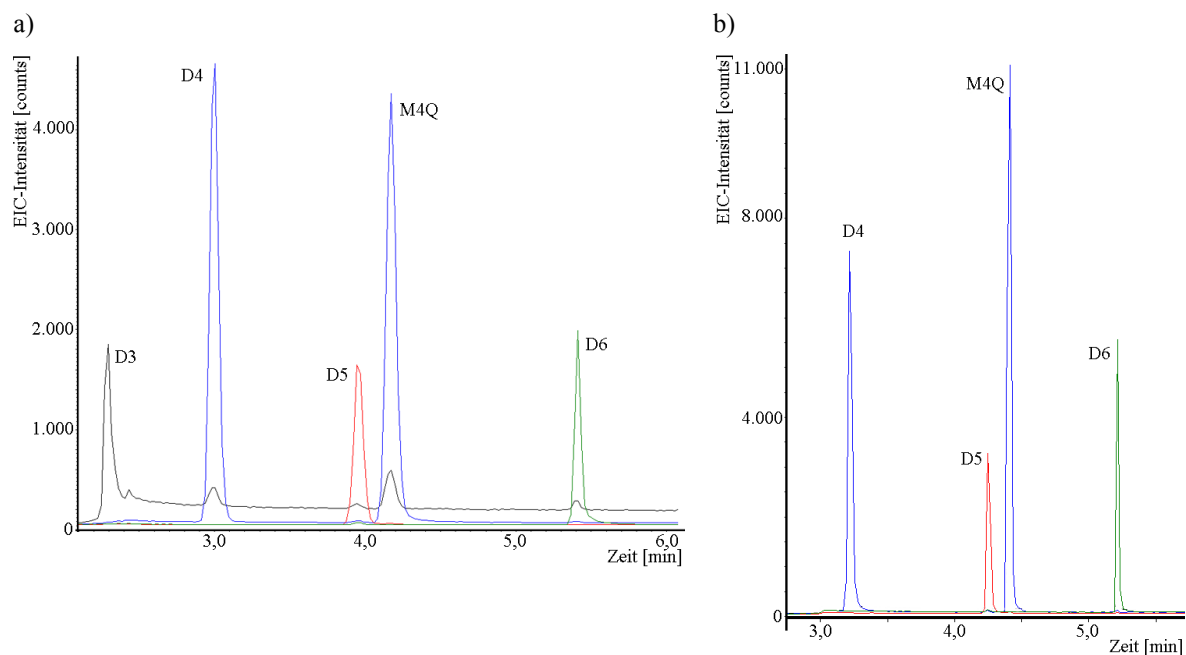


Abbildung 15: EIC-Chromatogramme nach GC-MS-Analyse bei Verwendung einer a) unpolaren Trennsäule (Optima PXLB), b) polaren Trennsäule (SLB-IL 60). Extrahierte Massenspuren für m/z 207 (D3, schwarz), m/z 281 (D4 und M4Q, blau), m/z 355 (D5, rot) und m/z 341 (D6, grün).

Die analytischen Kennzahlen für die einzelnen Siloxane mit den jeweiligen Vertrauensbereichen ($n = 2$, $m = 8$, $\alpha = \beta = 0,05$) sind im Anhang aufgeführt (s. Tabelle 19). Demnach können bei der Verwendung der unpolaren Optima PXLB bzw. der mittelpolaren Rtx 1701-Trennsäulen die geringsten Bestimmungsgrenzen für die zyklischen Siloxane D4-D6 zwischen 1,6-3,0 μg D4-D6/L Dichlormethan erzielt werden. In Verbindung mit dem geringen Säulenbluten und der sehr guten Wiederholbarkeit bei der Verwendung der Optima PXLB-Trennsäule ist auch für das kleinste Homologe D3 eine sensitive GC-MS-Analyse mit Bestimmungsgrenze von $2,6 \pm 0,2 \mu\text{g}$ D3/L möglich (zum Vergleich: Rtx 1701 $5,8 \pm 0,4 \mu\text{g}$ D3/L).

5.2.2 Entwicklung einer alternativen GC-MS-Analyse

Aufgrund der limitierten Nachweisstärke konventioneller split/splitloser GC-MS-Methoden, der eingeschränkten Einsatzmöglichkeit von Aufkonzentrationstechniken (z. B. Verdampfung des Lösungsmittels) und der Problematik potentieller Kontaminationsquellen [162, 173, 179, 188] werden im Bereich der Ultrapurenanalyse zyklischer Methylsiloxane in Konzentrationsbereichen kleiner 100 ng/L alternative GC-Injektionstechniken eingesetzt. Insbesondere die statische HS-Festphasenmikroextraktionstechnik findet bei Analytik zyklischer Methylsiloxane in Gewässerproben Anwendung. Hierbei werden die cVMS aus der flüssigen Probe in die Gasphase überführt, wo es zu einer Adsorption an die SPME-Faser kommt (s.

Abbildung 16a). Eine weiterführende Variante der HS-SPME-Technik ist die sogenannte *in-tube extraction*-Technik (ITEX, s. Abbildung 16b). Durch eine wiederholte, aktive Pumpleistung der Spritze kommt es zu einer Anreicherung der Analyten auf einem oberhalb der Injektionsnadel gepackten Sorbensmaterial. Die Desorption und Überführung der Analyten auf die analytische Säule erfolgt hingegen durch das Durchströmen des Packungsmaterials mit der mobilen Phase bei erhöhten Temperaturen.

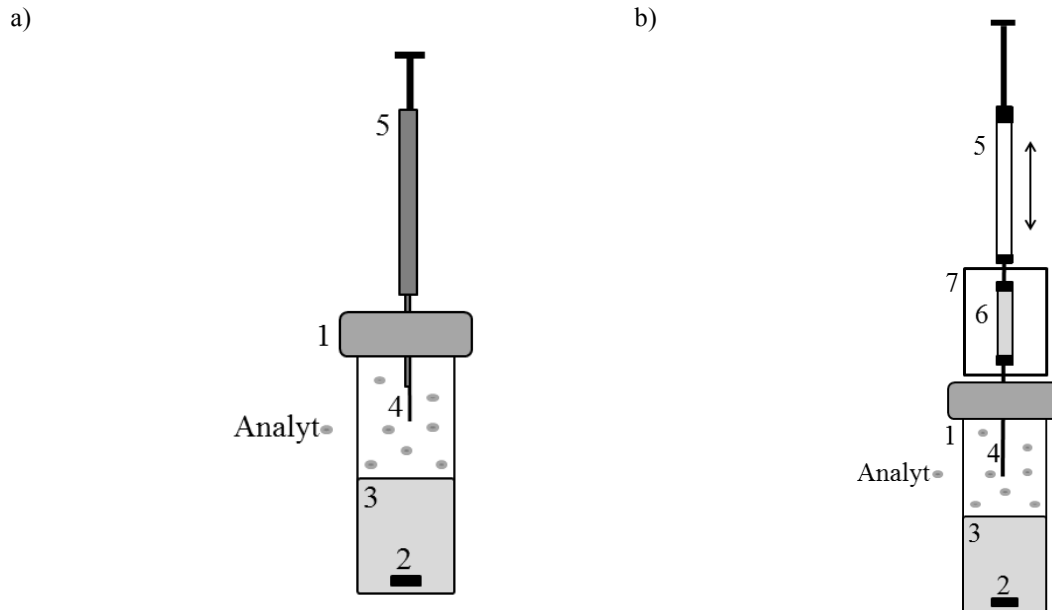


Abbildung 16: Schematische Darstellung zweier *headspace*-Techniken. a) Statische HS-SPME mit 1) HS-Vial, 2) Magnetrührer, 3) flüssige Probe, 4) SPME-Faser, 5) SPME-Faser Halter für den Autosampler; modifiziert nach [264]; b) Dynamische HS-ITEX mit 1) HS-Vial, 2) Magnetrührer, 3) flüssige Probe, 4) konische Spritzennadel, 5) HS-Spritze, 6) gepacktes Sorbensmaterial, 7) externe Heizung; modifiziert nach [328].

Die Vorteile dieser dynamischen Variante gegenüber der statischen HS-SPME-Variante sind zum einen das große Adsorptionsvolumen des Trägermaterials ($\sim 160 \mu\text{L}$ [329] anstatt $0,6 \mu\text{L}$ [330]), das eine Analyse flüchtiger Substanzen im unterem ng/L-Bereich ermöglicht. Zum anderen können verschiedene Packungsmaterialien z. B. auf Kohlenstoff- oder Polymer-Basis eingesetzt werden [264, 328, 329, 331, 332].

5.2.2.1 Anwendung einer dynamischen *headspace* basierten Injektionstechnik

Der Einsatzbereich statischer *headspace*-Festphasenextraktionstechniken zur gaschromatographischen Analyse zyklischer Siloxane beschränkt sich in der Fachliteratur auf die Analyse von Umweltproben, wie Fluss-, Abwasser- und Schlammproben (vgl. Kap. 2.3.). Um die Eignung einer dynamischen HS-GC-MS-Methode zur Analyse zyklischer Siloxane in Vollblut zu überprüfen, wurden mit 20 µg D3-D6/L aufgestockte Vollblutproben und zum Vergleich aufgestocktes, destilliertes Wasser mittels ITEX-GC-MS analysiert. Hierzu wurden die Blind- und aufgestockten Proben jeweils 10 min bei 40 °C inkubiert und mit 60 Pump-Zyklen extrahiert. Um mögliche Kontaminationen durch PDMS-basierte Materialien zu vermeiden, wurden Kohlenstoff-Nanoröhrchen als Sorbens und eine polare PEG-basierte Trennsäule verwendet. Die Desorption der Siloxane von dem Trägermaterial erfolgte oberhalb der Siedetemperatur bei 280 °C. Da bereits Querkontaminationen bei der Verwendung von gepackten Glaslinern beobachtet wurden, erfolgte die Beurteilung der Eignung dieser Methode nicht nur anhand des S/N-Verhältnisses, sondern auch über das Verschleppungsverhalten zwischen den einzelnen Messungen. Für die ITEX-GC-MS-Messung einer mit 20 µg D3-D6/L aufgestockten, destillierten Wasserprobe konnte lediglich für das Cyclo-siloxan D6 ein annehmbares S/N-Verhältnis von 18 im resultierenden TIC-Chromatogramm ermittelt werden (mit S/N für D3 = 1; D4 = 6; D5 = 4). Neben den geringen Signalintensitäten konnten auch bei den alternierenden Messungen der aufgestockten Vollblut- bzw. Blindproben ein Anstieg der Siloxan-Intensitäten im TIC-Chromatogramm der Blindproben nach Analyse einer aufgestockten Vollblutprobe beobachtet werden (s. Abbildung 17). Nach fünf ITEX-GC-MS-Messungen war eine Unterscheidung zwischen den TIC-Chromatogrammen der aufgestockten Vollblut- und der Blindproben anhand der relativen Siloxan-Signalintensitäten nicht mehr möglich. Diese Querkontamination konnte nicht durch die Erhöhung der Desorptionstemperatur auf 300 °C unterbunden werden.

Nur eine Verlängerung des Ausheizprozesses nach der Desorption (ca. 3 Stunden) führte zu einer Minimierung des Siloxan-Untergrundes in den Blindproben. Aufgrund der zunehmenden Kontamination des Trägermaterials durch eine nicht vollständige Desorption der Analyten wurde diese HS basierte GC-MS-Methode zur Analyse zyklischer Siloxane verworfen.

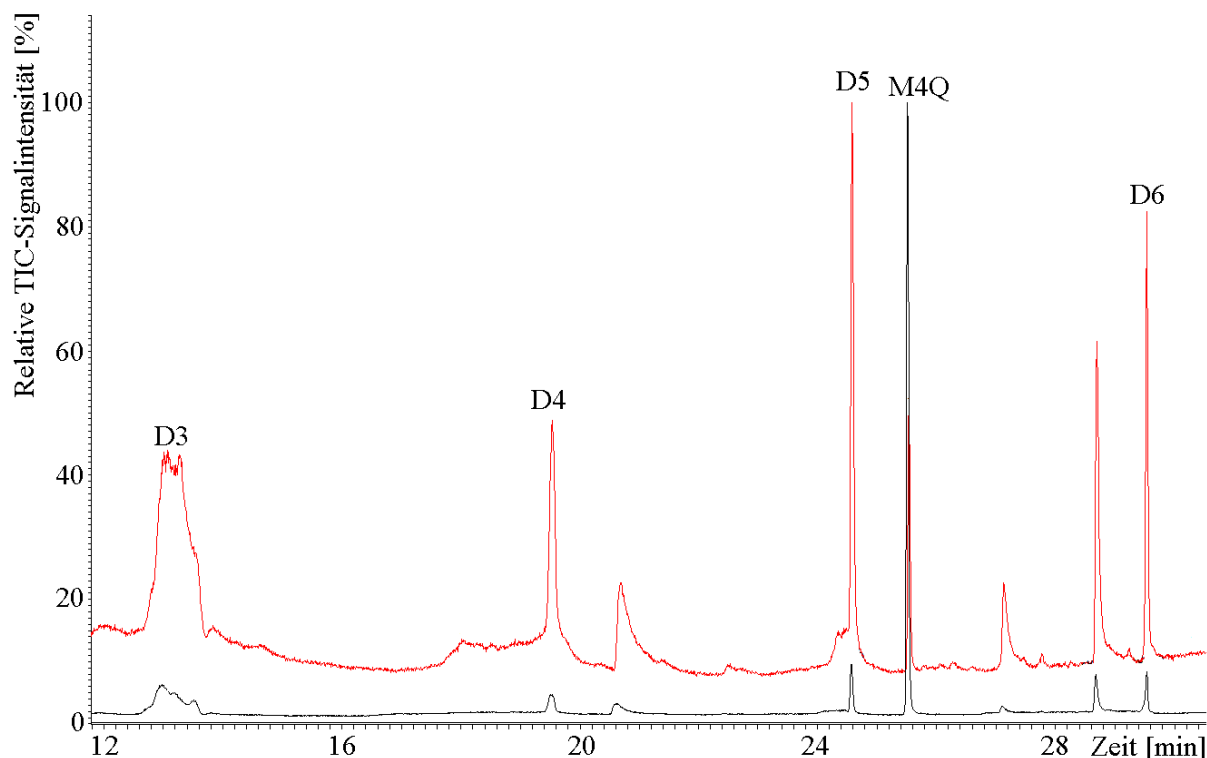


Abbildung 17: TIC-Chromatogramme nach GC-ITEX-Ion Trap MS-Analyse zweier Vollblut-Blindproben vor (schwarz) und nach Injektion einer mit 20 µg D3-D6/L aufgestockten Vollblutprobe (rot).

Das starke Adsorptionsverhalten zyklischer Methylsiloxanen an Kohlenstoff-basierten Materialien wurde bereits von HUPPMANN et al. untersucht, die Aktivkohle als Sorbens bei der Festphasen-Extraktion einsetzten [261]. Hierbei konnte bei der Verwendung von n-Hexan, Cyclohexan bzw. Hexamethylsiloxan als Elutionsmittel und zusätzlicher Ultraschall-Behandlung keine vollständige Desorption von D3-D6 von dem Trägermaterial erreicht werden [261]. Auch bezüglich bei der thermischen Desorption bei der statischen HS-SPME-GC-MS-Analyse zyklischer Siloxane in Klärschlamm- bzw. in Boden- und Sedimentproben wurde diese Problematik diskutiert [163, 258]. Basierend auf einem hohen organischen Kohlenstoff-Wasser-Verteilungskoeffizienten für D4-D6 ($\log K_{OC} = 4,2-6,2$ [163, 333–335]) und in Folge dessen, aufgrund der Tendenz an organischem Material, in der Probe zu adsorbieren, wobei ein Analytverlust von bis zu 53 % beobachtet werden konnte [258], eignen sich demnach die HS-SPME basierten Methoden nur für die Analyse von flüssigen Proben mit geringem organischen Anteil.

5.2.2.2 Optimierung und Validierung der *large volume*-Injektionstechnik

Die Optimierung einer auf der LVI-Technik basierten GC-MS-Methode im *solvent vent*-Modus erfolgte zu Beginn unter Injektion von 100 μL einer 3 μg D3-D6/L-Siloxan-Standardlösung in Dichlormethan in ein Siltek-beschichtetes Glasverdampferrohr und anschließender gaschromatographischer Trennung mit einer Dimethylsiloxyphenylene PDMS-Trennsäule (Rxi 5Sil-MS, 0,25 μm).

Für die bestmögliche Überführung der Analyten auf die Trennsäule wurden die PTV-Parameter anhand des resultierenden S/N-Verhältnisses sowie der relativen Standardabweichungen der einzelnen Siloxane D3-D6 ($n = 3$) optimiert. Allgemein kann der Ablauf einer LVI bis zum Start der GC-Messung in zwei Abschnitte unterteilt werden: Injektion der flüssigen Probe und Analyt-Transfer auf die Trennsäule (s. Abbildung 18). Dabei ist im *stop flow*-Modus (Inletdruck: 0 bar) die Injektionsgeschwindigkeit (Dauer der Injektion) von dem verwendeten Lösungsmittel (hier Dichlormethan), der Injektions- bzw. Inlettemperatur und dem *vent flow* abhängig. Im ersten Schritt der Optimierung erfolgte die Ermittlung der optimalen Injektionstemperatur (-6, 2 und 10 $^{\circ}\text{C}$) bei variabler Injektionsgeschwindigkeit. Da bei zunehmender Injektortemperatur bei vergleichbaren Injektionsgeschwindigkeiten unterschiedliche Flussraten für den *vent flow* resultieren, wurden die eingestellten Injektionstemperaturen allgemein in drei Gruppen unterteilt: langsam 2,59-2,77 $\mu\text{L/s}$; mittel 3,22-3,65 $\mu\text{L/s}$ und schnell 3,93-4,54 $\mu\text{L/s}$ (einzelne Werte s. Anhang Tabelle 20).

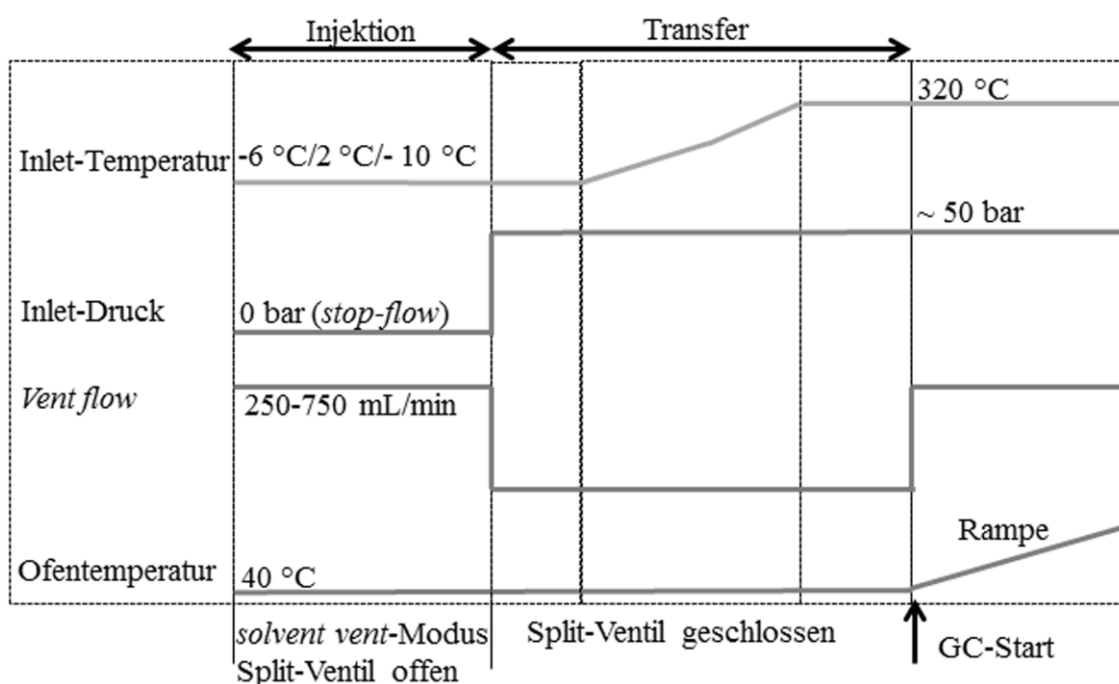


Abbildung 18: Ablauf einer *large volume*-Injektion im *solvent-vent*-Modus und Verlauf der zu optimierenden PTV-Parameter; modifiziert nach [175, 336].

Ein Vergleich der resultierenden S/N-Verhältnisse der zyklischen Siloxane D3-D6 verdeutlicht (s. Abbildung 19a), dass allgemein bei einer Injektionstemperatur von 2 °C eine geringere Streuung der Messwerte mit relativer Standardabweichung zwischen 1-8 % gegenüber 4-13 % bei -6 °C bzw. 3-26 % bei 10 °C auftritt. Zusätzlich kann eine deutliche Zunahme des S/N-Verhältnisses des Methylsiloxans D4 bei einer Injektortemperatur von 2 °C gegenüber -6 °C und 10 °C beobachtet werden. Eine Abhängigkeit des resultierenden S/N-Verhältnisses von der Injektionsgeschwindigkeit bei konstanter Injektionstemperatur ist für die zyklischen Methylsiloxane D3, D4 und D6 zu beobachten (s. Abbildung 14a und b bzw. Anhang Abbildung 40a). Hierbei folgt bei zunehmender Injektionsgeschwindigkeit ein steigendes S/N-Verhältnis für die beiden Homologen D3 und D4 bei Temperaturen von 2 °C bzw. 10 °C. Hingegen kommt es zu einer Abnahme des resultierenden S/N-Verhältnisses mit steigender Injektionsgeschwindigkeit für die Homologen D4 und D6 bei einer Injektionstemperatur von -6 °C. Für das Cyclosiloxan D5 hingegen werden keine eindeutigen S/N-Zu- oder Abnahmen in Abhängigkeit von den Injektionsbedingungen (Geschwindigkeit und Temperatur) beobachtet (s. Anhang Abbildung 40b).

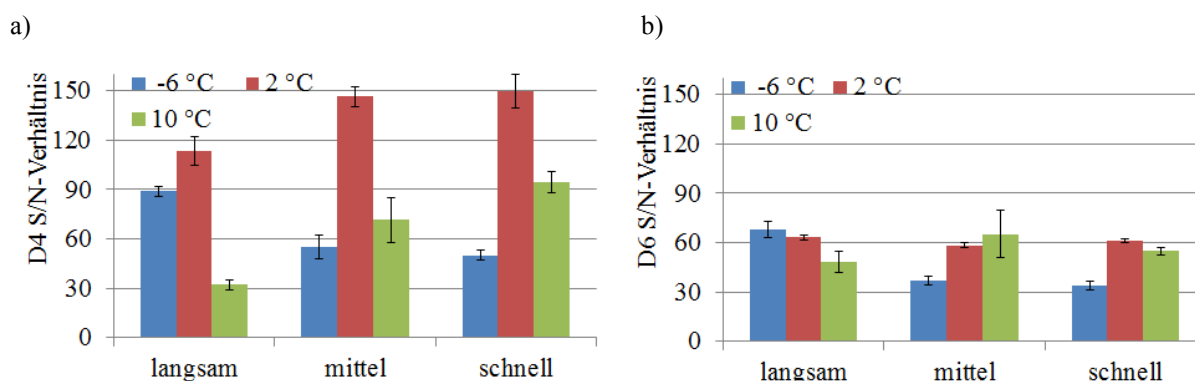


Abbildung 19: Abhängigkeit von der Injektortemperatur und der Injektionsgeschwindigkeit des ermittelten S/N-Verhältnisses eines a) 3 µg D4/L und b) 3 µg D6/L Dichlormethan-Standards nach LVI-GC-MS-Analyse. Geschwindigkeiten von 2,59-2,77 µL/s (langsam), 3,22-3,65 µL/s (mittel) und 3,93-4,54 µL/s (schnell).

Da für eine Injektortemperatur von 2 °C und einer mittleren Injektionsgeschwindigkeit (3,22 µL/s bei einem *vent flow* von 410 mL/min) RSD zwischen 1 und 5 % der S/N-Verhältnisse erzielt wurden, wurden diese drei Parameter für die weiterführende Methodenentwicklung gewählt. Im zweiten Schritt der Methodenentwicklung erfolgte die Optimierung des Analyt-Transfers auf die Trennsäule. Hierbei wurde bei einer Injektionstemperatur von 2 °C und Injektionsgeschwindigkeit von 3,22 µL/s die Transfer-dauer auf die analytische Trennsäule über die Dauer des geschlossenen Split-Ventils zwischen 0,55 und 0,75 min variiert. Mit Verlängerung der Transferdauer resultiert für die höher siedenden Siloxane D5

und D6 eine Zunahme der ermittelten S/N-Verhältnisse um einen Faktor 11 bzw. 2 (s. Abbildung 20). Dies verdeutlicht eine verbesserte Überführung der Analyten auf die Trennsäule. Im Vergleich hierzu ist eine Abnahme der S/N-Verhältnisse um einen Faktor 3 bzw. 2 für die flüchtigeren Cyclosiloxane D3 und D4 zu beobachten.

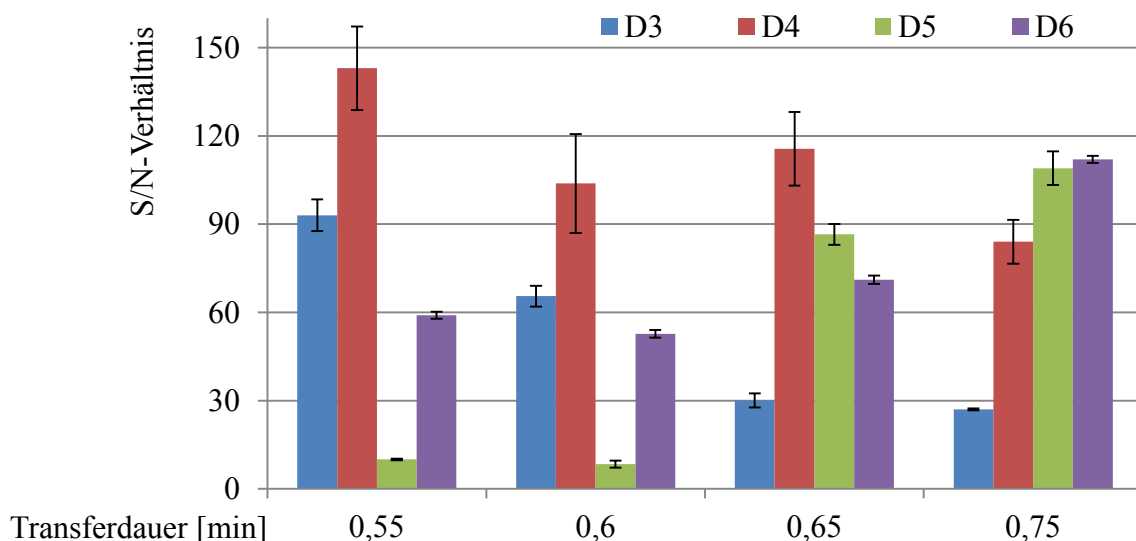


Abbildung 20: S/N-Verhältnisse der Methylsiloxane bei 3 µg D3-D6/L in Abhängigkeit von der Dauer des geschlossenen Split-Ventils bei einer Injektortemperatur von 2 °C und einer Injektionsgeschwindigkeit von 3,22 µL/s (*vent flow* 410 mL/min).

Aufgrund der zunehmenden Sensitivität der beiden Homologen D5 und D6 und der relativen Standardabweichungen der S/N-Verhältnisse von 1-11 % wurde die LVI-Methode bei einer Transferdauer von 0,75 min mit einer Injektionstemperatur von 2 °C und einer Injektionsgeschwindigkeit von 3,22 µL/s validiert. Analog zur M1-Methode erfolgte die Validierung der LVI-GC-MS-Methode (M2) unter Verwendung des Argon-Hauses sowie der Rxi 5Sil-MS (0,25 µm)- und der Optima PXLB-Trennsäule. Hierzu wurden Linearität, Wiederholbarkeit an einem und an verschiedenen Tagen, Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen ermittelt (s. Tabelle 14; Bestimmung der Wiederfindungsraten vgl. Kap. 5.2.3). Die Linearität wurde über eine wiederholte LVI-GC-MS-Analyse von Kalibrierlösungen mit 0,05-4 µg D3-D6/L Dichlormethan ($n = 2$) mit einem Bestimmtheitsmaß $> 0,993$ für beide Trennsäulen bestimmt. Auch die Wiederholbarkeit der Siloxan-Messungen, die mittels dreifacher Analyse einer 1,5 µg D3-D6/L- (Rxi 5Sil-MS) bzw. 0,7 µg D3-D6/L- (Optima PXLB) Standardlösung in Dichlormethan bestimmt wurde, ist mit einer relativen Standardabweichung der Signalflächen in den erhaltenen EIC-Chromatogramm für beide Trennsäulen zwischen 1-9 % an einem Tag bzw. 2-16 % zwischen den Tagen vergleichbar ($M4Q < 5\%$). Nur für das

zyklische Methylsiloxan D3 kommt es bei der Verwendung der Optima PXLB-Trennsäule zum einen zu einer Verschiebung der Retentionszeiten zwischen den einzelnen Messungen (RSD 5%). Zum anderen ist eine hohe Streuung der erhaltenen D3-Peakflächen mit einer relativen Standardabweichung zwischen 15-55 % zu beobachten. Eine Erklärung für diese Beobachtung konnte nicht gefunden werden, da alle Parameter, mit Ausnahme der Trennsäule und der Ofentemperatur (45 °C anstatt 40 °C), konstant gehalten wurden. Aufgrund dieser mäßigen Wiederholbarkeit konnte das Siloxan D3 mit der LVI-GC-MS-Methode (M2) unter Verwendung der Optima PXLB-Säule nicht analysiert werden. Für beide Trennsäulen wurden die analytischen Grenzen durch Analyse einer Kalibrationsreihe zwischen 0,05 und 3 µg D3-D6/L (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 1,0; 1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 µg/L) nach DIN 32645 [296] mit der Kalibriergeradenmethode bestimmt.

Tabelle 14: Validierungsergebnisse der LVI-GC-MS-Methode (M2) zur Bestimmung von D3-D6 in Dichlormethan unter Verwendung der Rxi 5Sil-MS- und Optima PXLB-Trennsäule.

M2 (Rxi 5Sil-MS, 0,25 µm)	D3	D4	D5	D6
Linearität R ²	0,9935	0,9971	0,9970	0,9974
Wiederholbarkeit RSD [%] an einem Tag	1-8	5-9	5-9	1-5
Wiederholbarkeit RSD [%] zwischen den Tagen	5-13	7-14	9-16	3-8
Nachweisgrenze [µg/L]*	0,36 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,06 ± 0,01
Bestimmungsgrenze [µg/L]*	1,10 ± 0,09	0,60 ± 0,04	0,60 ± 0,04	0,20 ± 0,01
Retentionszeit [min] (RSD [%])	7,50 (3,0)	9,52 (0,2)	10,74 (0,1)	12,74 (0,1)
M2 (Optima PXLB)	D3	D4	D5	D6
Linearität R ²	n. b.	0,9987	0,9963	0,9955
Wiederholbarkeit RSD [%] an einem Tag	15-55	2-9	3-8	1-5
Wiederholbarkeit RSD [%] zwischen den Tagen	n. b.	5-12	5-12	2-7
Nachweisgrenze [µg/L]*	n. b.	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Bestimmungsgrenze [µg/L]*	n. b.	0,26 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,03
Retentionszeit [min] (RSD [%])	2,48 (5,3)	3,08 (0,5)	3,95 (0,1)	5,61 (0,1)

n. b.: nicht bestimmt

*Die angegebenen Vertrauensbereiche von LOD und LOQ in µg/L wurden mit $\alpha = \beta = 0,05$; $n = 2$ berechnet

Nach Eliminierung der kleinsten Konzentrationen aus der Kalibration (0,05 µg D3-D6/L, 0,1 µg D3-D5/L und 0,2-0,3 µg D3/L) wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,06-0,36 µg D3-D6/L und Bestimmungsgrenzen zwischen 0,20-1,10 µg D3-D6/L Dichlormethan bei der Verwendung der Rxi 5Sil-MS ermittelt. Analog zur splitlosen-GC-MS-Methode können durch Einsatz der Optima PXLB-Trennsäule um etwa einen Faktor 2-3 niedrigere

Nachweisgrenzen (0,04-0,08 µg D4-D6/L Dichlormethan) und Bestimmungsgrenzen (0,15-0,26 µg D4-D6/L Dichlormethan) erreicht werden. Bei Verwendung desselben Geräteaufbaus, mit Ausnahme der Mikroliterspritze und eines zusätzlichen Stickstofftanks, ist durch den Einsatz der LVI-Technik (M2) im Vergleich zu der splitlosen GC-MS-Methode (M1) eine um den Faktor 25-40 sensitivere Siloxan-Analyse möglich.

5.2.3 Optimierung der Probenvorbereitung

Um die Möglichkeit eines Einsatzes der beiden Methoden M1 und M2 zur quantitativen Analyse zyklischer Methylsiloxane im Vollblut und im Kapselgewebe von Frauen mit Silikonbrustimplantaten zu untersuchen, wurden im ersten Schritt anhand aufgestockter Vollblutproben der Kontrollperson und aufgestockter Gewebe-Vergleichsmatrix die Lagerungs- und Extraktionsbedingungen optimiert. Anschließend wurden für beide Probenmatrices die Wiederfindungsraten sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt.

Siloxan-Wiederfindungsraten im aufgestockten Vollblut

Die Optimierung der Probenvorbereitung zur Analyse des Vollblutes erfolgte zum einen durch die Variation der Lagerungsbedingungen im Hinblick auf die Temperatur. Zum anderen wurde das Volumenverhältnis zwischen Vollblut und dem Extraktionsmittel Dichlormethan optimiert. Hinsichtlich der unausweichlichen Lagerdauer der Vollblutproben bis zu deren Analyse im Labor im Umfang von einem halben Tag bis drei Tage nach der Blutentnahme im Universitätsklinikum wurden Vollblutproben der Kontrollperson mit methanolischer D3-D6-Standardlösung aufgestockt. Mit diesem Schritt sollen ähnliche Lagerungsbedingungen, wie sie für die Realproben der Implantatträger vorliegen können, realisiert werden. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die aufgestockten Vollblutproben mit dem Extraktionsmittel Dichlormethan versetzt und für 14 Stunden bzw. 62 Stunden gekühlt gelagert. Im Vergleich zu Variante A, wo die Proben im Probenständer bei 5 °C gekühlt wurden, wurden die Proben bei Variante B in einer Styroporbox zusammen mit drei Kühlpacks bzw. mit *crushed ice* (Variante C) im Kühlschrank gelagert. Zusätzlich wurde ein Teil der aufgestockten Blutproben im Gefrierschrank bei -20 °C (Variante D) gelagert. Bei diesen Experimenten wurden Siloxan-Blutkonzentrationen von 83 ng D3-D6/g Vollblut bzw. 53 ng D3-D6/g Vollblut simuliert. Anschließend erfolgte die Extraktion der aufgestockten Vollblutproben bei einem äquivalenten Extraktionsmittel-Vollblut-Volumenverhältnis mit 0,9 w/w (2) bzw. bei einem Volumenverhältnis von 2 zu 1 mit 0,4 w/w (1) unter Zuhilfe-

nahme eines Vortexers (zweimal 2 min). Die Dichlormethan-Extrakte wurden nach Zentrifugation mittels GC-MS (M1) analysiert. Hierbei wurde nach Abzug des Blindwertes über eine externe Kalibration mit Siloxan-Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 10-150 µg D3-D6/L die Konzentration ermittelt. Die Wiederholbarkeit dieser Lagerungs- und Extraktionsexperimente erfolgte je Variante anhand eines dreifachen Ansatzes. Dabei zeigten die *field blanks* (Vollblut der Kontrollperson, n=3) gegenüber der *procedural blanks* (Dichlormethan, n = 3) keine erhöhten Siloxan-Signalintensitäten. In Abbildung 21a und 21b sind die ermittelten Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen (A-D) und der Lagerzeit (14 h bzw. 62 h) in einem Blockdiagramm graphisch dargestellt (Einzelwerte s. Anhang Tabelle 21). Die angegebenen Vertrauensbereiche der Wiederfindungsraten wurden dabei mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % und unter Durchführung einer Dreifachbestimmung berechnet. Grundsätzlich wurden bei einem Extraktionsmittel-Vollblut-Volumenverhältnis von 0,9 w/w und einer Lagerdauer von 14 h für die zyklischen Siloxane D3-D6 Wiederfindungsraten zwischen 34-101 % (Kühlschrank, A2-14h), 80-98 % (*crushed ice*, C2-14h) und 62-104 % (Gefrierschrank, D2-14h) ermittelt (s. Abbildung 21a). Im Gegensatz zu einer 14 h-Lagerung der aufgestockten Vollblutproben bei 5 °C im Kühlschrank (A) können bei der Lagerung der Proben bei < 5 °C in einer *crushed ice* gefüllten Styroporbox (C) und bei – 20 °C im Gefrierschrank (D) auch für das Methylsiloxan D3 Wiederfindungsraten über 60 % erreicht werden. Insbesondere bei den aufgestockten Vollblutproben, die mit *crushed ice* gekühlt wurden, zeigen die Messwerte eine geringere Streuung mit Vertrauensbereichen der Wiederfindungsraten zwischen 5-9 % gegenüber 1-25 % (A) und 5-11 % (D).

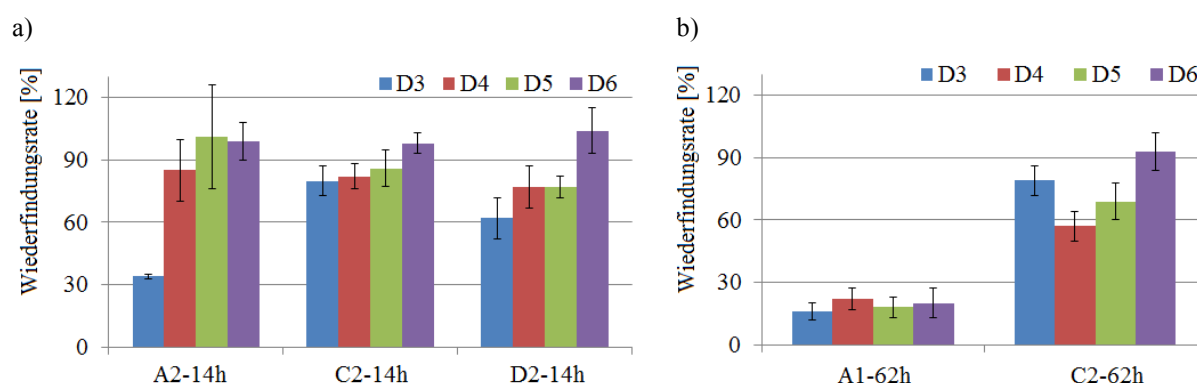


Abbildung 21: D3-D6-Wiederfindungsraten im aufgestockten Vollblut in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen nach einer Lagerdauer von a) 14 h, b) 62 h. Mit den Lagerungsbedingungen A: Kühlschrank, C: *crushed ice*, D: Gefrierschrank bei einem Extraktionsmittel-Vollblut-Verhältnis: 0,4 w/w (1), 0,9 w/w (2).

Eine Beeinflussung der Wiederfindungsraten durch das Volumenverhältnis von Extraktionsmittel und Vollblut wurde nicht beobachtet (s. Anhang Tabelle 21). Werden die aufgestockten Vollblutproben in den Kunststoffgefäßen über einen längeren Zeitraum (62 h, s. Abbildung 21b) im Kühlschrank bei 5 °C (A1-62h) gelagert, kommt es zu einem Verlust der Analyten von nahezu 80 % (D3-D6-Wiederfindungsraten zwischen 16-22 %). Eine gleichmäßige Kühlung der Proben mit *crushed ice* führt zu einer Minimierung des Analytverlustes mit Wiederfindungsraten der mit 53 ng D3-D6/g aufgestockten Vollblutproben von 57-93 % (C2-62h mit einem Vertrauensbereich VB von 7-9 %). Aufgrund der geringen Streuung der erhaltenen Messwerte (VB 5-9 %) und der guten Wiederfindungsraten (größer 80 %) wurde für die Lagerung und die Präparation der Vollblutproben von Implantatträgern die Variante C (Kühlung mit *crushed ice* in einer Styroporbox) verwendet.

Siloxan-Wiederfindungsraten in einer aufgestockten Gewebe-Vergleichsmatrix

Die Optimierung der Probenvorbereitung für die Analyse der Kapselgewebeproben erfolgte anhand der Wiederfindungsraten der Analyten in der mit einer methanolischen D3-D6-Siloxan-Standardlösung aufgestockten Gewebe-Vergleichsmatrix (Endkonzentration 250 D3-D6 ng/g Gewebe). Hierbei wurde die einfache fest-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan einer vorangehenden Homogenisierung der Gewebe-Vergleichsmatrix und anschließender Extraktion gegenübergestellt. Nach einer Lagerung der aufgestockten Gewebeproben für 14 h im Gefrierschrank bei -20 °C erfolgte für einen Teil der Proben die Extraktion unter Zuhilfenahme eines Vortexers (Variante Extraktion). Der zweite Teil der aufgestockten Gewebeproben wurde direkt mittels SpeedMill in Lysis Tubes mit Keramikperlen homogenisiert (Variante Homogenisieren A) und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Um eine Homogenität der bearbeiteten Gewebemasse zu erhalten, wurde zum dritten Teil der aufgestockten Gewebeproben vor dem Homogenisieren 200 µL Wasser hinzugegeben (Variante Homogenisieren B). Aufgrund der Flüchtigkeit der Analyten und des damit einhergehenden Analytverlustes, der bereits bei der Optimierung der Vollblutproben gezeigt werden konnte, wurden die aufgestockten Gewebeproben während der Präparation und bis zur GC-MS-Analyse mittels *crushed ice* in einer Styroporbox gekühlt gelagert. Die erhaltenen Dichlormethan-Extrakte wurden anschließend um einen Faktor 2 verdünnt und mittels GC-MS (M1) analysiert. In Abbildung 22 sind die berechneten Wiederfindungsraten der zyklischen Siloxane D3-D6 für die aufgestockten Gewebeproben graphisch dargestellt (Einzelwerte s. Anhang Tabelle 22).

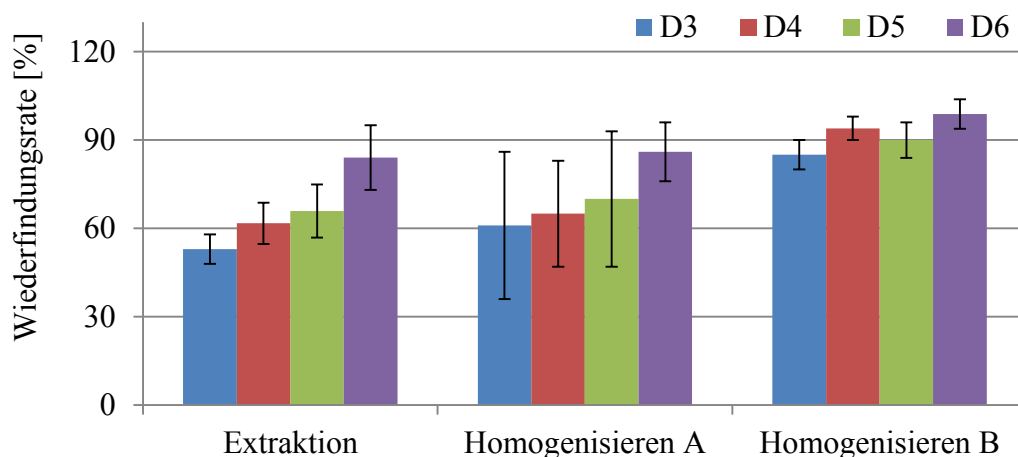


Abbildung 22: D3-D6-Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung. Mit A: ohne Zugabe und B: mit Zugabe vom Wasser vor dem Homogenisieren. Die angegebenen Vertrauensbereiche der Wiederfindungsraten [%] wurden mit $P = 95 \%$, $n = 3$ berechnet.

Dabei wurde eine RSD der Signalflächen des internen Standards M4Q in den EIC-Chromatogrammen von 5 % erzielt. Durch das Homogenisieren der aufgestockten Gewebe-Vergleichsmatrix vor der Extraktion gegenüber einer einfachen Extraktion konnten die Siloxan-Wiederfindungsraten von 53-84 % auf 61-99 % (Homogenisieren A und B) erhöht werden. Insbesondere die Wasser-Zugabe bewirkt neben einer gleichmäßigeren Homogenität der bearbeiteten Gewebemassen eine Erhöhung der Wiederfindungsraten von 61-86 % (Homogenisieren A mit VB 10-25 %) auf 85-99 % (Homogenisieren B). Da auch die berechneten Vertrauensbereiche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % und unter Durchführung eines dreifachen Ansatzes unter 10 % lagen, wurde für die Präparation der Kapselgewebeprobe die dritte Variante (Homogenisieren B) verwendet.

Für die vollständige Validierung der beiden GC-MS-Methoden M1 und M2 wurden die Wiederfindungen anhand aufgestockter Vollblut- und Gewebeprobe mit unterschiedlichen Konzentrationen über eine externe Kalibration (M1: 10-150 μg D3-D6/L; M2: 0,2-3,5 μg D3-D6/L) ermittelt. Für die Wiederholpräzision wurden je aufgestockter Vollblut-Konzentration (M1: 53 μg /L; M2: 0,3 und 2,0 ng D4-D6/g) und Gewebe-Vergleichsmatrix (250 ng D3-D6) drei Ansätze durchgeführt. Die Bestimmung der Grenzwerte erfolgte über die Kalibriergeradenmethode (s. Tabelle 12 und Tabelle 14). Anschließend wurden die in Dichlormethan ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf die Einwaage der Proben und des Extraktionsmittels bezogen (ng Analyt pro g Probe). Hierbei konnten für die splitlose GC-MS-Methode bei einer aufgestockten Siloxan-Konzentration von 53 ng D3-D6/g Vollblut Wiederfindungen von 80-98 % bei einem VB von 5-9 % ermittelten werden (s. Tabelle 15). Dabei wurden die VB mit $n = 3$ und einer Wahrscheinlichkeit von 95 % berechnet.

Tabelle 15: Wiederfindung und Nachweis- und Bestimmungsgrenze von D3-D6 in Vollblut für M1. Die angegebenen VB bei den Wiederfindungsraten wurden mit $P = 95\%$ und $n = 3$ berechnet.

M1 (Rxi 5Sil-MS)	D3	D4	D5	D6
Wiederfindung (VB in %)				
bei 53 ng D3-D6/g Vollblut	80 (7)	82 (6)	86 (9)	98 (5)
bei 250 ng D3-D6/g Gewebe	85 (5)	94 (4)	90 (6)	99 (5)
Nachweisgrenze [ng/g Vollblut]	$4,1 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,3$
Bestimmungsgrenze [ng/g Vollblut]	$13,2 \pm 1,0$	$14,8 \pm 1,2$	$14,5 \pm 0,9$	$8,0 \pm 0,3$
Nachweisgrenze [ng/g Gewebe]	$14,6 \pm 1,2$	$8,7 \pm 0,6$	$14,3 \pm 1,2$	$6,2 \pm 0,6$
Bestimmungsgrenze [ng/g Gewebe]	$25,4 \pm 1,9$	$29,7 \pm 2,5$	$29,1 \pm 1,9$	$16,1 \pm 0,6$

Bei einem Extraktionsmittel-Vollblut-Verhältnis von 0,4 w/w ergeben sich Nachweisgrenzen zwischen 3-7 ng D3-D6/g Vollblut und Bestimmungsgrenzen zwischen 8-15 ng D3-D6/g Vollblut. Für die Gewebeprouen wurden nach Homogenisierung, Extraktion und GC-MS-Analyse der Extrakte (M1) vergleichbare Wiederfindungen (85-99 %, VB 4-6 %) ermittelt. Aus der Ein-waage der Gewebe-Vergleichsmatrix von 0,1-0,2 g resultieren Nachweisgrenzen zwischen 6-15 ng D3-D6/g Gewebe und Bestimmungsgrenzen zwischen 16-30 ng D3-D6/g Gewebe. Verglichen zu HANSSEN et al., die nach FLASSBECK et al. [98] Blutplasmaproben mit n-Hexan extrahierten und mittels GC-MS analysierten und Bestimmungsgrenzen zwischen 1,3-2,7 ng/g erzielten [208], ist die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Nachweisgrenze etwa um den Faktor 5 höher. Wie bereits im vorigen Kapitel diskutiert, hat die Trennsäule einen erheblichen Einfluss auf die Sensitivität der Siloxan-Analytik. Die Diskrepanz zwischen den von HANSSEN et al. [208] publizierten Nachweisgrenzen und den hier vorgestellten Nachweisgrenzen könnte in der Verwendung einer PEG-Trennsäule anstatt einer PDMS-Trennsäule, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, begründet sein. Vergleichbare Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für das Cyclotetrasiloxan in Blutplasma wurden von UTELL et al. nach Extraktion mit Tetrahydrofuran und Ethylacetat erreicht (5 bzw. 17 ng D4/g Plasma) [214]. Nachweisgrenzen in biologischen Proben wurden nach Homogenisieren und n-Hexan-Extraktion in Konzentrationsbereichen von 5-9 ng D4-D6/g in Zooplankton und 2-6 ng D5-D6/g in Fischleber ermittelt [192]. Die von WARNER et al. angegebenen Nachweisgrenzen sind vergleichbar bzw. liegen mit einem Faktor 2-4 unterhalb der in dieser Arbeit ermittelten Nachweisgrenzen.

Die Bestimmung der Wiederfindung zyklischer Siloxane im aufgestockten Vollblut für zwei unterschiedliche Konzentrationen (0,3 ng D4-D6/g und 2,0 ng D4-D6/g) nach Extraktion und LVI-GC-MS-Analyse der erhaltenen Dichlormethan-Extrakte erfolgte analog zur M1-Methode. Dabei wurden unter Verwendung der Rxi 5Sil-MS-Trennsäule Wiederfindungen zwischen 85-96 % (VB 2-7 %) bei einer aufgestockten Siloxan-Konzentration von 2 ng/g

Vollblut ermittelt (s. Tabelle 16). Da die aufgestockte Siloxan-Konzentration von 0,3 ng D4-D6/g unterhalb der Bestimmungsgrenze der beiden Siloxane D4 und D5 mit $0,41 \pm 0,03$ ng D4/g bzw. $0,41 \pm 0,03$ ng D5/g lagen, konnte die Wiederfindung nur für das Siloxan D6 mit 95 % (VB 3 %) bestimmt werden. Die ermittelten Nachweisgrenzen für diese LVI-GC-MS-Methode liegen im mittleren pg D4-D6/g-Bereich (0,04-0,13 ng D4-D6/g Vollblut).

Tabelle 16: Wiederfindung und Nachweis- und Bestimmungsgrenze von D3-D6 in Vollblut für M2 unter Verwendung zweier unterschiedlicher Trennsäulen. Die angegebenen VB bei den Wiederfindungsraten wurden mit $P = 95\%$ und $n = 3$ berechnet.

Rxi 5Sil-MS	D3	D4	D5	D6
Wiederfindung (VB in %)				
bei 0,3 ng D4-D6/g	x	x	x	95 (3)
bei 2,0 ng D4-D6/g	x	92 (2)	85 (7)	96 (6)
Nachweisgrenze [ng/g Vollblut]	x	$0,12 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$
Bestimmungsgrenze [ng/g Vollblut]	x	$0,41 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,01$
Optima PXLB		D4	D5	D6
Wiederfindungsrate (VB in %)				
bei 0,3 ng D4-D6/g	x	81 (1)	62 (4)	94 (5)
bei 2,0 ng D4-D6/g	x	93 (1)	81 (3)	95 (5)
Nachweisgrenze [ng/g Vollblut]	x	$0,05 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
Bestimmungsgrenze [ng/g Vollblut]	x	$0,18 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$

Aufgrund einer starken Schwankung der Retentionszeit des Methylsiloxans D3³¹ (RSD 5-9 %) bei Injektion eines Dichlormethan-Extraktes der aufgestockten Vollblutproben konnte keine Quantifizierung des D3-Gehaltes vorgenommen werden. Eine Abhängigkeit der Retentionszeitschwankung von verschiedenen Parametern, wie beispielsweise Temperatur des Dichlormethan-Extraktes, konnte nicht beobachtet werden. Jedoch könnten Matrixeffekte im Glasliner zu Verdampfungs- und Anreicherungsprozessen führen, die bei Siloxan-Standardlösungen in reinem Dichlormethan nicht auftreten. Aus diesem Grund wurde das kleinste Homologe aus der LVI-GC-MS-Methode zur Analyse von Methylsiloxanen in Vollblutproben herausgenommen. Hinsichtlich der Wiederfindung zyklischer Siloxane nach Variante C (Lagerung in *crushed ice*/Kühlschrank) wurden unter Verwendung der Optima PXLB-Trennsäule nach LVI-GC-MS-Analyse der erhaltenen Dichlormethan-Extrakte vergleichbare Wiederfindungsraten (zwischen 81-95 % bei VB 1-5 %) wie beim Einsatz der M1-Methode bzw. bei Verwendung der Rxi 5Sil-MS-Trennsäule erreicht. Nur das Siloxan D5 weist bei einer kleineren aufgestockten Konzentration von 0,3 ng D5/g Vollblut eine schlechtere

³¹ Zu kürzeren, aber auch zu längeren Retentionszeiten.

Wiederfindung von lediglich 62 % auf. Auch die berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für das Cyclosiloxan D6 mit $0,03 \pm 0,01$ ng D6/g bzw. $0,10 \pm 0,02$ ng D6/g sind im gleichen Bereich wie die Grenzen die unter Verwendung der Rxi 5Sil-MS-Trennsäule mit der LVI-Methode ermittelt wurden. Mit einem Wassergehalt von 5 ppm im Dichlormethan³² gelangt bei der LVI-Technik (Injektionsvolumen 100 μ L) ein größerer Wasseranteil im Vergleich zu einer splitlosen Injektion von 1 μ L auf die Trennsäule. Hierbei kommt es zu einem Bindungsbruch der Si-O-Bindung des PDMS-Gerüsts und zur Bildung zyklischer Methylsiloxane [178]. Dies wird durch ein starkes *Peak-Tailing* im Chromatogramm deutlich. In Abbildung 23 sind die resultierenden EIC-Chromatogramme nach LVI-GC-MS-Analyse der Dichlormethan-Extrakte von aufgestockten Vollblutproben (mit 0,3 ng D4-D6/g) und Einsatz der beiden unterschiedlichen Trennsäulen dargestellt. Bei Verwendung der Rxi 5Sil-MS-Trennsäule ist ein starkes *Peak-Tailing* der zyklischen Methylsiloxane D4 (*Tailing*-Faktor 4,7) und D5 (*Tailing*-Faktor 1,9) gegenüber der Optima PXLB-Trennsäule zu beobachten. Die Phenylgruppen im PDMS-Gerüst und zusätzlich in den Seitenketten bei dieser Säule führt folglich zu einer Stabilisierung der stationären Phase und reduziert demzufolge die Bildung zyklischer Methylsiloxane durch einen oxidativen Abbau der stationären Phase.

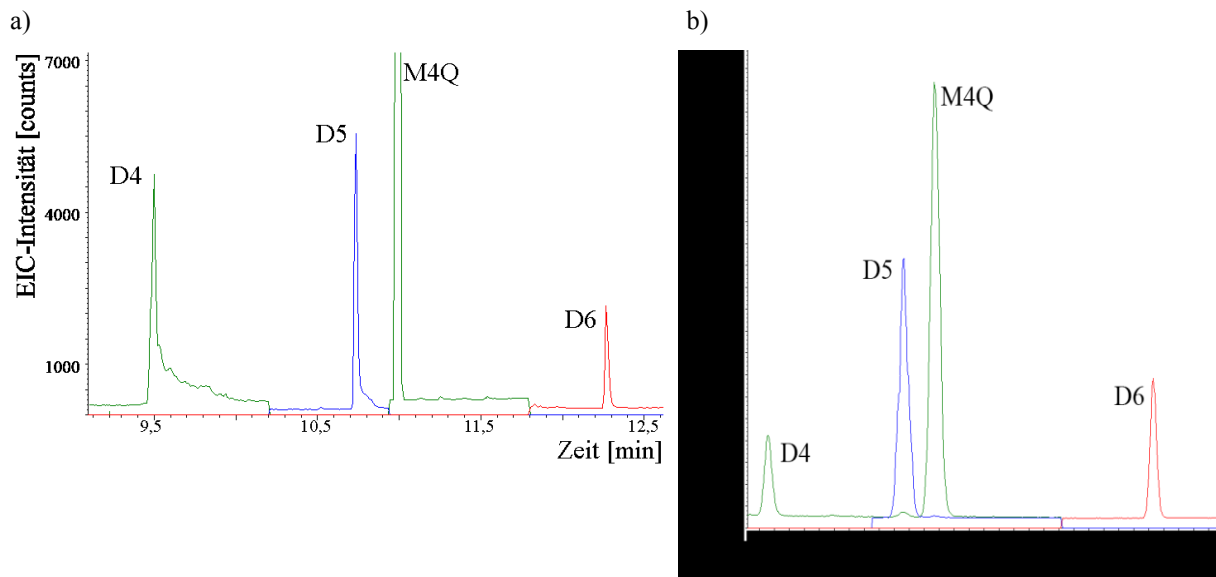


Abbildung 23: EIC-Chromatogramme nach LVI-GC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer mit 0,3 ng D4-D6/g aufgestockten Vollblutprobe unter Verwendung zweier unterschiedlicher Trennsäulen a) Rxi 5Sil-MS (0,25 μ m), b) Optima PXLB. Extrahierte Massenspuren für D4 und M4Q: m/z 281 (grün); D5: m/z 355 (blau); D6 m/z 341 (rot).

³² Für Dichlormethan (99,8 %, für HPLC stabilisiert mit Amylen) laut Hersteller Acros Organics, Geel, BEL

Die Verwendung der Optima PXLB-Trennsäule führt – wie bei der splitlosen GC-MS-Methode (vgl. Kap. 5.2.1.2) - zu einem Sensitivitätsgewinn von etwa einem Faktor 2 mit Nachweisgrenzen zwischen 0,04 und 0,05 ng D4-D5/g Vollblut. Die LVI-GC-MS-Analyse wurde bereits von WANG et al. zur Quantifizierung zyklischer Methylsiloxane in Umweltproben durchgeführt. Hierbei erreichte diese Arbeitsgruppe nach n-Pentan-Extraktion und LVI-GC-MS-Analyse bei Wiederfindungsraten von 65-114 % Bestimmungsgrenzen von 11-37 ng D4-D6/g in Sedimenten und Böden und 83-129 ng/g Biota [252].

Insbesondere in den biologischen Proben ist die von WANG et al. publizierte Bestimmungsgrenze um einen Faktor 1000 höher als die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Bestimmungsgrenze. Diese Sensitivitätssteigerung könnte auf das größere Injektionsvolumen (100 µL anstatt von 15 µL) wie auch auf die bessere Wiederholpräzision (1-5 % anstatt 6-26 %) zurückzuführen sein. Auf Basis einer splitlosen LVI-GC-MS-Methode und vorangehender Festphasenextraktion mit n-Hexan analysierten COMPANIONI-DAMAS et al. die zyklischen Methylsiloxane D3-D6 in Klärschlamm. Hier erzielte diese Arbeitsgruppe vergleichbare Bestimmungsgrenzen (0,1-0,4 ng D3-D6/g Klärschlamm) und Wiederholbarkeiten (< 15 %) bei Wiederfindungen von 90-95 % [256].

5.3 Zyklische Methylsiloxane im Kapselgewebe von Frauen mit Silikonbrustimplantaten

Um die bereits durch die GCxGC-MS aufgezeigte Diffusion zyklischer Methylsiloxane aus dem Silikongel durch die Elastomer-Hülle in das direkt um das Implantat liegende Gewebe quantitativ zu erfassen, wurden während der Operation des Patienten in der Nähe des Einschnitts Kapselgewebeproben entnommen. Diese wurden anschließend im Labor nach der validierten Methode M1 aufgearbeitet und mittels GC-MS analysiert (M1).

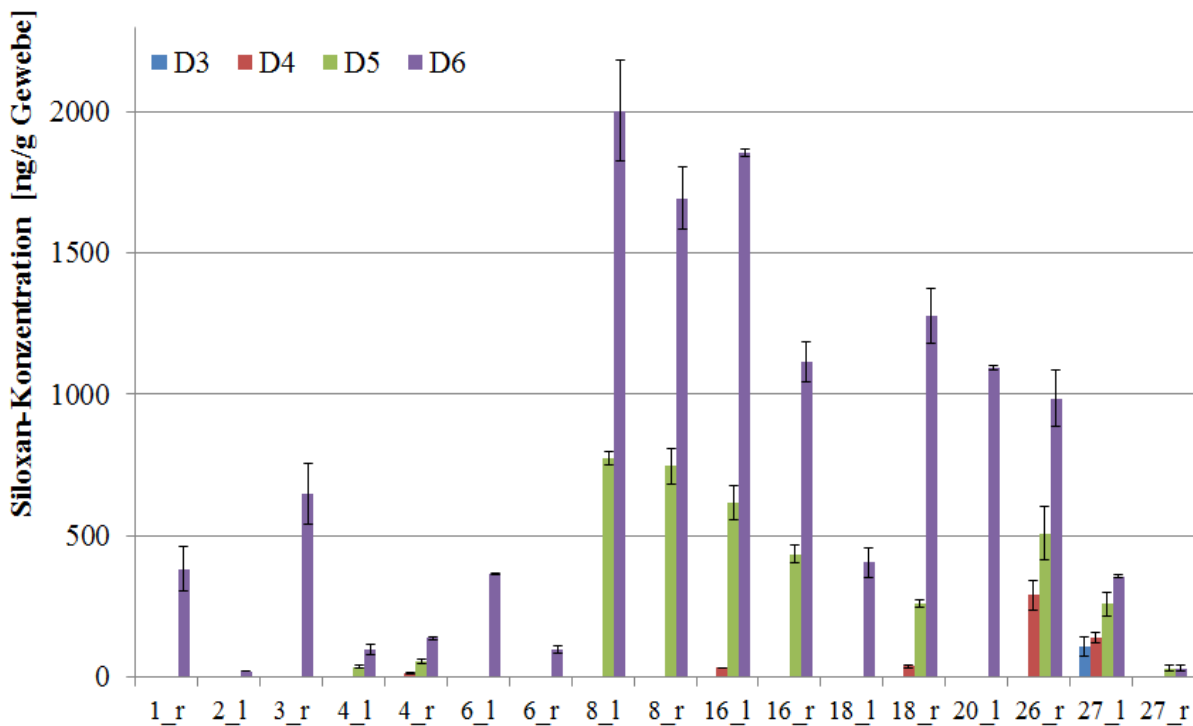
Im folgenden Abschnitt werden die ermittelten Siloxan-Gehalte in den Gewebeproben der Implantatträger mit dem intraoperativen Implantat-Befund verglichen. Zudem werden die Kapselgewebe-Konzentrationen von Frauen mit Implantaten unterschiedlicher Hersteller, u. a. den in der Kritik stehenden Rofil-Implantaten, gegenübergestellt. Anschließend wird ein Vergleich der mittels GC-Elektronenstoßionisation-MS ermittelten Methylsiloxan-Konzentrationen im Kapselgewebe mit den Ergebnissen vorgenommen, die mittels einer neuen Atmosphärendruck-Photoionisationsquelle (GC-APPI-Orbitrap-MS) gewonnen wurden. Im abschließenden Teil wird auf Basis von Waschexperimenten die Möglichkeit der Diffusion zyklischer Siloxane in die Gewebezellen näher untersucht.

5.3.1 Vergleich verschiedener Hersteller von Silikonbrustimplantaten

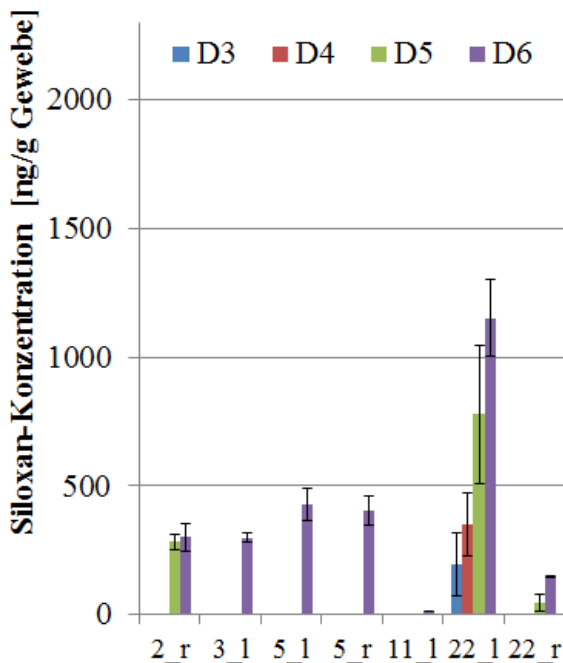
Für die Analyse zyklischer Methylsiloxane im Kapselgewebe von Implantatträgern wurden zwei Gewebeproben je Brustseite vereint und homogenisiert, mit Dichlormethan extrahiert und das erhaltene Extrakt jeweils dreifach mittels GC-MS (M1) analysiert. In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 63 Kapselgewebeproben von 40 Frauen mit Silikon- (n = 55), Bilumen- (n = 3), Hydrogel- (n = 4) und Bilumen-Hydrogel-Brustimplantaten (n = 1) untersucht. Die Implantate der Patienten waren von unterschiedlichen Herstellern: Rofil (n = 28), Mentor (n = 2), Allergan (n = 1), Polytech (n = 3), Silastic (n = 1), Nagotex (n = 4), Impax (n = 1). Da bei einigen Implantaten der Hersteller nach Explantation auf dem Implantat nicht mehr erkennbar war, wurden zusätzlich Kapselgewebeproben von Frauen mit unbekanntem SBI (n = 21) bzw. Hydrogel-Implantaten (n = 2) untersucht. Die Liegezeit der Implantate lag zwischen vier und 15 Jahren bei den Rofil-SBI, zwischen drei und 38 Jahren bei unbekanntem Herstellern sowie einem Jahr bis 24 Jahren bei anderen Herstellern.

Die Ergebnisse der GC-MS-Analysen der Kapselgewebeproben von Frauen mit bleeding (a; n = 17), intakten (b; n = 7) und defekten (c; n = 3) Rofil-SBI sind in Abbildung 24 dargestellt (Einzelwerte, s. Anhang Tabelle 23). Die angegebenen VB der erhaltenen D3-D6-Konzentrationen wurden bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 % und unter Durchführung einer Dreifachbestimmung berechnet. Insgesamt konnten in den Gewebeproben von Implantatträgern mit defekten gegenüber intakten Rofil-SBI höhere Siloxan-Konzentrationen (zwischen 1051 und 2022 ng D6/g im Vergleich zu 16 und 1153 ng D6/g Gewebe) und vermehrt kleinere Homologen (D3 und D4) analysiert werden (linke/rechte Brustseite, kurz _l/_r; Pat. Nr. 11_r, 20_r und 26_l). Mit Ausnahme der Kapselgewebeproben des Patienten Nr. 22_l wurde in den Gewebeproben bei intakten Rofil-SBI überwiegend D6 mit Konzentrationen kleiner der Nachweisgrenze (6 D6/g Gewebe) bis hin zu 1153 ng D6/g gefunden. In zwei Fällen konnte zusätzlich das Siloxan D5 mit Konzentrationen zwischen 282-778 ng D5/g Gewebe analysiert werden (Pat. Nr. 2_r und 22_r). Bei defekten Rofil-Implantaten wurden neben den erhöhten D6-Konzentrationen auch ein höherer Gehalt an D3-D5 (238-1010 ng D3-D5/g Gewebe) ermittelt. Ebenso wie bei den Patienten mit defekten Implantaten, wiesen die Gewebeproben der Patienten, die während der Operation eine bleeding-Flüssigkeit in der Implantattasche aufwiesen, erhöhte D5- (bis zu 774 ng/g bei Pat. Nr. 8) und D6-Gehalte (bis zu 2004 ng D6/g Gewebe bei Pat. Nr. 16_l) auf.

a)



b)



c)

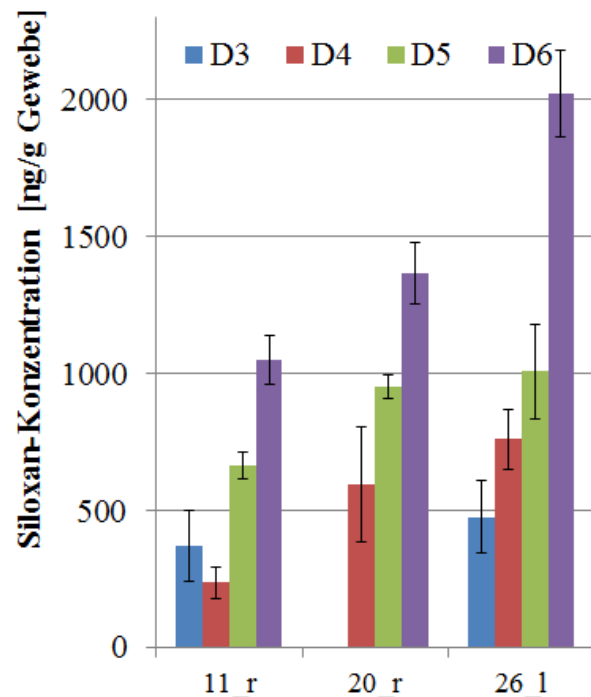


Abbildung 24: D3-D6-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Patienten mit SBI des Herstellers Rofil mit a) bleeding, b) intakten, c) defekten SBI. Die angegebenen VB der Siloxan-Konzentrationen wurden mit $P = 95\%$ und $n = 3$ berechnet.

In Kapselgewebeproben weitere Patienten mit bleeding-SBI konnten wiederum nur geringe D6-Konzentrationen bzw. keine D3-D5-Konzentrationen nachgewiesen werden (Pat. Nr. 1_r, 2_1, 3_r, 6_1/r, 18_1 und 20_1). Auch zwischen den Gewebeproben der linken und rechten

Seite eines Patienten wurden zum einen ähnliche Siloxan-Gehalte (Pat. Nr. 5, 8 und 16) ermittelt. Hingegen lagen in anderen Fällen deutliche Konzentrationsunterschiede in den Gewebeprobe der linken und rechten Brustseite vor (Pat. Nr. 18, 22, 27). Eine allgemeine Einordnung dieser Ergebnisse in die Kategorien defekt, bleeding und intakt ist folglich nur begrenzt möglich. Beispielsweise sind vergleichbare Siloxan-Konzentrationsverteilungen (D3-D6) sowohl in den Gewebeprobe bei defekten, als auch in einzelnen Fällen bei Vorlage eines intakten (Pat. Nr. 22_1) und zweier bleeding-Implantate (Pat. Nr. 26_r, 27_1) zu beobachten. Aufgrund der breiten Streuung der erhaltenen Siloxan-Gehalte in den Kapselgewebeprobe mit einzelnen Ausreißern ist eine Bildung der Mittelwerte nicht sinnvoll. Eine Tendenz mit der Vorlage höherer D6-Konzentrationen in Gewebeprobe bei defekten Rofil-SBI (Median 1368 ng D6/g Gewebe) und einem vergleichbaren D6-Gehalt bei Frauen mit intakten und bleeding-Implantaten wird jedoch sehr gut in einer Kastengrafik sichtbar (s. Abbildung 25). Hierbei liegt der Median der D6-Konzentration bei Vorlage von bleeding Implantaten bei 405 ng D6/g im Vergleich zu 354 ng D6/g Gewebe bei intakten Implantaten. Der Interquartilsabstand, der die Streuung der mittleren 50 % der Einzelwerte angibt, zeigt insbesondere für die D6-Gewebekonzentrationen bei Vorlage von bleeding-SBI im Vergleich zu intakten SBI eine zu höheren Konzentrationen verschobene unsymmetrische Verteilung der einzelnen Werte.

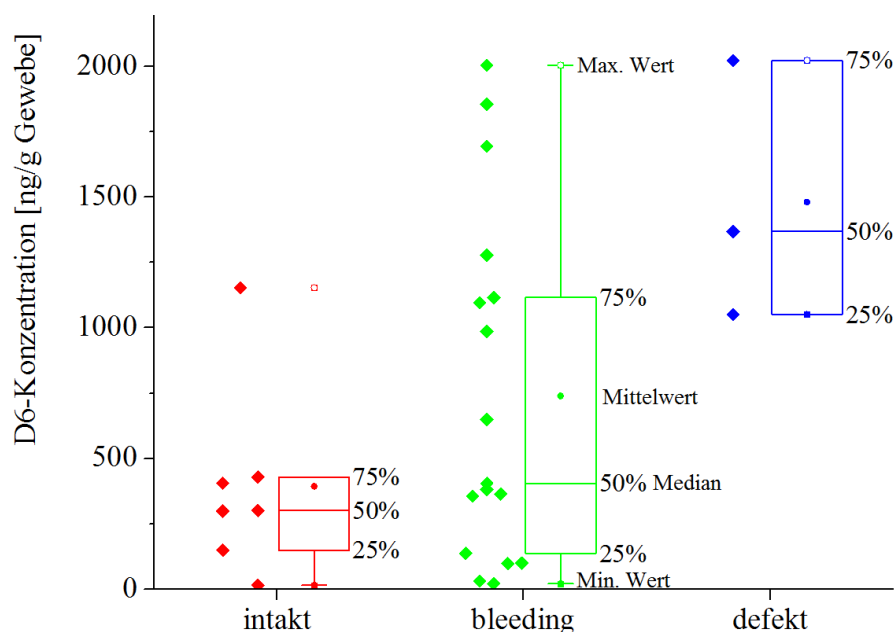
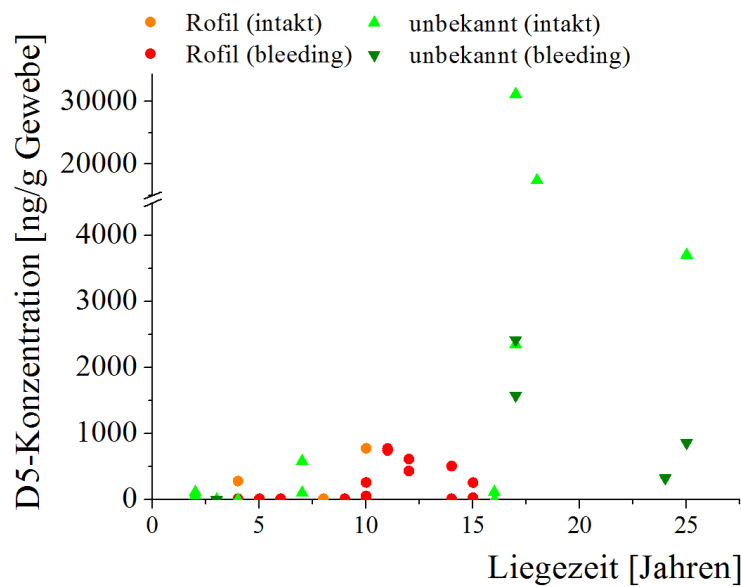


Abbildung 25: Kastengrafik der ermittelten D6-Konzentrationen [ng/g] in den Kapselgewebeprobe von Frauen mit Rofil-Implantaten. Jeweils links die einzelnen Werte (◇ rot: intakt; grün: bleeding und blau: defekt), davon rechts die Box-Plots mit Median, Interquartilsabstand bei 25-75%, Mittelwert (•) und niedrigste (Min. Wert) und höchste D6-Konzentration (Max. Wert, o).

Im Vergleich zu den Rofil-Implantaten konnten grundsätzlich für die Kapselgewebeproben von Frauen mit SBI unbekannter bzw. anderer Hersteller vergleichbare Tendenzen mit einer erhöhten D6-Konzentration bei Vorlage von defekten SBI gegenüber bleeding- bzw. intakten SBI beobachtet werden. Auch wurde vermehrt D4 und D5 in den Proben von Patienten mit defekten SBI beobachtet. Im Gegensatz zu den Patienten mit Rofil-SBI liegen in dieser Implantat-Gruppe mehr Ausreißer vor. Allerdings konnten in diesen Proben bei Vorlage von intakten, bleeding und defekten SBI bis zu 40- bis 100-fach höhere Siloxan-Gehalte mit maximalen Konzentrationen von ca. 10 µg D3/g, 33 µg D4/g, 58 µg D5/g und 81 µg D6/g Gewebe ermittelt werden (Einzelwerte s. Anhang Tabelle 24 und Abbildung 41). Das Siloxan mit dem höchsten Dampfdruck D3 wurde auch in dieser Implantat-Gruppe nur vereinzelt in Kapselgewebeproben von Frauen mit intakten (1 von insgesamt 12) und bleeding-SBI (2 von insgesamt 6) quantifiziert. In vier von insgesamt zehn Kapselgewebeproben von Frauen mit defekten SBI unbekannter und anderer Hersteller konnten hingegen D3-Gehalte zwischen 271-1362 ng/g Gewebe ermittelt werden. Neben den Kapselgewebeproben bei Vorlage unbekannter SBI-Herstellern wurden auch die Kapselgewebeproben von Frauen mit intakten SBI der beiden Hersteller Allergan und Mentor auf ihren Siloxan-Gehalt hin untersucht (n = 3, Pat. Nr. 21_1, 28). Bereits nach einer Liegezeit von ca. zwei bis vier Jahren konnten Gewebe-Konzentrationen zwischen 20-423 ng D4-D6/g und damit vergleichbare Siloxan-Gehalte ermittelt werden, die auch in den Gewebeproben bei Implantation eines in der Kritik stehenden Rofil-SBI vorkamen. Auch wenn höhere Konzentrationen an D4-D6 in dem SBI-Gel der Implantate des Herstellers Rofil gegenüber Mentor und Allergan in der Literatur genannt werden [72, 310, 312], so konnte in der hier analysierten Probe keine eindeutige Korrelation zwischen dem Hersteller des eingesetzten SBI und der Siloxan-Konzentration im Kapselgewebe festgestellt werden. Die Analyse zyklischer Siloxane in den Kapselgewebeproben von Patienten mit intakten und bleeding Bilumen-Implantaten der Hersteller Nagotex und Impax mit Konzentrationen zwischen 136-889 ng D5 und D6/g Gewebe verdeutlicht (n = 3, Pat. Nr. 21_1, 28_l/r), dass auch bei diesen Misch-Implantaten eine Diffusion dieser Verbindungen in das umliegende Gewebe erfolgt. Im Kapselgewebe von Frauen mit intakten und defekten Hydrogel-Implantaten, die aus einer Silikonhülle mit einem mit der Zeit aufquellenden Material im Kern bestehen [85, 337], konnten hingegen nur geringe D6-Konzentrationen von ca. 70 ng/g Gewebe ermittelt werden (n = 4, Pat. Nr. 37 und 40; Einzelwerte s. Anhang Tabelle 25). In diesen Fällen könnte somit nur eine Kontamination bedingt durch das Silikon der Elastomer-Hülle vorliegen.

Um eine mögliche Korrelation zwischen den ermittelten Methylsiloxan-Gehalten in den Kapselgewebeprobe und der Liegezeit der Implantate zu identifizieren, wurden diese gegen einander aufgetragen (s. Abbildung 26). Da sowohl in den Gewebeprobe von Frauen mit intakten und bleeding-SBI des Herstellers Rofil sowie andere bzw. unbekannter Hersteller maßgeblich höhere D6- und vermehrt höhere D5-Konzentrationen ermittelt werden konnten, wurde diese beiden Siloxane zur Betrachtung herangezogen. Hierbei wird deutlich, dass oftmals höhere D5- und D6-Konzentrationen im Kapselgewebe auftreten, wenn die Liegezeit der Rofil-SBI länger als zehn Jahre betrug (orange bzw. rot dargestellt).

a)



b)

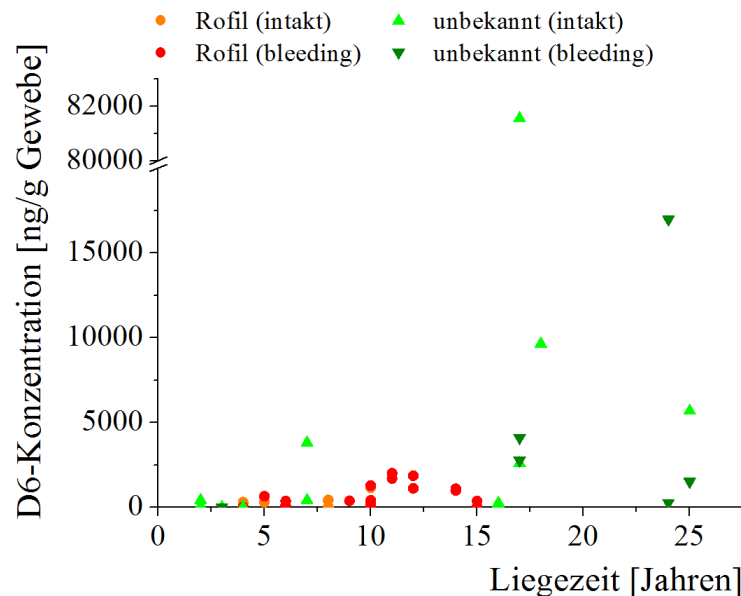


Abbildung 26: Auftragung der Konzentrationen [ng/g] von a) D5 und b) D6 in Kapselgewebeprobe von Frauen mit intakten und bleeding SBI des Herstellers Rofil sowie weiterer bzw. unbekannter SBI-Hersteller gegen die Liegezeit der jeweiligen Implantate.

Es wurden jedoch auch in den Kapselgewebeproben der Implantatträger, deren Rofil-SBI die 14 bzw. 15 Jahre implantiert waren, niedrigere D5- und D6-Konzentrationen ermittelt. Ein Vergleich für diesen Zeitraum (Liegezeit 10-15 Jahre) mit Gewebekonzentrationen anderer Hersteller ist nicht möglich. Um ein vielfaches höhere D5- und D6-Gewebekonzentrationen treten bei Liegezeiten von unbekanntem SBI-Herstellern über 15 Jahren auf. Dieser Zusammenhang könnte nicht nur auf eine langsame Diffusion in das Gewebe, sondern auch auf eine bevorzugte Akkumulation dieser beiden Siloxane hindeuten. Es ist an dieser Stelle jedoch anzumerken, dass die Anzahl der untersuchten Kapselgewebeproben von Implantatträgern zu gering ist, um eine statistisch signifikante Aussage über diesen Zusammenhang machen zu können.

Neben der Liegezeit, die die Siloxan-Gehalte im Kapselgewebe beeinflussen könnten, könnte auch die Inhomogenität des Kapselgewebes einen maßgeblichen Einfluss auf die Siloxan-Konzentration haben. Zumal die einzelnen Gewebestücke nicht nur unter den Patienten, sondern auch zwischen den einzelnen Proben desselben Patienten Abweichungen in der Gewebedicke und Festigkeit aufwiesen. Histologische Untersuchungen zu Silikonmigration in das Kapselgewebe in Abhängigkeit von der Dicke und Homogenität dieses Gewebes sowie der Liegezeit der Implantate wurden bereits vor fast 20 Jahren von BEEKMANN et al. durchgeführt. In dieser Studie wurde in ca. 95 % der untersuchten Kapselgewebeproben (n = 71) Silikon vorgefunden. Dabei wurde keine Korrelation zum vorliegenden Implantat-Status, jedoch eine signifikante Erhöhung des Silikons im Gewebe bei Liegezeiten über zwölf Jahren beobachtet [93] und entsprechen damit den oben beschriebenen Tendenzen. Zusätzlich fand diese Arbeitsgruppe signifikant weniger Silikon bei Vorlage von kalzifiziertem Gewebe [93]. Diese Beobachtung konnte mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. So wurden in der vorliegenden Untersuchung im kalzifizierten Kapselgewebe des Patienten Nr. 39 mit einem bleeding Bilumen-Implantat vergleichbare D5- und D6-Konzentrationen quantifiziert (136 bzw. 445 ng/g Gewebe) wie bei dem Patienten Nr. 38 der ein intaktes Bilumen-Implantat und eine normale Festigkeit des Kapselgewebes hatte (zw. 196-889 ng D5-D6/g Gewebe).

Das Diffusionsverhalten von niedermolekularen Silikonen (D4-D20, L7-L20) aus einem intakten SBI in ein u. a. lipidreiches Medium (Sojaöl) bei 37 °C wurde von LYKISSA et al. untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden in dieser Studie die zyklischen Siloxane D4-D8 mit der höchsten Konzentration im Medium³³ ermittelt [97]. Niedermolekulare zyklische Methylsiloxane D3-D7 als Indikator für die Diffusion von Silikon-

³³ Postulierte Diffusionsrate bei einem 250 g SBI: 10 mg/Tag (bezogen auf die Gesamtheit der niedermolekularen Silikone) [97].

material nach Injektion eines Silikongel-Destillats und der darauffolgenden Akkumulation in verschiedene Organe, in Lymphknoten und ins Fettgewebe wurden zudem in einer Tierstudie untersucht [9]. Vergleichbar zu den Ergebnissen der Kapselgewebeprobe der vorliegenden Arbeit, wurden D5 und D6 in dieser Tierstudie auch noch ein Jahr nach Exposition in den Organen wiedergefunden. Diese selektive Akkumulation korrelieren KALA et al. mit einer erhöhten Persistenz von D5 und D6 gegenüber D4 [9]. Die Akkumulation niedermolekularer Siloxane (D4-D6, L8-L10) in das Bauchfett von Arbeitern einer Silikon-fabrik in China sowie die Hintergrundbelastung durch die Verwendung u. a. von Körperpflegeprodukten einer Kontrollgruppe wurde von XU et al. untersucht. Dabei ermittelte diese Arbeitsgruppe erhöhte Siloxan-Gehalte von 36-306 D4-D6 ng/g Bauchfett bei den Mitarbeitern im Gegensatz zu der allgemeinen Bevölkerung mit 3-141 ng/g Bauchfett [217]. Erste Untersuchungen zur internen Exposition von Frauen mit SBI wurden von FLASSBECK et al. durchgeführt. In dieser Studie konnten die zyklischen Siloxane D4-D6 eindeutig als Indikator für das Gel-Bluten mit Konzentrationen zwischen 637-1340 D4-D6 ng/g gegenüber 31-146 ng/g Fettgewebe bei intakten SBI identifiziert werden. Diese Konzentrationsbereiche stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Siloxan-Gewebekonzentrationen überein. Diese Arbeitsgruppe konnte jedoch weder eine Korrelation der Siloxan-Konzentrationen zum SBI-Status, noch das vermehrte Auftreten einer Siloxan-Verbindung, wie hier das D6, beobachten [7].

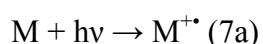
5.3.2 Vergleich von GC-EI-MS und GC-APPI-MS zur Analyse zyklischer Methylsiloxane

Die Sensitivität einer Analysemethode kann nicht nur, wie bereits im Kap. 5.2 gezeigt, durch die Extraktion- oder die Injektionsbedingungen beeinflusst werden, sondern auch bei der Kopplung mit einem Massenspektrometer durch die Ionisierungseffizienz der einzelnen Analyten.

Aufgrund des breiten Spektrums ionisierbarer Substanzklassen und der Möglichkeit, über den Abgleich mit MS-Datenbanken unbekannte Substanzen zu suchen, wird die Elektronenstoßionisation bei der Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie am häufigsten eingesetzt [263, 338]. Bei dieser Ionisierungstechnik werden die von der GC-Säule eluierenden Analyten im Vakuum durch den Beschuss mit Elektronen mit einer Energie von 70 eV ionisiert und zusätzlich fragmentiert [262, 339]. Im Gegensatz zu dieser harten Ionisierungstechnik, wo das Radikalkation des Moleküls ($M^{+\bullet}$) im MS-Spektrum häufig nicht mehr auftritt, können bei weichen Ionisierungstechniken, wie im Vakuum die chemische

Ionisation mit z. B. Methan, coeluiierende Analyten über das Molekülion ermittelt werden [263]. Die chemische Ionisierung der von einer GC-Kapillare eluierenden Analyten unter Atmosphärendruck (engl. *Atmospheric pressure ionization*, API) und die anschließende Überführung ins Vakuum zum Massenspektrometer, hier ein Quadrupol-MS, wurde bereits 1973 von HORNING et al. realisiert [340]. Eine weitere Variante der API stellt die Photoionisation dar (engl. *Atmospheric pressure photoionization*, APPI), die bereits Mitte der 1980er Jahre von REVEL'SKII et al. in Verbindung mit einem Massenspektrometer zur Detektion von Analyten in der Gas- und Flüssigphase eingeführt wurde [341, 342]. Einen vermehrten Einsatz sowie die kommerzielle Verwendung im Bereich der HPLC-MS-Kopplung erfolgt erst nach der Wiedereinführung im Jahr 2000 von SYAGE & EVANS [343] und ROBB et al. [344]. Seit 2003 der Veröffentlichung von REVELSKY et al. findet die APPI auch im GC-MS-Bereich zunehmend ihre Anwendung [345]. In dieser Arbeit wurde eine neuartige GC-APPI Ionenquelle eingesetzt, die speziell zur Kopplung von Orbitrap-Massenanalysatoren entwickelt wurde [346].

Bei der APPI erfolgt die direkte Photoionisation des Analyten durch Übertragung eines Photons ($h\nu$) unter Zuhilfenahme einer Krypton-Entladungslampe. Hierbei werden nur Analyten (M) ionisiert, deren Ionisierungspotential (engl. *ionization energy*, I.E.) unterhalb der Energie der emittierten UV-Photonen von 10 eV und 10,6 eV liegt (s. Gleichung 7a). Über Zusammenstöße des Radikalkations mit weiteren Molekülen, die während des Ionisationsprozesses in der Quelle vorliegen, können durch Wasserstoffabstraktion zusätzlich Wasserstoff-Addukte ($[M+H]^+$) gebildet werden (s. Gleichung 7b) [347, 348].



Typische Lösungsmittel, die bei der GC-Analyse eingesetzt werden, weisen Ionisierungsenergien oberhalb von 10 eV auf (I.E.: Dichlormethan 11,3 eV [349]; Methanol: 10,8 eV [350]; n-Hexan: 10,1 eV [349]) und werden nicht durch direkte Photoionisation ionisiert. Da bisher keine Analysen zyklischer Methylsiloxane auf Grundlage der APPI veröffentlicht wurden, gibt es in der Fachliteratur nur wenige Angaben zu den Ionisierungspotentialen von Methylsiloxanen. Hierbei ist eine Zunahme des ersten Ionisierungspotentials mit der Kettenlänge der linearen Methylsiloxane von 9,50-9,88 eV für Hexamethyldisiloxan [351–353] und 10,04 eV bzw. 10,24 eV für das Tri- und Tetrasiloxan [354] zu beobachten. Für die beiden zyklischen Methylsiloxane D3 und D4 werden hingegen nur das zweite Ionisationspotential mit 13,83 eV für D3 und 13,73 eV für D4 angegeben [354]. Basierend auf

diesen Werten könnte eine direkte Ionisierung der zyklischen Methylsiloxane mittels APPI aufgrund des zu hohen zweiten Ionisationspotentials von D3 und D4 nicht möglich sein.

Die Injektion eines 50 µg D3-D6/L bzw. 100 µg D3-D6/L Siloxan-Standards in Dichlormethan und die anschließende Analyse mittels GC-APPI-Orbitrap-MS bestätigt diese Hypothese nur zum Teil. Im resultierenden TIC-Chromatogramm wurde für die beiden Siloxane D3 und D4 jeweils ein Peak beobachtet, jedoch resultierte kein konzentrationsabhängiger Signalanstieg (bezogen auf D3) bzw. erst bei einer Konzentration von 500 µg D4/L des D4-Standards. Für die beiden höheren Homologen D5 und D6 hingegen ist eine Analyse mittels GC-APPI-MS möglich.

Zur Analyse zyklischer Siloxane D5 und D6 bei Photoionisation der Analyten unter Atmosphärendruck und anschließender massenspektrometrischer Detektion mittels Orbitrap-MS wurde im ersten Schritt die Temperatur der Ionenquelle bei konstantem Säulenfluss (1 mL/min) und *make-up* Gasfluss (0,65 mL/min) optimiert. Hierbei wurde ein 50 µg D5-D6/L-Siloxan-Standard mittels GC-APPI-MS analysiert und nur die Quelltemperatur zwischen 230 °C, 250 °C und 270 °C variiert. Für die Wiederholpräzision wurden die Messungen je Temperatur dreimal wiederholt. Entgegen der Erwartungen verweisen die resultierenden APPI-Massenspektren beider zyklischen Siloxane auf eine Fragmentierung. Bei gleicher Quelltemperatur (230 °C) treten äquivalente Fragmente in dem EI- und APPI-Massenspektrum des Siloxans D6 ($[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]_6$) mit den m/z 429 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+ = [\text{Si}_6\text{O}_6\text{C}_{11}\text{H}_{33}]^+$), m/z 341 ($[\text{Si}_5\text{O}_5\text{C}_8\text{H}_{25}]^+$) und m/z 207 ($[\text{Si}_3\text{O}_3\text{C}_5\text{H}_{15}]^+$) auf (s. Abbildung 27 a und 27b). Im Vergleich zum EI-Massenspektrum kommt es in der Atmosphärendruck-Ionenquelle zu einer Wasser-Addukt-Bildung, woraufhin die m/z 255,045 ($[\text{Si}_3\text{O}_3\text{C}_5\text{H}_{15} + \text{H}_2\text{O}]^+$) und m/z 359,301 ($[\text{Si}_5\text{O}_5\text{C}_8\text{H}_{25} + \text{H}_2\text{O}]^+$) detektiert wurden.

Der Basispeak im APPI-MS-Spektrum ist nicht – wie im EI-Spektrum – das hochfragmentierte $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ -Fragment (m/z 73), sondern das Wasser-Addukt des Molekülions $[\text{Si}_3\text{O}_3\text{C}_5\text{H}_{15}]^+$. Auch für das Siloxan D5 kommt es zu einer Fragmentierung in der APPI-Quelle. Der Basispeak ist, wie im EI-MS-Spektrum das m/z 355 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+ = [\text{Si}_5\text{O}_5\text{C}_9\text{H}_{27}]^+$) (Vergleich s. Anhang Abbildung 42). Bei einer Erhöhung der Quelltemperatur von 230 °C auf 270 °C resultiert für das D6 eine Verschiebung der relativen Intensitäten der einzelnen Fragmente. Die Fragmente mit m/z 207,034 (von 53 auf 45 %), m/z 341,021 (von 38 auf 34 %) und m/z 429,092 (von 55 auf 25 %) erfahren eine Abnahme der relativen Intensität, hingegen ist für m/z 329,336 eine deutliche Zunahme der relativen Intensität von 15 % auf 85 % zu beobachten.

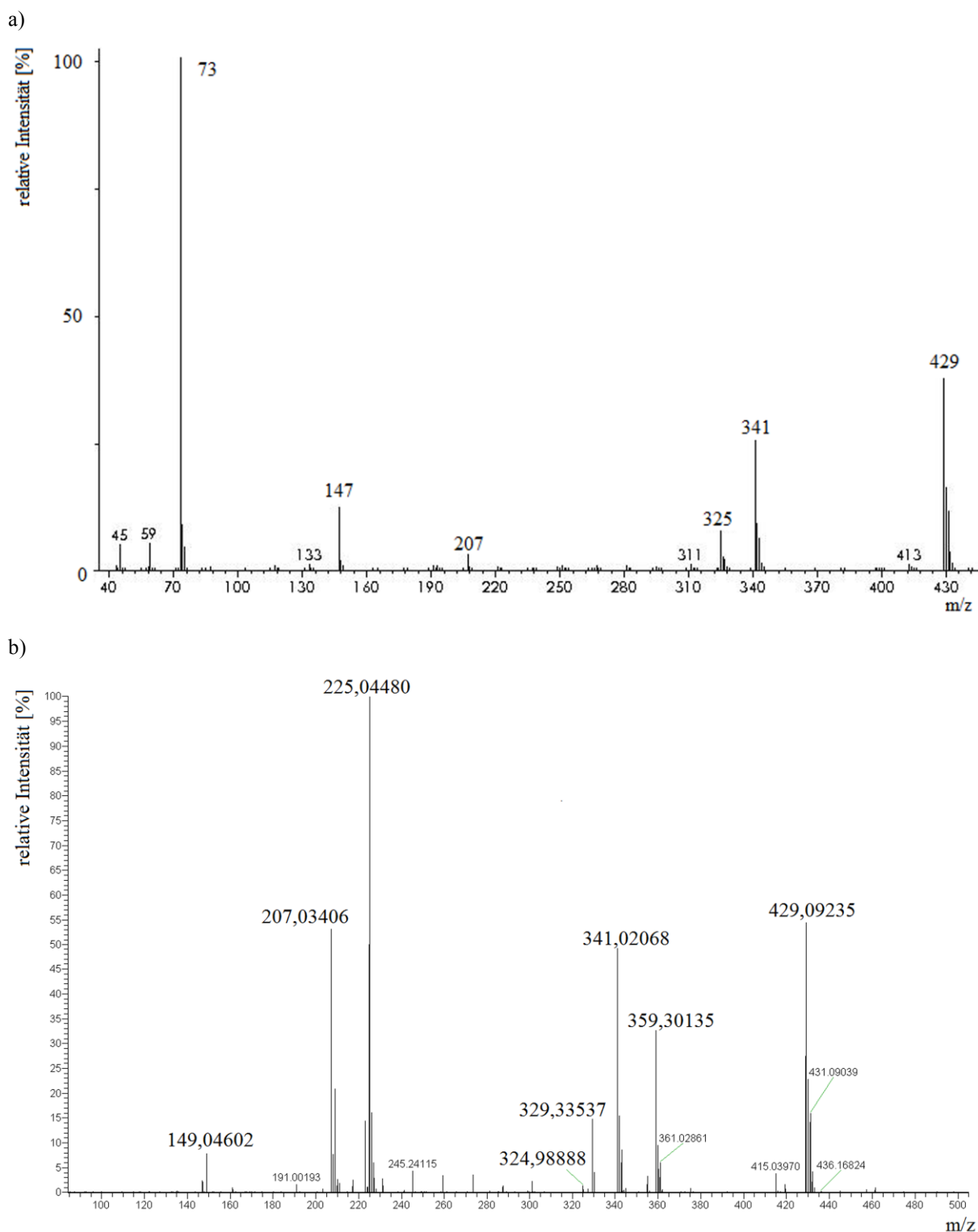


Abbildung 27: Nach GC-MS-Analyse erhaltene D6-Massenspektren bei einer Temperatur der Ionenquelle von 230 °C a) EI-Quadrupol-MS-Spektrum (m/z-Bereich 40-500), b) APPI-Orbitrap-MS-Spektrum (m/z-Bereich 50-500). Nach Subtraktion des Hintergrundes.

In Anbetracht der deutlichen Verschiebung der relativen Intensitäten der D6-Fragmente im Massenspektrum in Abhängigkeit von der Temperatur der Ionenquelle (D5 zeigte nur bei 270 °C eine Zunahme des m/z 329,336) erfolgte die Bestimmung der optimalen Quell-

temperatur anhand der Sensitivität der GC-APPI-MS-Analyse. Hierzu wurden die analytischen Grenzen durch mehrfache Analyse einer 5- bzw. 6-Punkt-Kalibrationsreihe zwischen 10 und 200 µg D5-D6 µg/L (10, 20, 30, 50, 100, 150 und 200 µg/L; n = 2) nach der Kalibriergeradenmethode (DIN 32645 [15]) bestimmt. Um die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Bezug auf die Quelltemperatur und mit den Ergebnissen, die mittels GC-EI-qPol-MS generiert wurden, vergleichen zu können, erfolgte die Quantifizierung der Siloxane anhand der extrahierten Massenbereiche m/z 355,0221 bis 355,1222 für D5 und 340,97188 bis 341,06779 für D6 (bei EI: D5 m/z 355 und D6 m/z 341). In Abhängigkeit von der Quelltemperatur wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Konzentrationsbereichen zwischen 8-38 µg D5-D6/L und 26-108 µg D5-D6/L in Dichlormethan ermittelt (s. Tabelle 17). Insbesondere für eine Quelltemperatur von 250 °C können um einen Faktor 1,5-2 niedrigere Nachweisgrenzen von 19 µg D5/L bzw. 8 µg D6/L Dichlormethan, gegenüber 38 µg D5/L bzw. 12 µg D6/L Dichlormethan bei einer Temperatur von 270 °C, erreicht werden. Mit Bestimmungsgrenzen von 3-5 µg D5-D6/L Dichlormethan, die mittels Elektronenstoßionisation im Vakuum (M1) erhalten wurden, zeigt die APPI-MS mit einer optimalen Quelltemperatur von 250 °C eine um Faktor 10 schlechtere Sensitivität.

Tabelle 17: Vergleich der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in für D5 und D6 µg/L in Dichlormethan in Abhängigkeit von der Temperatur der APPI-Quelle und der verwendeten Trennsäulen.

Parameter	D5		D6	
	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]
Quelltemperatur				
230 °C	25 ± 3	65 ± 8	11 ± 2	28 ± 4
250 °C	19 ± 1	53 ± 4	8 ± 1	26 ± 2
270 °C	38 ± 9	108 ± 15	12 ± 3	34 ± 7
Trennsäule				
TR Dioxin	19 ± 1	53 ± 4	8 ± 2	26 ± 2
Optima PXLB	32 ± 7	87 ± 12	22 ± 5	56 ± 9
SLB-IL60	25 ± 3	69 ± 8	8 ± 1	23 ± 2

Neben der Quelltemperatur wurden zusätzlich drei unterschiedliche Trennsäulen analog zur Beschreibung in Kap. 5.2.1.2 in Bezug auf die Sensitivität miteinander verglichen. Die Bestimmung der analytischen Grenze erfolgte, wie oben beschrieben, anhand einer 5- bzw. 6-Punkt-Kalibrationsreihe zwischen 10 und 200 µg D5-D6 µg/L unter Anwendung der Kalibriergeradenmethode. Dabei wurde kein großer Sensitivitätsunterschied zwischen der TR Dioxin von Thermo mit einer Filmdicke der stationären Phase von 0,10 µm gegenüber der ionischen Trennsäule festgestellt. Nur bei dem Einsatz der Optima PXLB, die bei der

Methode M1 die geringsten Siloxan-Nachweisgrenzen und kleinsten Standardabweichungen der Peakflächen für die Siloxane (RSD < 5%) aufwies, wurde eine Erhöhung der Nachweisgrenze für das Siloxan D5 und D6 um den Faktor 1,5-2 beobachtet. Diese Abweichung könnte u. a. auf den größeren Peakbreiten (D6: 0,4 min anstatt 0,2 min) bei einer relativen Standardabweichung der Peakflächen kleiner 10 % basieren. Da bei Injektion eines Dichlormethan-Extraktes einer Kapselgewebeprobe für die TR Dioxin zunehmend ein *Peak-Fronting*³⁴ beobachtet wurde, erfolgte der Vergleich hinsichtlich der quantitativen GC-EI- gegenüber GC-APPI-MS-Analyse von D5 und D6 unter Verwendung der ionischen Trennsäule bei einer Temperatur der Ionenquelle von 250 °C. Hierzu wurden die aufbereiteten Dichlormethan-Extrakte der drei Patienten Nr. 26, 28 und 29 direkt im Anschluss an die GC-EI-MS-Analyse mittels GC-APPI-MS über eine externe Kalibrierung (zwischen 10-150 µg D5-D6/L) unter Verwendung desselben internen Standards M4Q quantifiziert. Bei einer relativen Standardabweichung des internen Standards von 13 % wurden mit der GC-APPI-MS-Analyse vergleichbare D5- und D6-Gehalte in den jeweiligen Kapselgewebeproben erhalten, wie mit der GC-EI-MS-Analyse (s. Abbildung 28a und 28b, Einzelwerte s. Anhang Tabelle 26).

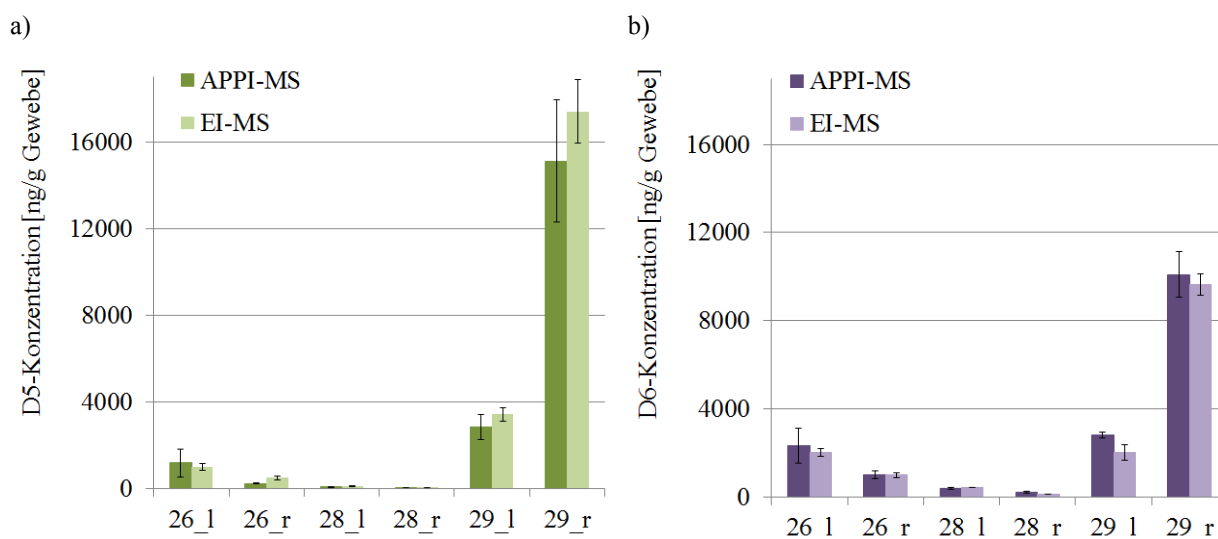


Abbildung 28: Vergleich der mittels GC-APPI-Orbitrap-MS (dunkel) und GC-EI-qMS (M1: hell) ermittelten Siloxan-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Implantatträgern. Vergleich der a) D5-Konzentrationen, b) D6-Konzentrationen. Die angegebenen VB wurden mit P = 95 % und n = 3 berechnet.

Lediglich bei Vorlage höherer Konzentrationen liegen die gemittelten Konzentrationen der Kapselgewebeproben nach Dreifachbestimmung der Dichlormethan-Extrakte für D5 bei der

³⁴ Nach IUPAC: Abweichung von der idealen Gaußkurve bei Vorlage eines steileren Peakabfalls als Peakanstiegs.

APPI-MS etwas unterhalb der mittels GC-EI ermittelten Konzentrationen (s. Abbildung 28a). Hingegen werden mit der APPI-MS gegenüber der EI-MS etwas höhere D6-Konzentrationen in den Dichlormethan-Extrakten der Kapselgewebeproben ermittelt.

Zusammengefasst werden mittels GC-APPI-MS-Analyse gegenüber der GC-EI-MS-Analyse vergleichbare D5- und D6-Gehalte in den Kapselgewebeproben ermittelt, allerdings ist die auf der APPI-basierte Methode weniger sensitiv als die konventionelle Elektronenstoßionisation.

5.3.3 Untersuchungen zur Diffusion zyklischer Methylsiloxane in die Gewebezellen

Die bis in den $\mu\text{g/g}$ -Bereich ermittelten Siloxan-Gehalte in dem Kapselgewebe von Implantatträgern führen zu der Frage inwieweit diese Verbindungen durch die Zellmembran in die Zellen diffundieren können. Insbesondere im Hinblick auf das als reproduktionstoxisch eingestufte D4 (nach D4-Exposition über Inhalation bei weiblichen Ratten, ab $300 \mu\text{g D4/g}$ [18, 238]) und die entzündliche Wirkung von D4 und D5 könnte eine mögliche Zellgängigkeit für die Implantatträger von toxikologischer Relevanz sein.

Die Diffusion zyklischer Methylsiloxane durch die Haut wurde von JOVANOVIĆ et al. anhand von Tierexperimenten untersucht. Hierbei ermittelte diese Arbeitsgruppe eine ^{14}C -D4- bzw. ^{14}C -D5-Aufnahme von bis zu 0,5 % der aufgetragenen Gesamtdosis [210]. Auch die indirekte Zellgängigkeit von D4 und D5 wurde anhand unterschiedlicher Metabolom-Studien nach inhalativer, oraler bzw. intravenöser Aufnahme dieser Substanzen untersucht [11, 12, 177, 199, 233]. Dabei konnte von MCKIM et al. gezeigt werden, dass bei Ratten nach mehrfacher Inhalation von D4 eine reversible Lebervergrößerung und eine signifikante Induktion des Enzyms Cytochrom P450 auftritt [233]. Mit Tierstudien an sensibilisierten Meerschweinchen konnten KOSSOVSKY et al. verdeutlichen, dass intrazelluläres PDMS zu einer Immunreaktion führt [355].

In der vorliegenden Arbeit wurden im ersten Schritt - zur Überprüfung, ob zyklische Siloxane an der Geweboberfläche adsorbieren - Wasch-Experimente mit dem Kapselgewebe von Implantatträgern durchgeführt. Dabei wurden zum einen die zwei Kapselgewebestücke vor dem Homogenisieren zweimal mit Dichlormethan gewaschen (jeweils 0,5, 1 und 2 min) und dann homogenisiert und extrahiert. Zum anderen wurde ein nicht vorher mit Dichlormethan gewaschenes Kapselgewebestück derselben Brustseite (gleicher Patient) direkt homogenisiert und extrahiert. Die erhaltenen Dichlormethan-Extrakte, sowie die Waschlösungen wurden jeweils dreimal mittels GC-MS analysiert. Diese Wasch-Experimente wurden für jeden Ansatz (Dauer des Waschvorganges 0,5 bis 2 min) zweifach durchgeführt. Die berechnete

prozentuale Verteilung zeigt in Abbildung 29, wobei die ermittelten Siloxan-Gehalte der Waschlösung und des vorbehandelten Kapselgewebestückes auf die Siloxan-Konzentrationen des direkt homogenisierten Gewebestückes (100 %) bezogen wurden (Einzelwerte s. Anhang Tabelle 27). Anhand der prozentualen Verteilung der D3-D6-Konzentrationen in der Waschlösung und im unbehandelten Gewebestück wird deutlich, dass die Konzentration in der Waschlösung mit zunehmender Waschdauer steigt. Bei einer Waschdauer von einer halben Minute wurden keine zyklischen Siloxane in der Waschlösung nachgewiesen (D3-D5) bzw. nicht quantifiziert (D6 kleiner LOQ). Im korrespondierenden vorbehandelten Kapselgewebestück wurden hingegen Siloxan-Gehalte von 50-113 % bezogen auf das direkt homogenisierte Gewebestück derselben Brustseite ermittelt. Diese Abweichung von den theoretisch erwarteten 100 %, könnte auf die Inhomogenität der Kapselgewebeprobe und der damit verbunden ungleichmäßigen Verteilung der zyklischen Siloxane im Gewebe zurück zu führen sein.

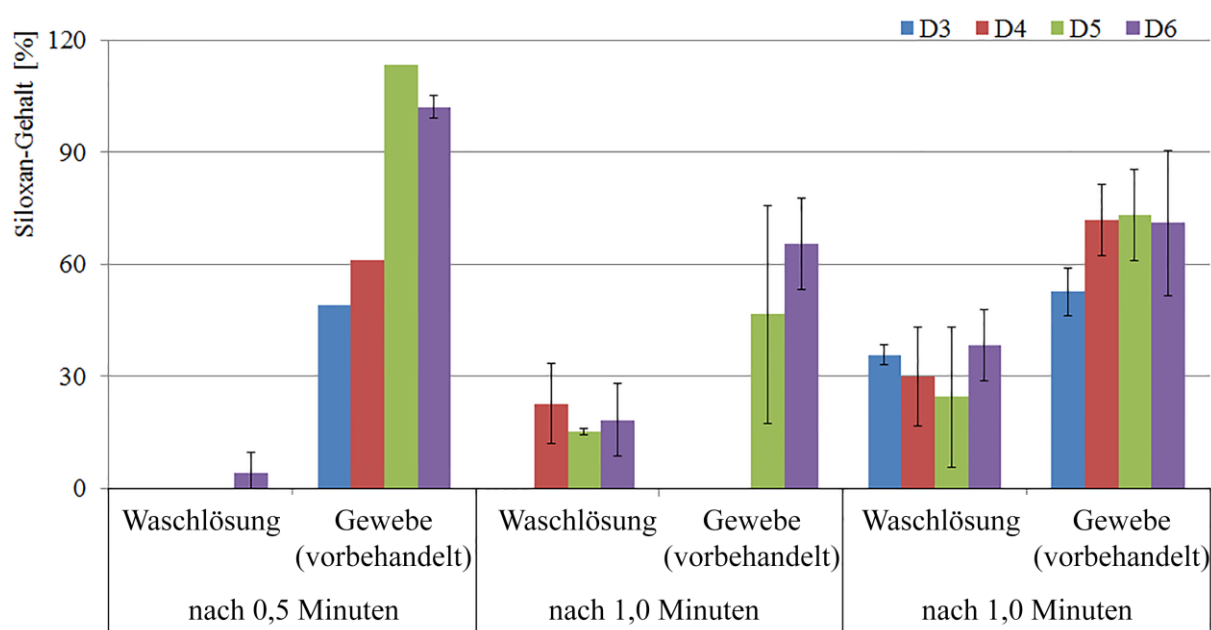


Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der Siloxan-Gehalte in der Waschlösung und im vorbehandelten Kapselgewebe bezogen auf das direkt homogenisierte Gewebe (100 %).

Bei einer Waschdauer von einer Minute konnten in der Waschlösung bereits ca. 15 % des D5- und des D6-Siloxan-Gehaltes detektiert werden. Mit Verlängerung des Waschvorganges um eine Minute kommt es nahezu zu einer Verdopplung des Siloxan-Gehaltes in der Waschlösung mit 24-38 %. Es ist folglich allgemein ein Auswasch-Verhalten der zyklischen Siloxane aus dem Gewebe zu beobachten. Dies könnte zum einen auf das Entfernen der an der Gewebeoberfläche adsorbierten Siloxane hindeuten. Hierbei wären jedoch nach einem

zweifachen Waschvorgang von jeweils einer halben Minute höhere Siloxan-Konzentrationen in der Waschlösung zu erwarten. Zum anderen könnte die zunehmende Kontaktdauer des Gewebes mit dem halogenierten Lösungsmittel Dichlormethan zu einer Zerstörung der einzelnen Gewebezellen (Nekrose) führen, die diese Verbindungen in die Waschlösung abgeben.

Um den Einfluss von Dichlormethan auf Humanzellen zu untersuchen, wurden sowohl Gewebestücke (max. 2 x 2 mm) als auch Osteosarkom-Humanzellen³⁵ mit einem zellpermeablen Fluoreszin-Derivat, 5-Chloromethylfluorescein Diacetat (CMFD), versetzt. Dieses Derivat wird in die lebende Zelle aufgenommen und enzymatisch in einen grünen Fluoreszenzfarbstoff umgewandelt. Dieser Stoff ist folglich ein Lebendzellmarker. Nach der Zugabe des Farbstoffes wurden die Zellen bei 37 ° eine halbe Stunde inkubiert, anschließend mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen und nochmals bei 37 °C 30 min inkubiert. Die Aufnahmen der angefärbten Gewebezellen und der U2OS-Zellen wurden bei einer vierfachen (s. Abbildung 30 e-h) bzw. bei einer zwanzigfachen Vergrößerung (s. Abbildung 30 a-d) mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop durchgeführt. Hierbei wurden die Kapselgewebeprobe vor Beginn der Aufnahmen mit Dichlormethan vollständig benetzt. Bei den U2OS-Zellen erfolgte die Zugabe von 100 µL Dichlormethan zu Beginn der Aufnahmen.

Ein Vergleich der Epifluoreszenz-Aufnahmen des Kapselgewebes verdeutlicht, dass es zu einer Zunahme des gräulichen Bereiches zwischen dem Start der Aufnahmen (e) und nach 2 Minuten (h) kommt (jeweils rotmarkiert). Dies könnte auf ein vermehrtes Absterben der einzelnen Zellen hindeuten. Zudem ist ein Zusammenziehen des Gewebes zu beobachten. Dieses Schrumpfen setzt bei den einzelnen U2OS-Zellen bereits nach 30 Sekunden nach Zugabe des Dichlormethans ein (b) und ist nach einer Minute deutlich zu beobachten (d). Die Verringerung des Zellvolumens deutet auf eine durch das Dichlormethan hervorgerufene Apoptose hin, eine vollständige Zellyse (Platzen der einzelnen Zellen [295]) wurde hingegen nicht beobachtet.

³⁵ U2OS-Zellen Präparation und Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt von Dr. O. Müller (AK Prof. Nalbant, Universität Duisburg-Essen)

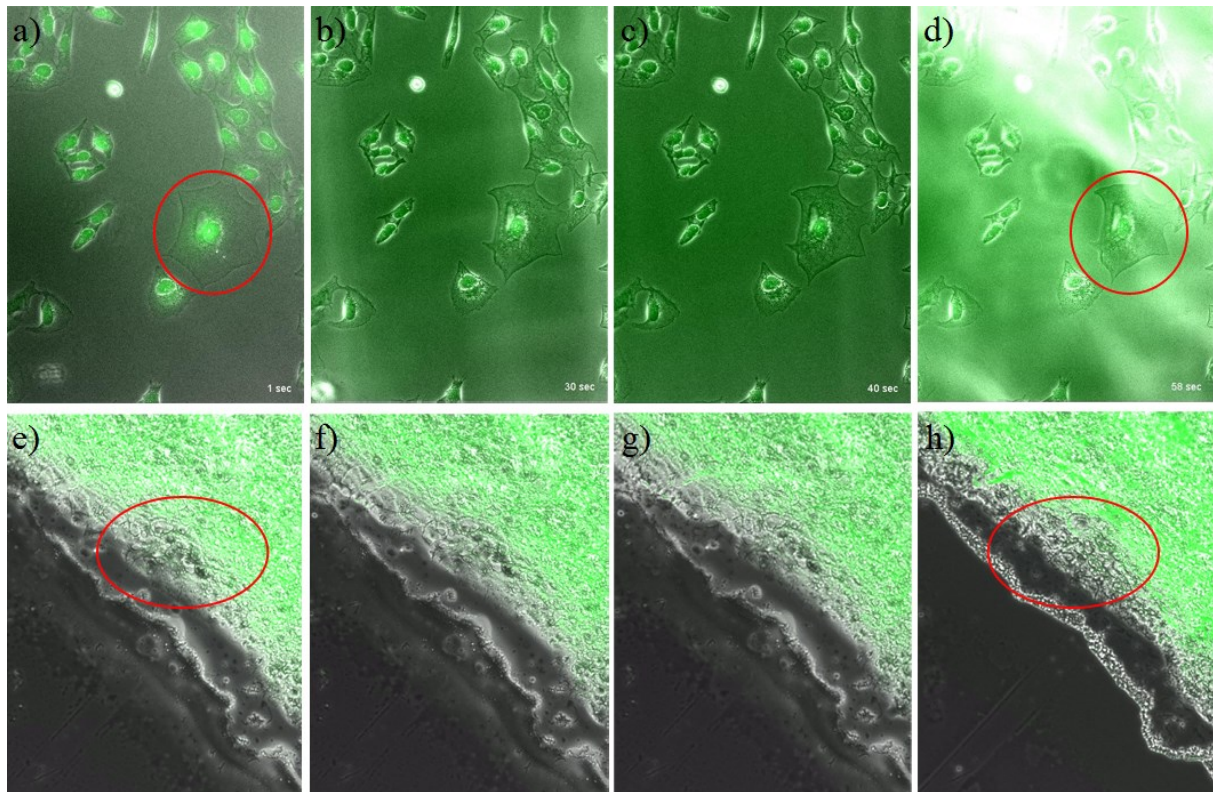


Abbildung 30: Epifluoreszenz-Aufnahmen der mit 10 µM CMFD angefärbten U2OS-Zellen (a-d) und des Kapselgewebes (e-h). Bei der Zugabe von Dichlormethan (a), direkt nach Benetzung des Kapselgewebes mit Dichlormethan (e), nach 30 s (b, f), nach 40 s (c); nach 1 min (d, g) und nach 2 min (h). Mit 20-facher (U2OS-Zellen) und 4-facher Vergrößerung (Kapselgewebe) [aufgenommen von DR. O. MÜLLER].

Allgemein erfolgt die Metabolisierung chlorierte Kohlenwasserstoffe primär in den Zellen (z. B. Leber und Niere) über Cytochrom P-450 [356–358]. Dabei kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die zu einer Zerstörung der Zellen (Einleitung der Apoptose) führen können, wenn diese nicht durch das Antioxidants Glutathion abgefangen werden [359–361]. Bezogen auf das Kapselgewebe könnte das Zellschrumpfen der Einzelzellen auch mit der Zerstörung einzelner Makromoleküle, die die einzelnen Zellen miteinander verbinden [362], und der Freisetzung der extrazellulären Matrix des Gewebes zusammenhängen. In Korrelation mit einer zu beobachtenden zunehmenden Siloxan-Konzentration in der Waschlösung in Abhängigkeit von der Dauer des Waschvorganges könnte hieraus eine Lokalisation der zyklischen Siloxane vermehrt zwischen den Zellen, eingebunden in der extrazellulären Matrix, abgeleitet werden.

5.4 Zyklische Methylsiloxane in Vollblutproben von Frauen mit Silikonbrustimplantaten

Die entwickelten und validierten GC-MS basierten Methoden, M1 und M2, wurden zur Analyse zyklischer Siloxane in Vollblut von Patienten mit intakten und defekten Implantaten eingesetzt. Da bereits bei den Untersuchungen der Kapselgewebeproben hinsichtlich des Siloxan-Gehaltes eine Differenzierung zwischen intakten SBI und intakten bleeding-Implantaten nur bedingt möglich war, wurde bei der Auswertung der Vollblutproben nur zwischen intakten und defekten SBI unterschieden. In diesem Kapitel werden die ermittelten Siloxan-Konzentrationen in den Vollblutproben der Implantatträger dem intraoperativen Implantat-Befund und den Ergebnissen der klinischen Vordiagnostik, Mammasonographie (SONO), gegenübergestellt.

Die ersten Untersuchungen zum Siloxan-Gehalt in Blutplasma bzw. im Vollblut von Frauen mit SBI bzw. von Frauen, denen bis zu fünf Jahre vor der Probenentnahme ein SBI explantiert wurde, wurden bereits im Jahr 2001 von FLASSBECK et al. durchgeführt. In dieser Studie wurden überwiegend höhere Konzentrationen der beiden zyklischen Siloxane D3 und D4 zwischen 2-50 µg/L Plasma (n = 10) und 20-92 µg/L Vollblut (n = 4) mittels GC-MS ermittelt. Eine Korrelation zwischen dem intraoperativen Implantat-Befund und der Konzentration war in dieser Studie nicht gegeben [98].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die ersten Analysen zyklischer Methylsiloxane im Vollblut der Implantatträger 18 Proben (Pat. Nr. 1-18, analysiert mit M1) bzw. fünf Proben (Pat. Nr. 19-23, analysiert mit M2) analysiert. Hierzu wurden die Vollblutproben mittels *crushed ice* bei Temperaturen unter 5 °C gekühlt und direkt nach Erhalt mit Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend mittels GC-MS bei einer splitlosen (Vollblut-Extrakte der Pat. 1-18) bzw. einer LVI-Injektion (Vollblut-Extrakte der Pat. 9-23) unter Einsatz einer Rxi 5Sil-MS-Trennsäule analysiert.

Unter Anwendung der M1-Methode mit Nachweisgrenzen zwischen 3-7 ng D3-D6/g Vollblut konnten die zyklische Methylsiloxane D3-D5 weder im Vollblut der Kontrollperson, noch in den Proben der Implantatträger mit intakten (n = 15) und defekten SBI (n = 3) unterschiedlicher Hersteller nachgewiesen werden. Nur im Blut von zwei Patienten mit intakten-bleeding Rofil-SBI (Pat. 8) bzw. defekten Rofil-SBI (Pat. Nr. 11) wurde D6 nachgewiesen. Eine Quantifizierung der D6-Konzentration konnte in beiden Fällen hingegen nicht erfolgen (LOQ 8 ng D6/g Vollblut; Einzelwerte s. Anhang Tabelle 28).

Bei gleicher Probenvorbereitung und unter Anwendung, der bis zu einem Faktor 100 sensitiveren M2-Methode mit Nachweisgrenzen zwischen 0,04-0,13 ng D4-D6/g Vollblut

(Verwendung der Rxi 5Sil-MS-Trennsäule) wurden Vollblutproben der Implantatträger und der Kontrollperson analysiert. Hierbei wurden in vier Proben von Patienten mit intakten sowie defekten SBI (Pat. Nr. 20-23) und in der Kontrollprobe keine Siloxane D4-D6 nachgewiesen. Nur im Vollblut eines Patienten mit einem defekten SBI des Herstellers Polytech wurden erhöhte D4- und D6-Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,14 ng D6/g und 0,41 ng D4/g Vollblut ermittelt (Einzelwerte s. Anhang Tabelle 29). Das Auftreten der beiden Siloxane D4 und D6 stimmt mit den qualitativen Ergebnissen der Dichlormethan-Extrakte der Vollblutproben der Patienten mit defekten SBI, die mittels GCxGC-MS analysiert wurden, überein. Abweichungen zu den von FLASSBECK et al. ermittelten Konzentrationen könnten beispielsweise auf unterschiedliche Probenvorbereitungen (5 min. extrahieren und 20 min. zentrifugieren, jeweils bei Raumtemperatur [98]), sowie Lagerbedingungen der Proben (Vollblut bei -20 °C [98]) und der Extrakte (Raumtemperatur [98]) und damit einhergehender Kontaminationen beispielsweise durch die Raumluft begründet sein.

5.4.1 Quantifizierung mittels LVI-GC-MS

Da unter Verwendung einer Rxi 5Sil-MS-Trennsäule bei der LVI-GC-MS-Methode keine Quantifizierung der zyklischen Methylsiloxane im Vollblut der Implantatträgern möglich war, wurden die bei 5 °C in den Citrat-Monovetten gelagerten Proben unter Einsatz der Optima PXLB-Trennsäule erneut analysiert. Im Vergleich hierzu wurden die Vollblut bei den vorangegangenen Analysen unter Anwendung der Methode M1 bzw. M2 (Verwendung der Rxi 5Sil-MS-Trennsäule) direkt nach Erhalt bzw. nach maximal 14 h Lagerung in *crushed ice* im Kühlschrank extrahiert und die Extrakte analysiert.

In dieser Studie wurden insgesamt 24 Vollblutproben von Frauen mit SBI (n = 24) untersucht, wobei die Implantate der Patienten von unterschiedlichen SBI-Herstellern, Allergan (n = 4), Mentor (n = 1), Polytech (n = 2), Rofil (n = 8), Silastic (n = 1) bzw. unbekannte Hersteller (n = 8), waren. Die Liegezeit der Implantate betrug zwischen einem Jahr und 38 Jahre und die einzelnen Vollblutproben wurden direkt nach Erhalt bzw. nach einer Lagerdauer von einem Monat und 15 Monate bei 5 °C analysiert. Zur Kontrolle wurden die Vollblutproben einer Frau ohne Implantate direkt bzw. nach einer Lagerdauer von acht Monaten analysiert. Die ermittelten D4-D6-Konzentrationen in den Dichlormethan-Extrakten der Vollblutproben von Frauen mit intakten (n = 13) und defekten (n = 11) SBI sind in Abbildung 31 dargestellt (Einzelwerte, s. Anhang Tabelle 30). Dabei wurden die angegebenen Vertrauensbereiche unter Durchführung einer dreifach Bestimmung (n = 3) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit

von 5% berechnet. Allgemein konnten Siloxan-Konzentrationen zwischen 0,10-0,57 ng D4-D6/g Vollblut mittels LVI-GC-MS analysiert werden. Für detektierte Siloxan-Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenzen von 0,10-0,18 ng D4-D6/g Vollblut wurde die D4-D6-Konzentration auf den maximalen Wert, die Bestimmungsgrenze, gesetzt. Wurden hingegen keine zyklischen Methylsiloxane in den Extrakten der Vollblutproben nachgewiesen, wurde für die D4-D6-Konzentrationen der minimale Wert, die Nachweisgrenze (0,03-0,05 ng D4-D6/g Vollblut) angegeben. Im Vollblut der Kontrollperson wurden ebenso wie im Vollblut eines Patienten mit einem intakten Mentor-SBI (Pat. Nr. 28) keine zyklischen Methylsiloxane detektiert. Nachweisbare, nicht jedoch quantifizierbare D4- und D6-Gehalte wurden hingegen in sieben von elf Fällen, bei denen die Patienten intakte SBI aufwiesen, gemessen (s. Abbildung 31, linke Seite). Nur in zwei Fällen bei Vorlage von intakten SBI konnte das zyklische Siloxan D6 mit Konzentrationen von $0,13 \pm 0,07$ ng/g (Pat. Nr. 27) und $0,29 \pm 0,07$ ng/g Vollblut (Pat. Nr. 32) quantifiziert werden. Das Methylsiloxan D4 konnte bei diesen beiden Fällen hingegen nicht quantifiziert (Pat. Nr. 27) bzw. nachgewiesen werden (Pat. Nr. 32).

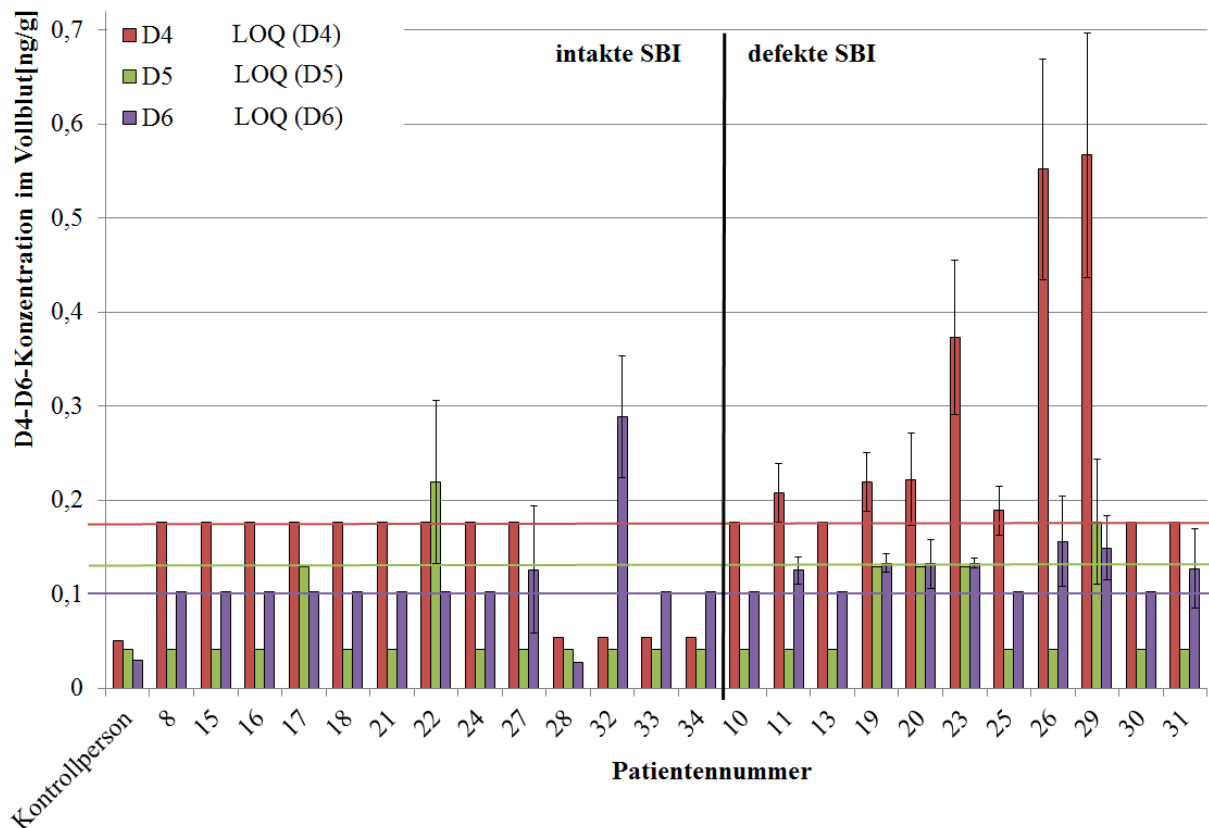


Abbildung 31: Bestimmung Siloxan-Gehalte im Vollblut der Patienten mit intakten (linke Seite) und defekten SBI (rechte Seite) und der Kontrollperson in [ng/g] bestimmt mittels LVI-GC-MS (M2). Mit D4 (rot), D5 (grün) und D6 (violett) unter Angabe der Bestimmungsgrenze (LOQ, farbige Linien) und VB bei $P = 95\%$ und $n = 3$.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Vollblutproben von Patienten mit intakten SBI, konnte im Vollblut von Patienten mit defekten SBI ein erhöhter D4- und D6-Gehalt bestimmt werden (s. Abbildung 31, rechte Seite). In sieben von insgesamt elf Vollblutproben von Implantatträgern (Pat. Nr. 11, 19, 20, 23, 25, 26 und 29) wurden erhöhte D4-Konzentrationen zwischen 0,19-0,57 ng D4/g Vollblut mittels LVI-GC-MS ermittelt. In den Vollblutproben derselben Patienten, mit Ausnahme Patient Nr. 25 bzw. 31, wurden zusätzlich erhöhte D6-Konzentrationen im Bereich von 0,13-0,16 ng D6/g Vollblut detektiert. In den übrigen Fällen, in denen intraoperativ defekte SBI diagnostiziert wurden, konnten die beiden zyklischen Methylsiloxane D4 und D6 im Vollblut der Patienten nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden (Pat. Nr. 11, 13, 30 und 25 bzw. 31). Das insbesondere in Hautpflege- und Kosmetikprodukte als chemisches Additiv eingesetzte D5, das Konzentrationen von bis zu 47-82 mg D5/g Hautlotion und Deodorant beinhalten kann [48, 176], konnte nur in zwei Vollblutproben quantifiziert werden. Hierbei wurden D5-Konzentrationen zwischen 0,18-0,22 ng/g im Vollblut von Patienten mit einem intakten bzw. einem defekten SBI analysiert (Pat. Nr. 22 und 29). In den übrigen Vollblutproben der Frauen mit defekten und intakten SBI bzw. der Kontrollperson konnte das Methylsiloxan D5 nicht nachgewiesen ($n = 19$) bzw. nicht quantifiziert ($n = 4$) werden. Eine mögliche Kontamination während der Probenentnahme aufgrund von verwendeten Hautpflegeprodukten der Probennehmer kann somit ausgeschlossen werden. Auch die Beeinflussung der Siloxan-Blutkonzentration durch inhalative und/oder dermale Exposition basierend auf der Verwendung von Hautpflegeprodukte und Kosmetika, wobei Expositionsraten von bis zu mehreren mg D4 und D5 pro Tag theoretisch berechnet wurden [100, 176, 315, 363], können auf Basis dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden. Zudem ist in der Fachliteratur bis zum heutigen Zeitpunkt keine signifikante Korrelation zwischen der Siloxan-Konzentration im Blutplasma bzw. im Vollblut und der Verwendung solcher Produkte aufgezeigt worden [208, 364].

Die vorwiegende Präsenz des Cyclosiloxans D4 im Blut wurde auch in anderen Studien zur Analyse zyklischer Methylsiloxanen im Vollblut bzw. Blutplasma beobachtet. Nach n-Hexan Extraktion von Blutplasmaproben von Frauen ohne SBI haben HANSEN et al. D4-Konzentrationen zwischen 2,9-12,7 ng/mL Plasma mittels konventioneller GC-MS mit split/splitloser-Injektion ($n = 80$ von insgesamt 94 Proben) ermittelt. Die zyklische Siloxane D5 und D6 waren hingegen nur in wenigen Fällen mit maximalen Konzentrationen von 3,9 ng D5/mL bzw. 3,2 ng D6/mL Plasma ($n < 17$) quantifizierbar. In einer weiteren Versuchsgruppe mit 19 Teilnehmern konnte diese Arbeitsgruppe D4 nur in wenigen Fällen mit Konzentrationen zwischen 1,7 und 2,7 ng/mL Plasma ($n < 4$) quantifizieren, hingegen

waren die beiden Siloxane D5 und D6 nicht nachweisbar (Nachweisgrenze zwischen 1,5-1,6 ng D5-D6/mL Plasma) [208].

Die Abweichungen zwischen den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Siloxan-Gehalten und den von HANSEN et al. publizierten Ergebnissen könnten beispielsweise auf abweichenden Lager- (-20 °C bzw. -78 °C [208]) und Extraktionsbedingungen (30 min. bei Raumtemperatur [208]) basieren. Zyklische Siloxane in Plasma- und Bauchfettproben exponierter Mitarbeiter einer Silikonfabrik und in der allgemeinen Bevölkerung wurden von XU et al. untersucht. Hierbei wurde D4 als das in beiden Matrices dominierende Siloxan identifiziert. Der geringe Siloxan-Gehalt im Plasma der Kontrollgruppe (n = 519) von 1-7 ng D4-D6/mL Plasma sowie die geringe Anzahl der Fälle, in denen D4-D6 detektiert werden konnten (nur 2-4 %, Bestimmungsgrenzen 0,4-1,0 ng/mL Plasma), reflektiert die geringe Siloxan-Belastung der allgemeinen Bevölkerung [216, 217].

Eine Korrelation zwischen den D4- und D6-Konzentrationen im Vollblut der Patienten und den SBI-Herstellern u. a. Rofil (Pat. Nr. 11, 20, 26 und 30) und Polytech (Pat. Nr. 19 und 23) wird anhand der Ergebnisse nicht beobachtet. Auch der intraoperative Befund von jeweils zwei defekter Implantate, wie sie für die Patienten Nr. 23, 25, und 31 vorlagen, hat augenscheinlich keinen Einfluss auf den ermittelten Siloxan-Gehalt im Vollblut. Mit einer Liegezeit der defekten Implantate von 14 bzw. 18 Jahren konnten für die beiden Patienten Nr. 26 und 29 die höchsten D4-Konzentrationen im Vollblut nachgewiesen werden. Hingegen wurden für Patient Nr. 25, dessen Implantat eine Liegezeit von 38 Jahren aufwies, kleinere D4-Konzentrationen ermittelt. Eine Korrelation zwischen diesen Parametern ist bei den vorliegenden Proben folglich nicht zu beobachten. Um eine mögliche Abhängigkeit der ermittelten D4- und D6-Gehalte im Vollblut von Patienten mit defekten SBI und den in den Kapselgewebeproben vorliegenden D4- und D6-Gehalten der jeweiligen Patienten aufzuzeigen, wurden diese gegeneinander aufgetragen (s. Abbildung 32a). Eine Korrelation zwischen dem Siloxan-Gehalt im Kapselgewebe auf der Brustseite des defekten SBI und der D4- und D6-Konzentration im Vollblut des Patienten liegt nicht vor. Beispielsweise konnten in den Vollblutproben des Patienten Nummer 23 und 26 D4- und D6-Konzentrationen von bis zu 0,16 ng D6/ bzw. 0,55 ng D4/g Vollblut ermittelt werden. Die entsprechenden Gewebekonzentrationen dieser beiden Analyten mit bis zu 762 ng D4/g und 2022 ng D6/g Gewebe liegen im unteren bzw. mittleren Bereich der in den Gewebeproben ermittelten D4- und D6-Konzentrationen.

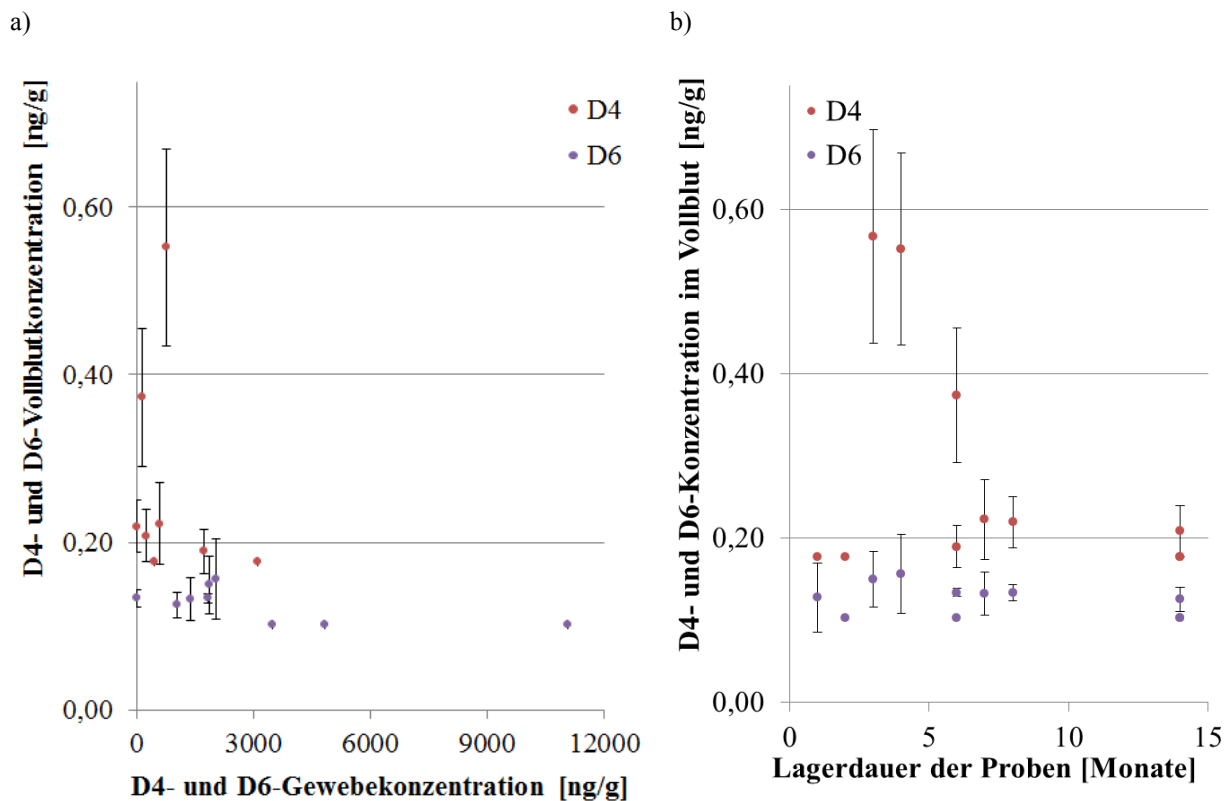


Abbildung 32: Auftragung der D4- und D6-Konzentrationen im Vollblut von Patienten mit defekten SBI in [ng/g] gegen a) die ermittelten D4- und D6-Konzentrationen der entsprechenden Kapselgewebeprobe in [ng/g], b) Lagerdauer der Vollblutproben in den Monovetten [Monate]. Die angegebenen VB der D4- und D6-Konzentrationen im Vollblut wurden mit $P = 95\%$ und $n = 3$ berechnet.

Bei einer Lagerdauer der Blutproben in den Citrat-Monovetten von 14 Monaten wurde im Vollblut der Patienten Nr. 10 und 13 D4-Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenzen ermittelt. Hingegen konnten für die Vollblutproben, die zwischen vier und sechs Monaten bei 5 °C gelagert wurden, D4-Gehalte mittels LVI-GC-MS quantifiziert werden (s. Abbildung 32b). Dies könnte auf einen Verlust dieses Analyten beispielsweise aufgrund von Adsorptionseffekten hindeuten. Für das zyklische Siloxan D6 hingegen wurde kein solcher Trend beobachtet. Der Verlust von zyklischen Methylsiloxanen, insbesondere von D4, wurde von WANG et al. untersucht. Dabei konnte diese Arbeitsgruppe ein D4-Verlust in Wasser- und Sedimentproben von bis zu 53 % bei einer Lagertemperatur von 4 °C beobachten [252]. Da jedoch bei gleicher Lagerdauer der Vollblutproben von sechs Monaten für den Patienten Nr. 23 eine höhere D4-Konzentration als für den Patienten Nr. 25 ermittelt wurde, könnte auch eine Beeinflussung der D4-Konzentration im Vollblut vorliegen. Insbesondere, da für die beiden Vollblutproben, die nur ein bzw. zwei Monate gelagert wurden (Pat. Nr. 31 bzw. 30), kein D4 quantifiziert werden konnte. Die Siloxan-Konzentration im Vollblut von Implantatträgern könnte durch unterschiedliche Faktoren, die das vorliegende SBI betreffen,

z. B. Formulierung des Gels, Schichtdicke der Hülle und Implantat-Größe, aber auch durch im menschlichen Organismus ablaufende Prozesse (z. B. Hydrolyse, Diffusion etc.) beeinflusst werden. Da der Zeitpunkt zwischen der Ruptur des SBI und der Blutentnahme bei dem Patienten unbekannt ist, könnte eine unterschiedliche Verteilung im Organismus vorliegen. Hierbei könnte bei einer kleinen Zeitspanne zwischen den beiden Zeitpunkten eine geringe Siloxan-Diffusionsrate in das umliegende Gewebe bzw. in das Blut-Kreislaufsystem resultieren. Bei längeren Zeitspannen hingegen könnte es zu einer Umsetzung oder Metabolisierung der Analyten kommen.

Eliminierungsprozesse der zyklischen Siloxane D4 und D5 nach inhalativer, oraler und intravenöser Exposition wurden anhand von verschiedenen Tierexperimenten untersucht. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass bei einfacher und wiederholter Inhalation von isotonenmarkiertem D4 nur maximal 10 % der verabreichten Dosis im Blutplasma wiedergefunden werden konnte [199]. Dabei wurde nur eine geringe Retention des D4 festgestellt, da bereits nach einem Tag bei einfacher bzw. nach zwei Tagen bei mehrfacher Exposition eine vollständige Eliminierung dieser Substanz aus dem Blutkreislauf der Ratten beobachtet werden konnte [177, 199]. Zusätzlich konnte auch eine Rückdiffusion aus dem im Fettgewebe angereicherten D4 nach mehrfacher Exposition der Ratten ermittelt werden [198, 234]. Eine Eliminierung aus dem tierischen Organismus nach inhalativer D4-Exposition konnte in diesen Studien über die Atmung sowie nach Metabolisierung über die Exkremate (Urin und Kot) verfolgt werden. Als Hauptabbauprodukte des D4 im Urin wurden von VARAPRATH et al. Silandiol und Silantriol identifiziert [11]. Auch für das höhere Homologe D5 konnten diese beiden Substanzen nach oraler bzw. intravenöser Verabreichung bei Ratten im Urin [12], sowie bei der mikrobiellen Zersetzung von D4 unter anaeroben Bedingungen analysiert werden [230]. Eine schnelle Eliminierung des Siloxans D4 wurde auch nach einer einstündigen Exposition einer Probandengruppe über die Atemluft beobachtet. Hierbei zeigten UTELL et al., dass die D4-Plasmakonzentration schnell während der andauernden Exposition ansteigt, jedoch bereits sechs Stunden nach Exposition auf ein Drittel der maximalen Plasmakonzentration zurückfällt. Auch bei dieser Studie konnte eine vollständige Eliminierung nach einem Tag aufgezeigt werden [214]. Hingegen wurde eine langsame Entfernung aus dem Blutkreislauf nach Langzeitexposition über den Atemtrakt bzw. über die Haut von Mitarbeitern einer Silikonfabrik, die eine bis 20-jährige Dienstzeit aufwiesen, von 100 Tagen beobachtet³⁶ [216]. Inwieweit eine Übertragung dieser Eliminierungsrate der

³⁶ Bei einer Plasmakonzentration von 89-206 ng D4-D6/g Plasma bei andauernder Exposition.

zyklischen Siloxane aus dem Blutkreislauf auf die Implantatträger erfolgen kann, ist unklar. Im Vergleich zu den oben genannten Studien kommt es im Falle der Patienten mit defekten SBI zu einer internen Exposition des Silikonmaterials aus dem Silikongel. Hierbei kann ein kontinuierlicher Transport des Silikons, u. a. zyklische Siloxane, in das Kapselgewebe und darüber hinaus in das Lymph- und Blutsystem nicht nur auf Basis von Diffusion erfolgen, sondern auch aktiv über den Transport von Makrophagen [19, 85, 117, 365].

5.4.2 Die GC-MS basierte Methode als präoperative Diagnostikmethode im Vergleich zur herkömmlichen klinischen Diagnostik

Zur Identifizierung von Implantatdefekten kommen in der klinischen Diagnostik verschiedene bildgebende Verfahren, wie Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Mammographie und Mammasonographie zum Einsatz [91, 115]. Aufgrund der weiten Verbreitung der SONO-Diagnostik, sowie im Hinblick auf deren Kosteneffizienz, wird konstatiert, dass diese Variante der bildgebenden Diagnostik in Europa und in den Vereinigten Staaten das primäre Untersuchungsverfahren darstellt [22, 116, 120, 121]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Implantat-Zustand der Patienten anhand der Ultraschallbilder durch Fach- bzw. Oberärzte der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen beurteilt. Hierbei wurden die sogenannten Strickleiter-Zeichen, die durch die Reflektion des Ultraschalls an der Oberfläche einer kollabierten SBI-Hülle mit Einfaltungen in den Silikonkern resultieren, und Schneesturm-Muster, die typischerweise bei Vorlage von freiem Silikon im umliegenden Gewebe zu beobachten sind [91], als indikativ für ein defektes SBI festgelegt. Zusätzlich kann auch die Form der Achsellymphknoten Aufschluss auf das Vorliegen eines Implantatdefektes geben. In Abbildung 33 sind die Ultraschallbilder von zwei Patienten, einmal mit einem als intakt und einmal mit einem als defekt diagnostizierten SBI, dargestellt. Im Fall des intakten SBI liegt eine intakte SBI-Hülle mit deutlicher Abgrenzung zur periprothetischen Faserkapsel (Kapselgewebe) und ein ovaler, anatomisch normal geformter Achsellymphknoten mit einer echoarmen Abgrenzung zum umliegenden Gewebe vor (s. Abbildung 33 a und c). Hingegen treten bei Patienten mit einem als defekt diagnostizierten SBI neben den Strickleiter-Zeichen im Silikonkern keine eindeutige Abtrennung der Gewebekapsel von der Implantat-Hülle auf (s. Abbildung 33 b). Zusätzlich weist der Achsellymphknoten eine starke Vergrößerung, mit anatomisch abnormaler Größe und einer echoreichen Abgrenzung zum umliegenden Gewebe auf (s. Abbildung 33 d).

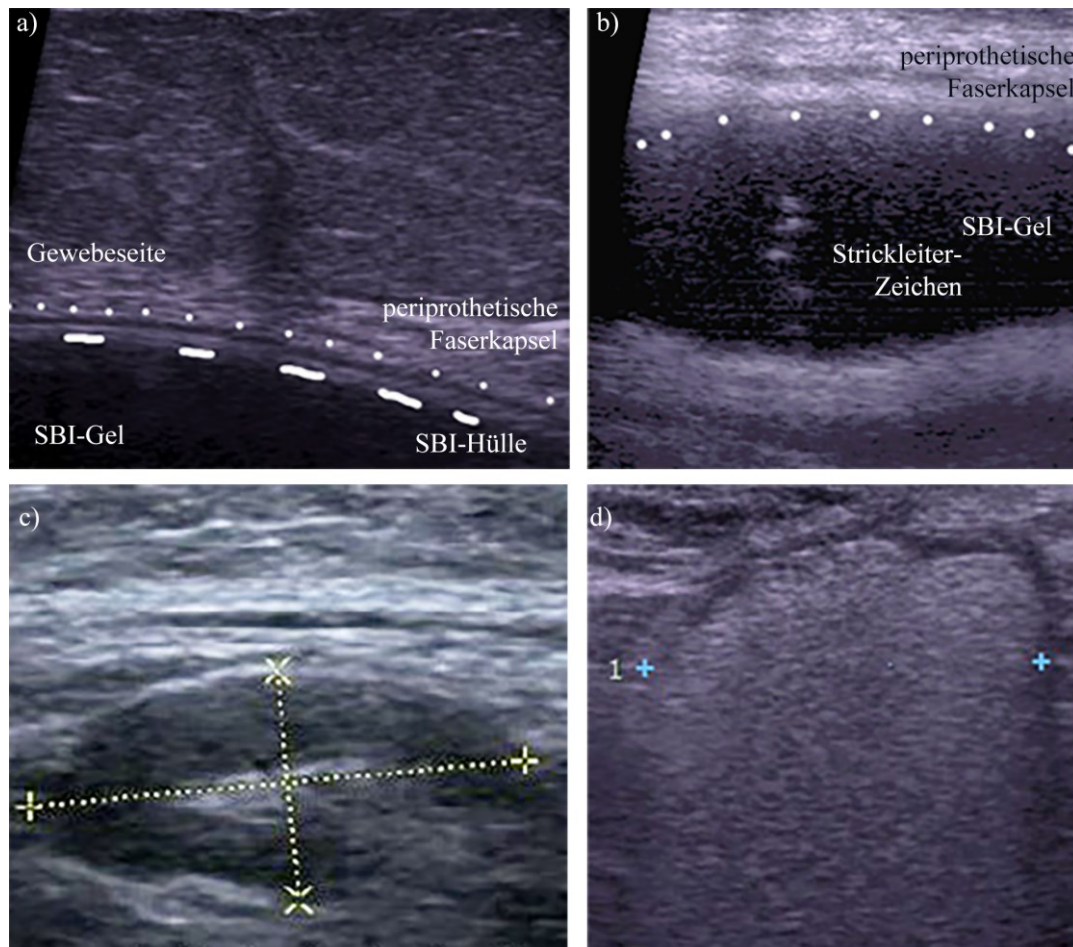


Abbildung 33: Ultraschallbilder der Brust von Frauen mit SBI. Mit präoperativem SBI-Befund a) intakt, b) defekt, c) intakt: normaler Achsellymphknoten, d) defekt: vergrößerter, abnormaler Achsellymphknoten. SBI-Hülle (gestrichelte Linie), periprothetische Faserkapsel (gepunktete Linie). Die SONO-Aufnahmen wurden im Universitätsklinikum Essen durchgeführt und die Bilder von DR. P. RUSCH bearbeitet.

Ein Vergleich der SONO-Ergebnisse bezüglich des Implantat-Zustandes mit dem intraoperativen SBI-Befund der 24 Implantatträger, deren Vollblutproben im vorherigen Kapitel mittels der entwickelten LVI-GC-MS-Methode analysiert wurden, ist graphisch in Abbildung 34 (graue Balken) dargestellt. Daran ist festzustellen, dass bei elf von insgesamt 24 Fällen eine negative Übereinstimmung zwischen den SONO-Diagnoseergebnissen und dem intraoperativen Implantat-Befund vorliegt. Dies entspricht einer Fehlerquote von 46 %. Dabei wurde ein intaktes SBI als defekt (s. linke Seite unten) und zehn von insgesamt elf defekten SBI als intakt diagnostiziert (s. rechte Seite unten). Die Sensitivität einer diagnostischen Methode zur Identifizierung von defekten Implantaten wird im medizinischen Bereich durch das Verhältnis der defekten Implantate, die auch in der Vordiagnostik als solche erkannt wurden, zur Gesamtanzahl der intraoperativ bestätigten, defekten Implantate wiedergegeben [23]. Die Spezifität hingegen beschreibt das Verhältnis der als intakt diagnostizierten Implantate zur Gesamtanzahl der intakten Implantate [23].

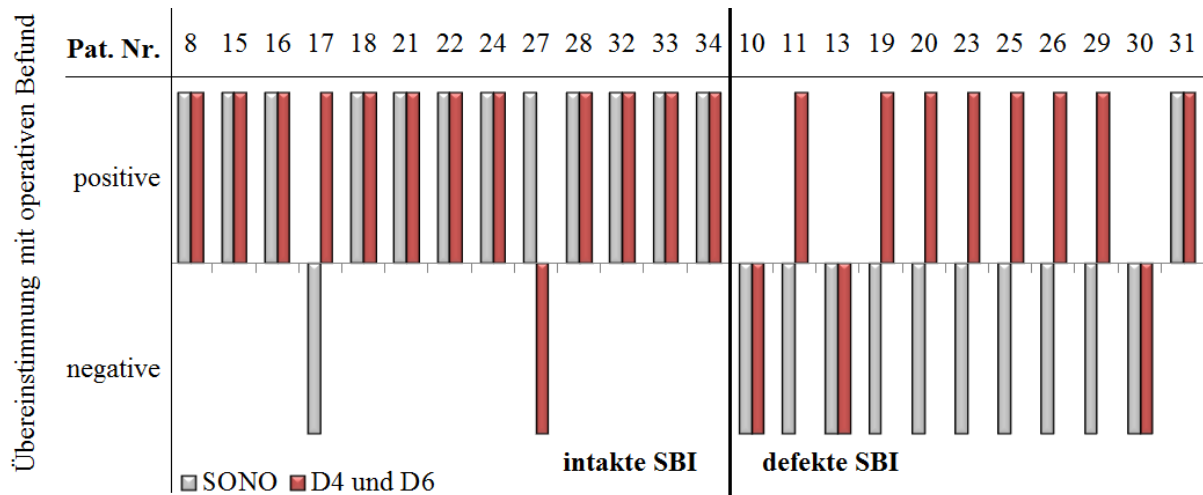


Abbildung 34: Vergleich der klinischen Vordiagnostik (SONO, grau) und der entwickelten analytischen Diagnostikmethode (D4 und D6, rot) mit dem intraoperativen SBI-Befund.

Für die SONO-Diagnostik der 24 Patienten (für diese Proben wurde das Vollblut analysiert) resultieren demnach eine Sensitivität von 9 % (mit 1/11) und eine Spezifität von 92 % (mit 12/13). In Bezug auf die 35 Patienten mit SBI, die insgesamt an dieser Studie teilgenommen haben ($n_{\text{SBI}} = 64$), folgen mit 16 defekten und 48 intraoperativ bestätigten, intakten SBI eine Sensitivität von 25 % (mit 4/16) und eine Spezifität von 96 % (mit 46/48) bei einer Fehlerquote von 33 %. Diese hohe Quote an Fehldiagnosen der SONO werden zum einen den eher unspezifischen Beurteilungskriterien zugeschrieben [21]. Insbesondere die Strickleiter-Zeichen, die bisher als Indiz für einen Implantatdefekt angesehen wurden, werden in der aktuellen Fachliteratur kritisch diskutiert. Nach Untersuchung von 303 SBI diagnostizierten ROCHIRA et al. in 56 % der Fälle Strickleiter-Zeichen, wohingegen nur drei defekte Implantate vorlagen [22]. Basierend auf diesen Ergebnissen werden in den Vereinigten Staaten Strickleiter-Zeichen nicht mehr als zuverlässiges Indiz für einen Implantatdefekt angesehen [22]. Neben der Aussagekraft der SONO-Kriterien wird häufig auch die beurteilende Person als Fehlerquelle angegeben [116, 120, 121]. Die relativ geringe Sensitivität der SONO, beispielsweise gegenüber dem MRT (Sensitivität 72-94 %), das in der medizinischen Fachliteratur häufig als „Gold-Standard“ bezeichnet wird [23], ist Bestandteil einiger Studien [23, 107, 122, 123, 366]. Dabei wurden im Durchschnitt höhere SONO-Sensitivitäten zwischen 30 und 77 % im Gegensatz zu den in dieser Studie berechneten SONO-Sensitivitäten erreicht.

Basierend auf den LVI-GC-MS-Ergebnissen (M2 mit Verwendung der Optima PXLB-Trennsäule), mit denen erhöhte D4- und D6-Konzentrationen in den Dichlormethan-Vollblut-Extrakten von Patienten mit defekten SBI und nicht mit intakten SBI detektiert wurden,

könnten diese beiden Substanzen als Mehrkomponenten-Marker fungieren. Als signifikantes Kriterium für diese analytische Diagnostikmethode zur Identifizierung defekter SBI muss D4 im Vollblut der Patienten mit Konzentrationen größer 0,18 ng D4/g Vollblut quantifiziert werden. Um die Genauigkeit dieser analytischen Diagnostik zu erhöhen, sollte zusätzlich D6 im Vollblut nachgewiesen werden ($D6 > 0,03 \text{ ng /g, LOD}$). Indizien auf das Vorliegen eines defekten Implantats sind des Weiteren ein nachgewiesener D4-Gehalt ($D4 > 0,05 \text{ ng/g, LOD}$) zusammen mit einem quantifizierbaren D6-Gehalt. Mit der Kombination von D4 und D6 und unter Einhaltung dieser Grenzwerte wurden nur vier Fehldiagnosen bei den vorliegenden 24 Fällen erstellt³⁷ (s. Abbildung 34, rote Balken). Dies entspricht einer Fehlerquote der analytischen Diagnostikmethode von 17 % und somit um den Faktor 2 bzw. 3 geringer als die klinische Diagnostik ist. Im Vergleich zu den SONO-Ergebnissen wurden insbesondere die defekten SBI mehrheitlich erkannt (acht von insgesamt elf). Hieraus folgen für die analytische Methode die gleiche diagnostische Spezifität von 92 % und eine Sensitivität bezüglich der Erkennung von Implantatdefekten von 73 %. Diese ersten Ergebnisse zur Identifizierung defekter SBI auf Grundlage einer analytischen und nicht auf Grundlage einer bildgebenden klinischen Diagnostikmethode verdeutlichen, dass die resultierende Sensitivität der analytischen Diagnostik zwischen der am häufigsten zum Einsatz kommenden SONO (25-77 %) und dem kostenintensiven Gold-Standard, dem MRT (72-94% [122]), liegt.

Da nur eine kleine Anzahl an Vollblutproben von Implantatträgern mittels LVI-GC-MS untersucht wurde, ist keine statistische Auswertung möglich. Eine statistische Absicherung dieser Ergebnisse sollte durch die Analyse von weiteren Vollblutproben von Implantatträgern mit defekten und intakten SBI erfolgen.

³⁷ Blindmessungen bei Pat. Nr. 30-34: Zum Zeitpunkt der LVI-GC-MS-Analyse war der intraoperative SBI-Befund unbekannt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine analytische Methode als ein alternatives diagnostisches Verfahren zur Identifizierung defekter Silikonbrustimplantate (SBI) anhand einer einfachen Blutanalyse betroffener Patienten entwickelt. Zur Entwicklung dieser Diagnostikmethode wurden Vollblut- und Kapselgewebeproben von insgesamt 40 Frauen mit SBI bzw. Bilumen- und Hydrogel-Implantaten unterschiedlicher Hersteller verwendet. Die Humanproben wurden in der Frauenklinik des Universitätsklinikums in Essen (Kooperationspartner DR. P. RUSCH) vom behandelnden Arzt unmittelbar vor bzw. während der Explantation der SBI entnommen, in deren Rahmen gleichzeitig der tatsächliche Befund des jeweiligen SBI verifiziert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Identifizierung signifikanter Marker-Substanzen im ersten Teil zwei unterschiedliche *screening*-Verfahren unter Einsatz der komprehensiven zweidimensionalen Gaschromatographie gekoppelt an ein Quadrupol-Massenspektrometer (GCxGC-MS, Firma Shimadzu) angewendet (vgl. Kap. 5.1). Durch Analyse des Dichlormethan-Extraktes des Silikongels von zehn Ex- bzw. drei Implantaten verschiedener SBI-Hersteller wurde eine Liste mit chemischen, extrahierbaren Additiven erstellt und auf Wiederfindung in den Gewebe- und Blutproben der Patienten überprüft (*suspected-target*-Analytik). Hierbei konnten über den Abgleich mit zwei Standardreferenz MS-Datenbanken (NIST und Wiley) neben zyklischen und linearen Methylsiloxanen auch phenylsubstituierte Siloxane in den Gewebeproben von Frauen mit defekten SBI wiedergefunden werden. Durch Abgleich mit analytischen Standards konnten die zyklischen flüchtigen Methylsiloxane (engl. *cyclic volatile methylsiloxanes*, cVMS) Octamethylcyclotetra (D4)-, Decamethylcyclopenta (D5)- und Dodecamethylcyclohexasiloxan (D6) eindeutig identifiziert werden. Da cVMS u. a. in Silikon-Septa, die zur Abdichtung des GC-Injektors eingesetzt werden, mit zunehmender Alterung generiert werden und folglich auch im *procedural Blank* auftraten, wurde an dieser Stelle als entscheidendes Kriterium das zweifache Signal (TIC-Intensität in der Probe) zu Rausch (TIC-Intensität im Blank)-Verhältnis gewählt. Mit dieser Einschränkung wurden die beiden Siloxane D4 und D6 in zwei bzw. sieben von insgesamt zehn Dichlormethan-Extrakten des Vollblutes von Implantatträgern mit defekten SBI, nicht jedoch im Vollblut der Frauen mit intakten SBI (n = 12) und der Kontrollperson identifiziert. Außerdem wurde in drei Dichlormethan-Extrakten des Vollblutes von Frauen mit defekten SBI das nach Abgleich mit den MS-Datenbanken mutmaßlich identifizierte Tetradecamethylcycloheptasiloxan (D7) analysiert (vgl. Kap. 5.1.2).

Da bei der *non-target*-Analytik keine signifikanten Substanzen, die nur im Vollblut der Patienten mit defekten SBI vorliegen, identifiziert werden konnten, lag im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der Methodenentwicklung zur sensitiven GC-MS-Analyse von cVMS in Humanproben (vgl. Kap. 5.2). Neben der Verwendung einer *low-bleeding*-Kapillarsäule (Firma Macherey-Nagel) wurde eine Sensitivitätssteigerung der GC-MS-Methode durch den Einsatz eines Stahlkastens, der den Injektoreinlass umgibt (septumfreier Aufgabekopf der Firma Gerstel) und vor jeder Messung mit Argon gespült wurde, erreicht (vgl. Kap. 5.2.1). Hierdurch konnten die Signalfluktuationen im *instrumental Blank* für die in der Innenraumluft omnipräsenten Siloxane D3-D5 von zuvor bis zu 50 % auf eine RSD kleiner 10 % über den Messtag verteilt minimiert werden. Somit konnten bei splitloser-Injektion (Injektionsvolumen 1 μL , Methode M1) Nachweisgrenzen (engl. *limit of detection*, LOD) von 0,7-0,9 μg D3-D6/L Dichlormethan erzielt werden. Neben der GC-MS-Methode M1 wurde zusätzlich eine Methode auf Basis der *large volume*-Injektionstechnik (LVI, Methode M2) mit LOD von 40-80 ng D4-D6/L Dichlormethan entwickelt (vgl. Kap. 5.2.2). Bei durchgängiger Kühlung nach Homogenisierung und Extraktion mit Dichlormethan bzw. bei einfacher flüssig-flüssig-Extraktion wurden vergleichbare Wiederfindungsraten im Gewebe und im Vollblut zwischen 81 und 99 % ermittelt. Bezogen auf die beiden Probenmatrices wurden LOD von 6-15 ng D3-D6/g Gewebe (M1) und 0,03-0,05 ng D4-D6/g Vollblut (M2) und Bestimmungsgrenzen (engl. *limit of quantitation*, LOQ) von 16-30 ng D3-D6/g Gewebe (M1) und 0,1-0,18 ng D4-D6/g Vollblut (M2) bestimmt. Zusätzlich zur klassischen Elektronenstoßionisation wurde eine neuartige GC-Orbitrap-MS-Kopplung mit einer Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI, Firma iGenTraX UG) für die Analyse zyklischer Siloxane getestet (vgl. Kap. 5.3.2). Bei Ionisierungsenergien von 10 eV bzw. 10,6 eV konnten jedoch mit dieser Methode nur D5 und D6 mit einem kleinen linearen Bereich und zehnfach höhere LOD - im Vergleich zu M1 - von 22-35 μg D5-D6/L Dichlormethan analysiert werden.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Humanproben der Implantatträger mit intakten, bleeding und defekten SBI unter Anwendung der GC-MS-Methoden M1 und M2 analysiert (vgl. Kap. 5.3 und Kap. 5.4). Hierdurch wurden im Dichlormethan-Extrakt der Kapselgewebeproben vornehmlich das größte Siloxan-Homologe D6 detektiert, was auf eine höhere Persistenz dieser Verbindung gegenüber D3-D5 hindeutet. In der Gruppe der Rofil-SBI wurde zusätzlich eine Zunahme des D6-Gehaltes im Kapselgewebe bei Vorlage von intakten (Median: 354 ng D6/g, n = 7) bzw. bleeding-SBI (Median: 405 ng D6/g, n = 17) hin zu defekten Rofil-SBI (Median: 1368 ng D6/g, n = 3) beobachtet. Zudem konnten bei Vorlage

von bleeding und defekten SBI auch die kleineren Homologen D3-D5 detektiert werden. Im Kapselgewebe von Frauen mit SBI unbekannter oder anderer Hersteller wurden vergleichbare Tendenzen beobachtet. Grundsätzlich konnte zusätzlich eine positive Korrelation zwischen der D5- und D6-Konzentration im Kapselgewebe von Frauen mit intakten und bleeding Rofil-SBI bzw. SBI unbekannter Hersteller und der Liegezeit der Implantate aufgezeigt werden. Insbesondere für eine Implantationszeit von mehr als zehn Jahren war ein D5- und D6-Konzentrationsanstieg im Gewebe zu beobachten. Der Anstieg des Siloxan-Gehaltes in der Waschlösung bei zunehmender Extraktionsdauer in Verbindung mit einer durch Dichlormethan hervorgerufenen Apoptose der Gewebezellen verweist zudem auf das vermehrte Vorliegen der cVMS in der extrazellulären Gewebematrix und nicht intrazellulär (vgl. Kap. 5.3.3). Dies könnte von toxikologischem Interesse sein, zumal bis zum heutigen Zeitpunkt in der medizinischen Fachliteratur eine mögliche Korrelation zwischen auftretenden Komplikationen und dem Gel-Bluten nicht eindeutig widerlegt werden konnte.

Die Analyse der Vollblutproben der Implantatträger erfolgte mittels LVI-GC-MS. Im Gegensatz zu den Vollblutproben der Kontrollperson und der Patienten mit intakten SBI ($n = 13$), bei denen überwiegend Siloxan-Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenzen bzw. überhaupt nicht nachgewiesen werden konnten, wurden in den Vollblutproben der Patienten mit defekten SBI unterschiedlicher Hersteller ($n = 11$) Siloxan-Konzentrationen bis zu 0,57 ng D4/g Vollblut und 0,16 ng D6/g Vollblut detektiert. Eine Korrelation zwischen den D4- und D6-Vollblutkonzentrationen mit den Siloxan-Gehalten in den Kapselgewebeproben derselben Patienten wurde nicht beobachtet. Auch das in vielen Körperpflegeprodukten dominierende Siloxan D5 konnte nur in zwei Vollblutproben quantifiziert werden, was den Rückschluss erlaubt, dass keine allgemeine Beeinflussung der Hintergrundkonzentration durch solche Produkte vorliegt. Die Identifizierung defekter SBI durch Blutanalyse der betreffenden Patienten mittels LVI-GC-MS kann anhand eines D4/D6-Multikomponenten-Markers erfolgen. Signifikantes Kriterium hierbei ist die Quantifizierung der beiden Siloxane D4 und D6 im Vollblut (LOQ: 0,1 ng D6/g und 0,18 ng D4/g). Ist hingegen nur ein Siloxan quantifizierbar und das Zweite nachweisbar, ist dies lediglich ein Indiz für ein defektes SBI. Nach Vergleich mit dem intraoperativen Implantatbefund lässt sich festhalten, dass es bei den mittels LVI-GC-MS analysierten 24 Fällen mit diesem Multikomponenten-Marker und unter Einhaltung der angegebenen Grenzwerte nur vier Fehldiagnosen gab (vgl. Kap. 5.4.2). Dies entspricht einer Fehlerquote der entwickelten analytischen Diagnostikmethode von 17 % und ist damit um den Faktor 3 präziser als die Mammasonographie (Fehlerquote 46 %).

Da nur eine kleine Anzahl an Vollblutproben von Implantatträgern analysiert wurde, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine statistische Absicherung der Ergebnisse möglich. Dies sollte zukünftig durch Analysen weiterer Vollblutproben von Implantatträgern mit defekten und intakten SBI erfolgen. Im Hinblick auf die Durchführbarkeit der Analyse einer großen Probenanzahl würden sich eine Automatisierung der Probenvorbereitung durch die Konfiguration des Autosamplers sowie die Einbindung des Argon-Hauses (Schaltung der Argon-Zufuhr und Öffnen der Kastenklappe) in diesen Ablauf anbieten. Dies würde nicht nur eine Kostenersparnis bieten, da weniger Personal benötigt wird, sondern zusätzlich könnten hierdurch die Vergleichs- und Laborpräzision der Analyse erhöht und die Kontaminationsgefahr während der Präparation minimiert werden. Zusätzlich stellt sich die zukünftig durch weitere Forschungen zu beantwortende Frage, inwieweit die beiden Siloxane D4 und D6 im Vollblut nachweisbar sind, wenn das Implantat z. B. bereits einen sehr langen Zeitraum defekt ist oder es zeitnah zur Blutentnahme zu einem Implantatdefekt gekommen ist. Beide Fragen sind *in vivo* analytisch schwer zu erfassen, da der Zeitpunkt der Implantatruptur, ausgenommen es gab eine extreme externe Krafteinwirkung, in der Regel unbekannt ist.

Zur weiteren Optimierung der diagnostischen Sicherheit sollte in zukünftigen Analysen aufgrund der hier generierten GCxGC-MS-Ergebnisse, bei denen in einigen Blutproben von Implantatträgern mit defekten SBI auch das Cycloheptasiloxan mit einem erhöhten Signal-Rausch-Verhältnis detektiert wurde, das Cycloheptasiloxan als zusätzlicher Marker aufgenommen werden. Auch die Analyse der Vollblutproben auf mögliche Siloxan-Metabolite (Silanole) mittels LC-MS wäre eine zusätzliche Option, um eine größere diagnostische Sicherheit zu gewährleisten. Da Silanole nach erfolgter Exposition die größten Konzentrationen im Urin aufweisen, wäre auch die Untersuchung dieser Matrix vom diagnostischen Interesse.

7 Literatur

- [1] EUROPEAN UNION - SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS. *The safety of Poly Implant Prothèse (PIP) Silicone Breast Implants - Update of the Opinion of February 2012* [online: 2014], [Zugriff am: 22. November 2015]. Verfügbar unter: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_043.pdf
- [2] BUNDESINSTITUTS FÜR ARZNEIMITTEL UND MEDIZINPRODUKTE. *Silikongel-gefüllte Brustimplantate der Hersteller Poly Implant Prothese (PIP) und Rofil Medical Nederland B.V.* [online], [zugegriffen am: 24. November 2015]. Verfügbar unter: <http://www.bfarm.de/DE/Medizinprodukte/riskinfo/empfehlungen/PIP/pip-node.html>
- [3] GRALL J. Y. und MARANINCHI D., *État des lieux des contrôles opérés par les autorités sanitaires sur la société poly implant prothèse*. AFSSAPS 2012. [online], [zugegriffen am: 24. November 2015]. Verfügbar unter: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_complet_PIP_def_01_02_12.pdf
- [4] LAMPERT F. M., SCHWARZ M., GRABIN S. und STARK G. B., The “PIP scandal”–Complications in Breast Implants of Inferior Quality: State of Knowledge, Official Recommendations and Case Report. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 2012, Bd. 72, Nr. 3, S. 243-246. ISSN 0016-5751.
- [5] MARTINDALE V. und MENACHE A., The PIP scandal: an analysis of the process of quality control that failed to safeguard women from the health risks. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2013, Bd. 106, Nr. 5, S. 173–177. ISSN 0141-0768.
- [6] YILDIRIMER L., SEIFALIAN A. M. und BUTLER P. E., Surface and mechanical analysis of explanted Poly Implant Prothèse silicone breast implants. *British Journal of Surgery*, 2013, Bd. 100, Nr. 6, S. 761–767. ISSN 0007-1323.
- [7] FLASSBECK D., PFLEIDERER B., KLEMENS P., HEUMANN K. G., ELTZE E. und HIRNER A. V., Determination of siloxanes, silicon, and platinum in tissues of women with silicone gel-filled implants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, Bd. 375, Nr. 3, S. 356–362. ISSN 1618-2642.
- [8] GARRIDO L., PFLEIDERER B., JENKINS B. G., HULKA C. A. und KOPANS D. B., Migration and chemical modification of silicone in women with breast prostheses. *Magnetic resonance in medicine*, 1994, Bd. 31, Nr. 3, S. 328–330. ISSN 1522-2594.
- [9] KALA S. V., LYKISSA E. D., NEELY M. W. und LIEBERMAN M. W., Low molecular weight silicones are widely distributed after a single subcutaneous injection in mice. *The American Journal of Pathology*, 1998, Bd. 152, Nr. 3, S. 645–649. ISSN 0002-9440.
- [10] PFLEIDERER B. und GARRIDO L., Silicone Related Disorders. *Magnetic Resonance in Medicine*, 1995, Bd. 33, Nr. 1, S. 8–17. ISSN 1522-2594.
- [11] VARAPRATH S., SALYERS K. L., PLOTZKE K. P. und NANAVATI S., Extraction of octamethylcyclotetrasiloxane and its metabolites from biological matrices. *Analytical biochemistry*, 1998, Bd. 256, Nr. 1, S. 14–22. ISSN 0003-2697.
- [12] VARAPRATH S., MCMAHON J. M. und PLOTZKE K. P., Metabolites of hexamethyldisiloxane and decamethylcyclopentasiloxane in Fischer 344 rat urine - A

- comparison of a linear and a cyclic siloxane. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, Bd. 31, Nr. 2, S. 206–214. ISSN 0090-9556.
- [13] BURNS-NAAS L. A., MAST R. W., MEEKS R. G., MANN P. C. und THEVENAZ P., Inhalation toxicology of decamethylcyclopentasiloxane (D5) following a 3-month nose-only exposure in Fischer 344 rats. *Toxicological Sciences*, 1998, Bd. 43, Nr. 2, S. 230–240. ISSN 1096-6080.
- [14] BURNS-NAAS L. A., MEEKS R. G., KOLESAR G. B., MAST R. W., ELWELL M. R., HARDISTY J. F. und THEVENAZ P., Inhalation toxicology of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) following a 3-month nose-only exposure in Fischer 344 rats. *International Journal of Toxicology*, 2002, Bd. 21, Nr. 1, S. 39–53. ISSN 1091-5818.
- [15] LIEBERMAN M. W., LYKISSA E. D., BARRIOS R., OU C. N., KALA G. und KALA S. V., Cyclosiloxanes produce fatal liver and lung damage in mice. *Environmental Health Perspectives*. 1999, Bd. 107, Nr. 2, S. 161–165. ISSN 0091-6765.
- [16] MEEKS, R G. The Dow Corning siloxane research program: an overview and update. *Medical Device and Diagnostic Industry Magazine*, 1999, Bd. 21, S. 112–122. ISSN 0194-844X.
- [17] QUINN A. L., DALU A., MEEKER L. S., JEAN P. A., MEEKS R. G., CRISSMAN J. W., GALLAVAN R. H. und PLOTZKE K. P., Effects of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) on the luteinizing hormone (LH) surge and levels of various reproductive hormones in female Sprague-Dawley rats. *Reproductive Toxicology*, 2007, Bd. 23, Nr. 4, S. 532–540. ISSN 0890-6238.
- [18] SIDDIQUI W. H., STUMP D. G., PLOTZKE K. P., HOLSON J. F. und MEEKS R. G., A two-generation reproductive toxicity study of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) in rats exposed by whole-body vapor inhalation. *Reproductive Toxicology*, 2007, Bd. 23, Nr. 2, S. 202–215. ISSN 0890-6238.
- [19] HARDT N. S., EMERY J. A., STEINBACH B. G., LATORRE G. und CAFFEE H., Cellular-transport of silicone from breast prostheses. *International Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1995, Bd. 4, Nr. 1, S. 127–134. ISSN 1054-044X.
- [20] MOYER H. R., GHAZI B. H. und LOSKEN A., The effect of silicone gel bleed on capsular contracture: a generational study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2012, Bd. 130, Nr. 4, S. 793–800. ISSN 0032-1052.
- [21] KHAN U. D., Left unilateral breast autoinflation and intraprosthetic collection of sterile pus: An unusual operative finding of silicone gel bleed with silicone lymphadenitis. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2008, Bd. 32, Nr. 4, S. 684–687. ISSN 0364-216X.
- [22] ROCHIRA D., CAVALCANTI P., OTTAVIANI A. und TAMBASCO D., Longitudinal Ultrasound Study of Breast Implant Rupture Over a 6-Year Interval. *Annals of Plastic Surgery*, 2016, Bd. 76, Nr. 2, S. 150-154. ISSN 0148-7043.
- [23] SCARANELO A. M., MARQUES A. F., SMIALOWSKI E. B. und LEDERMAN H. M., Evaluation of the rupture of silicone breast implants by mammography, ultrasonography and magnetic resonance imaging in asymptomatic patients:

- Correlation with surgical findings. *Sao Paulo Medical Journal*, 2004, Bd. 122, Nr. 2, S. 41–47. ISSN 1516-3180.
- [24] CZERNY V., Plastischer Ersatz der Brust durch ein lipoma. *Zentralblatt für Chirurgie*, 1895, Bd. 27, S. 12.
- [25] BONDURANT S., ERNSTER V. und HERDMAN R., *Safety of silicone breast implants*. Washington, D.C: National Academies Press, 2000. ISBN 0-309-51931-4.
- [26] PETERS W., BRANDON H., JERINA K. L., WOLF C. und YOUNG V. L., *Biomaterials in plastic surgery: Breast implants*. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2012. ISBN 1845697995.
- [27] KOLLE F. S., Plastic and cosmetic surgery. *Annals of Surgery*, 1911, Bd. 54, Nr. 5, S. 717. ISSN 0003-4932.
- [28] PETERS W. und FORNASIER V., Complications from injectable materials used for breast augmentation. *The Canadian journal of plastic surgery*, 2009, Bd. 17, Nr. 3, S. 89–96. ISSN 1918-1507.
- [29] SCHWARZMANN E., Avoidance of nipple necrosis by preservation of corium in one-stage plastic surgery of the breast. *Revue de Chirurgie Structive*, 1937, Bd. 10, S. 206–209.
- [30] CONWAY H. und DIETZ G. H., Augmentation mammoplasty. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1962, Bd. 30, Nr. 2, S. 309–310. ISSN 0032-1052.
- [31] LIU L.-W. und TRUONG L. D., Morphologic characterization of polyvinyl sponge (Ivalon) breast prosthesis. *Archives of pathology and laboratory medicine*, 1996, Bd. 120, Nr. 9, S. 876–878. ISSN 0003-9985.
- [32] PANGMAN, W J, Robert M WALLACE und B HILLS. The use of plastic prosthesis in breast plastic and other soft tissue surgery. *Western Journal of Surgery, Obstetrics, and Gynecology*, 1955, Bd. 63, Nr. 8, S. 503–512. ISSN 1324-7836.
- [33] REGNAULT P. C., Indications for breast augmentation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1967, Bd. 40, Nr. 6, S. 524–529. ISSN 0032-1052.
- [34] ROCHOW E. G., The direct synthesis of organosilicon compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 1945, Bd. 67, Nr. 6, S. 963–965. ISSN 0002-7863.
- [35] ASHLEY F. L., BRALEY S., REES T. D., GOULIAN D. und BALLANTYNE D. L., The present status of silicone fluid in soft tissue augmentation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1967, Bd. 39, Nr. 4, S. 411–420. ISSN 0032-1052.
- [36] DUFFY D. M., Injectable liquid silicone: new perspectives. In: A. W. KLEIN, Hrsg. *Tissue augmentation in clinical practice: procedures and techniques*: Marcel Dekker Inc. New York, 1. Aufl., 1998, S. 237–267. ISBN 978-0824701246.
- [37] BOO-CHAI K., The complications of augmentation mammoplasty by silicone injection. *British Journal of Plastic Surgery*, 1969, Bd. 22, Nr. 3, S. 281–285. ISSN 0007-1226.
- [38] CHEN T.-H., Silicone injection granulomas of the breast: treatment by subcutaneous mastectomy and immediate subpectoral breast implant. *British Journal of Plastic Surgery*, 1995, Bd. 48, Nr. 2, S. 71–76. ISSN 0007-1226.
- [39] CHEN Y.-M., LU C.-C. und PERNG R.-P., Silicone fluid-induced pulmonary embolism. *American Review of Respiratory Disease*, 1993, Bd. 147, S. 1299. ISSN 0003-0805.

- [40] INOUE Y., WANIBUCHI Y. und NISHI T., Are foreign body calcifications late reactions following augmentation mammoplasty? *Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*, 1983, Bd. 138, Nr. 1, S. 74. ISSN 1438-9029.
- [41] PARSONS R. W. und THERING H. R., Management of the silicone-injected breast. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1977, Bd. 60, Nr. 4, S. 534–538. ISSN 0032-1052.
- [42] PIECHOTTA F. U., Silicone fluid, attractive and dangerous: collective review and summary of experience. *Aesthetic Plastic Surgery*, 1979, Bd. 3, Nr. 1, S. 347–355. ISSN 0364-216X.
- [43] RODRIGUEZ M. A., MARTINEZ M. C., LOPEZ-ARTIGUEZ M., SORIA M. L., BERNIER F. und REPETTO M., Lung embolism with liquid silicone. *Journal of Forensic Sciences*, 1989, Bd. 34, Nr. 2, S. 504–510. ISSN 0022-1198.
- [44] WINER L. H., STERNBERG T. H., LEHMAN R. und ASHLEY F. L., Tissue reactions to injected silicone liquids: a report of three cases. *Archives of Dermatology*, 1964, Bd. 90, Nr. 6, S. 588–593. ISSN 0003-987X.
- [45] CRONIN T. D. und GREENBERG R. L., Our experiences with the silastic gel breast prosthesis. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1970, Bd. 46, Nr. 1, S. 1–7. ISSN 0032-1052.
- [46] CRONIN T. D. und BRAUER R. O., Augmentation mammoplasty. *The Surgical clinics of North America*, 1971, Bd. 51, Nr. 2, S. 441–452. ISSN 0039-6109.
- [47] PUSKAS J. E. und LUEBBERS M. T., Breast implants: The good, the bad and the ugly. Can nanotechnology improve implants? *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2012, Bd. 4, Nr. 2, S. 153–168. ISSN 1939-5116.
- [48] BROOK M., Platinum in silicone breast implants. *Biomaterials*, 2006, Bd. 27, Nr. 17, S. 3274–3286. ISSN 0142-9612.
- [49] SOKOLOVA V. und EPPLE M., Brustimplantate. *Chemie in unserer Zeit*, 2012, Bd. 46, Nr. 2, S. 76–79. ISSN 0009-2851.
- [50] GURUNLUOGLU R., GURUNLUOGLU A., WILLIAMS S. A. und TEBOCKHORST S., Current trends in breast reconstruction: survey of American Society of Plastic Surgeons 2010. *Annals of Plastic Surgery*, 2013, Bd. 70, Nr. 1, S. 103–110. ISSN 0148-7043.
- [51] SCHUBERT D. W., KASCHTA J., HORCH R. E., WALTER B. L. und DAENICKE J., On the failure of silicone breast implants: new insights by mapping the mechanical properties of implant shells. *Polymer International*, 2014, Bd. 63, Nr. 2, S. 172–178. ISSN 1097-0126.
- [52] GRAIVER D., FARMINER K. W. und NARAYAN R., A review of the fate and effects of silicones in the environment. *Journal of Polymers and the Environment*, 2003, Bd. 11, Nr. 4, S. 129–136. ISSN 1566-2543.
- [53] HOLLEMAN A. F. und WIBERG E., *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. Berlin: Walter de Gruyter, 102. Aufl., 2007. ISBN 3110177701.
- [54] RÜCKER C. und KÜMMERER K., Environmental Chemistry of Organosiloxanes. *Chemical Reviews*, 2014, Bd. 115, Nr. 1, S. 466–524. ISSN 0009-2665.
- [55] KOERNER G., SCHULZE M. und WEIS J., *Silicone - Chemie und Technologie*. Essen: Vulkan-Verlag, 1989. ISBN 3802721551.

- [56] ROCHOW E. G., *Silicon and silicones: about stone-age tools, antique pottery, modern ceramics, computers, space materials and how they all got that way*. Berlin: Springer, 1987. ISBN 3540175652.
- [57] ZUCKERMAN J. J., The direct synthesis of organosilicon compounds. *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, 1964, Bd. 6, S. 383. ISSN 0065-2792.
- [58] HURD C. B., Studies on Siloxanes. I. The Specific Volume and Viscosity in Relation to Temperature and Constitution. *Journal of the American Chemical Society*, 1946, Bd. 68, Nr. 3, S. 364–370. ISSN 0002-7863.
- [59] YOSHIDA S. H., CHANG C. C., TEUBER S. S. und GERSHWIN M. E., Silicon and silicone: theoretical and clinical implications of breast implants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1993, Bd. 17, Nr. 1, S. 3–18. ISSN 0273-2300.
- [60] BRALEY, Silas A. *Elastomers for Implantation in the Human Body*. Rubber Chemistry and Technology. 1971, Bd. 44, Nr. 2, S. 363–380. ISSN 0035-9475.
- [61] CHO H., ASHIDA Y., NAKAMURA S., SHIMIZU W. und MURAKAMI Y., Mechanical Properties and Thermal Endurance of Room-Temperature-Vulcanizing Silicone Compound with Reduced Environmental Impact. *Electrical Engineering in Japan*, 2013, Bd. 185, Nr. 1, S. 1–8. ISSN 1520-6416.
- [62] SPEIER J. L., Homogeneous catalysis of hydrosilylation by transition metals. *Advances in Organometallic Chemistry*, 1979, Bd. 17, S. 407–447. ISSN 0065-3055.
- [63] GENERAL ELECTRIC COMPANY, United States. Platinum complexes of unsaturated siloxanes and platinum containing organopolysiloxanes. Erfinder: B. D. KARSTEDT und N. SCOTIA. Veröffentlichungsdatum: 1973/11/27. US 3775452 A.
- [64] LAPPERT M. F. und SCOTT F. P. A., The reaction pathway from Speier's to Karstedt's hydrosilylation catalyst. *Journal of Organometallic Chemistry*, 1995, Bd. 492, Nr. 2, S. C11–C13. ISSN 0022-328X.
- [65] PASTERIS J. D., WOPENKA B., FREEMAN J. J., YOUNG V. L. und BRANDON H. J., Medical mineralogy as a new challenge to the geologist: Silicates in human mammary tissue? *American Mineralogist*, 1999, Bd. 84, S. 997–1008. ISSN 0003-004X.
- [66] SERGOTT T. J., LIMOLI J. P., BALDWIN JR C. M. und LAUB D. R., Human adjuvant disease, possible autoimmune disease after silicone implantation: a review of the literature, case studies, and speculation for the future. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1986, Bd. 78, Nr. 1, S. 104–114. ISSN 0032-1052.
- [67] STEIN J., LEWIS L. N., GAO Y. und SCOTT R. A., In situ determination of the active catalyst in hydrosilylation reactions using highly reactive Pt (0) catalyst precursors. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, Bd. 121, Nr. 15, S. 3693–3703. ISSN 0002-7863.
- [68] MAHARAJ S. V. M., Platinum concentration in silicone breast implant material and capsular tissue by ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, Bd. 380, Nr. 1, S. 84–89. ISSN 1618-2642.
- [69] EL-JAMMAL A. und TEMPLETON D. M., Measurement of platinum in biomedical silicones by ICP-MS. *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, 1995, Bd. 32, Nr. 8, S. 293–295. ISSN 0144-557X.

- [70] LANE T. H. und BURNS S. A., Silica, silicon and silicones... unraveling the mystery. In: M. POTTER und N. R. ROSE, Hrsg. *Immunology of Silicones*: Springer Berlin Heidelberg, 1996, ISBN 9783642852282.
- [71] LEVIER R. R., HARRISON M. C., COOK R. R. und LANE T. H., What is silicone? *Journal of clinical Epidemiology*, 1995, Bd. 48, Nr. 4, S. 513–517. ISSN 0895-4356.
- [72] BERETTA G. und MALACCO M., Chemical and physicochemical properties of the high cohesive silicone gel from Poly Implant Prothese (PIP) breast prostheses after explantation: a preliminary, comparative analytical investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, Bd. 78, S. 75–82. ISSN 0731-7085.
- [73] BERETTA G., RICHARDS A. und MALACCO M., Chemical and biochemical composition of late periprosthetic fluids from women after explantation of ruptured Poly Implant Prothèse (PIP) breast prostheses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, Bd. 84, S. 159–167. ISSN 0731-7085.
- [74] BERETTA G., PANSERI S., MANZO A., HAMID R., RICHARDS A. und MALACCO M., Analytical investigations on elastomeric shells of new Poly Implant Prothèse (PIP) breast and from sixteen cases of surgical explantation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, Bd. 98, S. 144–152. ISSN 0731-7085.
- [75] PETERS W., Current status of breast implant survival properties and the management of the woman with silicone gel breast implants. *Plastic Surgery*, 2000, Bd. 8, Nr. 2, S. 54–67. ISSN 2292-5503.
- [76] CAPOZZI A., Long-term complications of polyurethane-covered breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1991, Bd. 88, Nr. 3, S. 458–461. ISSN 0032-1052.
- [77] HENDERSON P. W., NASH D., LASKOWSKI M. und GRANT R. T., Objective Comparison of Commercially Available Breast Implant Devices. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2015, Bd. 39, Nr. 5, S. 724–732. ISSN 0364-216X.
- [78] KAALI P., STRÖMBERG E. und KARLSSON S., Prevention of biofilm associated infections and degradation of polymeric materials used in biomedical applications. In: A. LASKOVSKI, Hrsg. *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*: InTech, Rijeka, 2011, S. 513–540. ISBN 9533075139.
- [79] BORENSTEIN D., Siliconosis: A spectrum of illness. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1994, Bd. 24, Nr. 1, S. 1–7. ISSN 0049-0172.
- [80] KESSLER D. A., The basis of the FDA's decision on breast implants. *New England Journal of Medicine*, 1992, Bd. 326, Nr. 25, S. 1713–1715. ISSN 0028-4793.
- [81] KUMAGAI Y., SHIOKAWA Y., MEDSGER T. A. und RODNAN G. P., Clinical spectrum of connective tissue disease after cosmetic surgery. *Arthritis and Rheumatism*, 1984, Bd. 27, Nr. 1, S. 1–12. ISSN 1529-0131.
- [82] RYSSEL H., GERMANN G. und HEITMANN C., Plastic surgical body form correction. Part II: Face-lift, periorbital surgery, and breast augmentation and reduction. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, 2007, Bd. 78, Nr. 4, S. 381–394. ISSN 0009-4722.
- [83] ZUCKERMAN D., BOOKER N. und NAGDA S., Public health implications of differences in US and European Union regulatory policies for breast implants. *Reproductive Health Matters*, 2012, Bd. 20, Nr. 40, S. 102–111. ISSN 0968-8080.

- [84] YU L. T., LATORRE G., MAROTTA J., BATICH C. und HARDT S. N. In vitro measurement of silicone bleed from breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1996, Bd. 97, Nr. 4, S. 756–764. ISSN 0032-1052.
- [85] ELTZE E., BETTENDORF O., RODY A., JACKISCH C., HERCHENRÖDER F., BÖCKER W. und PFLEIDERER B., Influence of local complications on capsule formation around model implants in a rat model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2003, Bd. 64, Nr. 1, S. 12–19. ISSN 0021-9304.
- [86] BAKER JR J. L., CHANDLER M. L. und LEVIER R. R., Occurrence and activity of myofibroblasts in human capsular tissue surrounding mammary implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1981, Bd. 68, Nr. 6, S. 905–912. ISSN 0032-1052.
- [87] BIZJAK M., SELMI C., PRAPROTNIK S., BRUCK O., PERRICONE C., EHRENFELD M. und SHOENFELD Y., Silicone implants and lymphoma: The role of inflammation. *Journal of Autoimmunity* [online], 2015. ISSN 0896-8411. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841115300275>.
- [88] KOSSOVSKY N., HEGGERS J. P. und ROBSON M. C., Experimental demonstration of the immunogenicity of silicone–protein complexes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1987, Bd. 21, Nr. 9, S. 1125–1133. ISSN 1097-4636.
- [89] BARKER D. E., RETSKY M. I. und SCHULTZ S., „Bleeding“ of silicone from bag-gel breast implants, and its clinical relation to fibrous capsule reaction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1978, Bd. 61, Nr. 6, S. 836–841. ISSN 0032-1052.
- [90] CHUANGSUWANICH A., WARNNISSORN M. und LOHSIRIWAT V., Siliconoma of the breasts. *Gland Surgery*, 2013, Bd. 2, Nr. 1, S. 46. ISSN 2227-684X.
- [91] BARTER S. und HEYWANG-KÖBRUNNER S. H., Bildgebende Diagnostik bei Brustimplantaten. In: S. H. HEYWANG-KÖBRUNNER und I. SCHREER, Hrsg. *Bildgebende Mammadiagnostik: Untersuchungstechnik, Befundmuster, Differenzialdiagnose und Interventionen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 2015, S. 519–538. ISBN 3131633735.
- [92] SCHNUR P. L., WEINZWEIG J., HARRIS J. B., MOYER T. P., PETTY P. M., NIXON D. und MCCONNELL J. P., Silicon analysis of breast and periprosthetic capsular tissue from patients with saline or silicone gel breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1996, Bd. 98, Nr. 5, S. 798–803. ISSN 0032-1052.
- [93] BEEKMAN W. H., FEITZ R., VAN DIEST P. J. und HAGE J. J., Migration of silicone through the fibrous capsules of mammary prostheses. *Annals of Plastic Surgery*, 1997, Bd. 38, Nr. 5, S. 441–445. ISSN 0148-7043.
- [94] BIRKEFELD A. B., ECKERT H. und PFLEIDERER B., A study of the aging of silicone breast implants using ^{29}Si , ^1H relaxation and DSC measurements. *Biomaterials*, 2004, Bd. 25, Nr. 18, S. 4405–4413. ISSN 0142-9612.
- [95] BIRKEFELD A. B., ECKERT H. und PFLEIDERER B., Liquid-and solid-state high-resolution NMR methods for the investigation of aging processes of silicone breast implants. *Biomaterials*, 2003, Bd. 24, Nr. 1, S. 35–46. ISSN 0142-9612.
- [96] BATICH C., DEPALMA D., MAROTTA J. und LATORRE G., Silicone degradation reactions. In: M. POTTER und N. R. ROSE, Hrsg. *Immunology of Silicones*: Springer Berlin Heidelberg, 1996, S. 13–23. ISBN 9783642852282.

- [97] LYKISSA E. D., KALA S. V., HURLEY J. B. und LEOVITZ R. M., Release of low molecular weight silicones and platinum from silicone breast implants. *Analytical Chemistry*, 1997, Bd. 69, Nr. 23, S. 4912–4916. ISSN 0003-2700.
- [98] FLASSBECK D., PFLEIDERER B., GRÜMPING R. und HIRNER A. V., Determination of low molecular weight silicones in plasma and blood of women after exposure to silicone breast implants by GC/MS. *Analytical Chemistry*, 2001, Bd. 73, Nr. 3, S. 606–611. ISSN 0003-2700.
- [99] GREENE W. B., RASO D. S., WALSH L. G., HARLEY R. A. und SILVER R. M., Electron probe microanalysis of silicon and the role of the macrophage in proximal (capsule) and distant sites in augmentation mammoplasty patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1995, Bd. 95, Nr. 3, S. 513–519. ISSN 0032-1052.
- [100] LUU H. M. und HUTTER J. C., Bioavailability of octamethylcyclotetrasiloxane (D(4)) after exposure to silicones by inhalation and implantation. *Environmental Health Perspectives*, 2001, Bd. 109, Nr. 11, S. 1095. ISSN 0091-6765.
- [101] MCGILVERY R., *Biochemistry - A Functional Approach*. Philadelphia/London/Toronto: Holt-Saunders International, 2. Aufl., 1979. ISBN 0721659136.
- [102] EISENBERG H. V. und BARTELS R. J., Rupture of a silicone bag-gel breast implant by closed compression capsulotomy: case report. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1977, Bd. 59, Nr. 6, S. 849–850. ISSN 0032-1052.
- [103] NELSON G. D., Complications from the treatment of fibrous capsular contracture of the breast. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1981, Bd. 68, Nr. 6, S. 969–970. ISSN 0032-1052.
- [104] GRUBER R. P. und FRIEDMAN G., The pressures generated by closed capsulotomies of augmented breasts. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1978, Bd. 62, Nr. 3, S. 379–380. ISSN 0032-1052.
- [105] ADAMS JR W. P., ROBINSON JR J. B. und ROHRICH R. J., Lipid infiltration as a possible biologic cause of silicone gel breast implant aging. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1998, Bd. 101, Nr. 1, S. 64–68. ISSN 0032-1052.
- [106] HÖLMICH L. R., FRYZEK J. P., KJØLLER K., BREITING V. B., JØRGENSEN A., KRAG C. und MCLAUGHLIN J. K., The diagnosis of silicone breast-implant rupture: clinical findings compared with findings at magnetic resonance imaging. *Annals of Plastic Surgery*, 2005, Bd. 54, Nr. 6, S. 583–589. ISSN 0148-7043.
- [107] HÖLMICH L. R., FRIIS S., FRYZEK J. P., VEJBORG I. M., CONRAD C., SLETTING S., KJØLLER K., MCLAUGHLIN J. K. und OLSEN J. H., Incidence of silicone breast implant rupture. *Archives of Surgery*, 2003, Bd. 138, Nr. 7, S. 801–806. ISSN 0004-0010.
- [108] MAROTTA J. S., GOLDBERG E. P., HABAL M. B., AMERY D. P., MARTIN P. J., URBANIAK D. J. und WIDENHOUSE C. W., Silicone gel breast implant failure: evaluation of properties of shells and gels for explanted prostheses and meta-analysis of literature rupture data. *Annals of Plastic Surgery*, 2002, Bd. 49, Nr. 3, S. 227–247. ISSN 0148-7043.
- [109] MAROTTA J. S., WIDENHOUSE C. W., HABAL M. B. und GOLDBERG E. P., Silicone gel breast implant failure and frequency of additional surgeries: analysis of 35

- studies reporting examination of more than 8000 explants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, Bd. 48, Nr. 3, S. 354–364. ISSN 1097-4636.
- [110] HAMMOND D. C., MIGLIORI M. M., CAPLIN D. A., GARCIA M. E. und PHILLIPS C. A., Mentor Contour Profile Gel implants: clinical outcomes at 6 years. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2012, Bd. 129, Nr. 6, S. 1381–1391. ISSN 0032-1052.
- [111] MAXWELL G. P., VAN NATTA B. W., MURPHY D. K., SLICTON A. und BENGTON B. P., Natrelle style 410 form-stable silicone breast implants: core study results at 6 years. *Aesthetic Surgery Journal*, 2012, Bd. 32, Nr. 6, S. 709–717. ISSN 1090-820X.
- [112] TARK K. C., JEONG H. S., ROH T. S. und CHOI J. W., Analysis of 30 breast implant rupture cases. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2005, Bd. 29, Nr. 6, S. 460–469. ISSN 0364-216X.
- [113] JUANPERE S., PEREZ E., HUC O., MOTOS N., PONT J. und PEDRAZA S., Imaging of breast implants - a pictorial review. *Insights into Imaging*, 2011, Bd. 2, Nr. 6, S. 653–670. ISSN 1869-4101.
- [114] ANDERSEN B., ALANI H., KAPETANSKY D. und HAWTOF D. B., The diagnosis of ruptured breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1989, Bd. 84, Nr. 6, S. 903–907. ISSN 0032-1052.
- [115] GORCZYCA D., GORCZYCA S. M. und GORCZYCA K. L., The diagnosis of silicone breast implant rupture. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2007, Bd. 120, Nr. 7, S. 49S–61S. ISSN 0032-1052.
- [116] HAUTH E. A., HOFFMANN O., ZADOW-EULERICH T., KIMMIG R. und FORSTING M., Die Magnetresonanztomographie in der Diagnostik von Brustimplantaten: Eine Übersicht. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau*, 2008, Bd. 48, Nr. 2, S. 76–83. ISSN 1018-8843.
- [117] PFLEIDERER B. und HEINDEL W., MRT und MRS nach Silikon Aufbau der weiblichen Brust. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, 2001, S. 571–579. ISSN 1438-9029.
- [118] MCLAUGHLIN J. K., LIPWORTH L., MURPHY D. K. und WALKER P. S., The safety of silicone gel-filled breast implants: a review of the epidemiologic evidence. *Annals of Plastic Surgery*, 2007, Bd. 59, Nr. 5, S. 569–580. ISSN 0148-7043.
- [119] BERG W. A., NGUYEN T. K., MIDDLETON M. S., SOO M. S., PENNELLO G. und BROWN S. L., MR imaging of extracapsular silicone from breast implants: diagnostic pitfalls. *American Journal of Roentgenology*, 2002, Bd. 178, Nr. 2, S. 465–472. ISSN 0361-803X.
- [120] QUINN S. F., NEUBAUER N. M., SHELEY R. C., DEMLOW T. A. und SZUMOWSKI J., MR imaging of silicone breast implants: evaluation of prospective and retrospective interpretations and interobserver agreement. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 1996, Bd. 6, Nr. 1, S. 213–218. ISSN 1522-2586.
- [121] AHN C. Y., DEBRUHL N. D., GORCZYCA D. P., SHAW W. W. und BASSETT L. W., Comparative silicone breast implant evaluation using mammography, sonography, and magnetic resonance imaging: experience with 59 implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1994, Bd. 94, Nr. 5, S. 620–627. ISSN 0032-1052.

- [122] DI BENEDETTO G., CECCHINI S., GRASSETTI L., BALDASSARRE S., VALERI G., LEVA L., GIUSEPPETTI G. M. und BERTANI A., Comparative study of breast implant rupture using mammography, sonography, and magnetic resonance imaging: correlation with surgical findings. *The breast journal*, 2008, Bd. 14, Nr. 6, S. 532–537. ISSN 1524-4741.
- [123] SAMUELS J. B., ROHRICH R. J., WEATHERALL P. T., HO A. M. W. und GOLDBERG K. L., Radiographic diagnosis of breast implant rupture: current status and comparison of techniques. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1995, Bd. 96, Nr. 4, S. 865–877. ISSN 0032-1052.
- [124] GAMPPER T. J., KHOURY H., GOTTLIEB W. und MORGAN R. F., Silicone gel implants in breast augmentation and reconstruction. *Annals of Plastic Surgery*, 2007, Bd. 59, Nr. 5, S. 581–590. ISSN 0148-7043.
- [125] GERSZTEN P. C., A formal risk assessment of silicone breast implants. *Biomaterials*, 1999, Bd. 20, Nr. 11, S. 1063–1069. ISSN 0142-9612.
- [126] GOLDBERG E. P., Silicone breast implant safety: physical, chemical, and biologic problems. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1997, Bd. 99, Nr. 1, S. 258–260. ISSN 0032-1052.
- [127] HAJDU S. D., AGMON-LEVIN N. und SHOENFELD Y., Silicone and autoimmunity. *European Journal of clinical Investigation*, 2011, Bd. 41, Nr. 2, S. 203–211. ISSN 1365-2362.
- [128] PRANTL L., SCHREML S., FICHTNER-FEIGL S., PÖPPL N., EISENMANN-KLEIN M., SCHWARZE H. und FÜCHTMEIER B., Clinical and morphological conditions in capsular contracture formed around silicone breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2007, Bd. 120, Nr. 1, S. 275–284. ISSN 0032-1052.
- [129] DE CÁSSIA NOVAES W. und BERG A., Experiences with a new nonbiodegradable hydrogel (Aquamid): a pilot study. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2003, Bd. 27, Nr. 5, S. 376–380. ISSN 0364-216X.
- [130] LLOYD A. W., FARAGHER R. G. A. und DENYER S. P., Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*, 2001, Bd. 22, Nr. 8, S. 769–785. ISSN 0142-9612.
- [131] WILFLINGSEDER P., HOINKES G. und MIKUZ G., Tissue reactions from silicone implant in augmentation mammoplasties. *Minerva chirurgica*, 1983, Bd. 38, Nr. 12, S. 877. ISSN 0026-4733.
- [132] FRIEMANN J., BAUER M., GOLZ B., ROMBECK N., HÖHR D., ERBS G., STEINAU H. U. und OLBRISCH R. R., Physiologic and pathologic patterns of reaction to silicone breast implants. *Zentralblatt für Chirurgie*, 1996, Bd. 122, Nr. 7, S. 551–564. ISSN 0044-409X.
- [133] KAMEL M., PROTZNER K., FORNASIER V., PETERS W., SMITH D. und IBANEZ D., The peri-implant breast capsule: An immunophenotypic study of capsules taken at explantation surgery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, Bd. 58, Nr. 1, S. 88–96. ISSN 1097-4636.
- [134] LILLA J. A. und VISTNES L. M., Long-term study of reactions to various silicone breast implants in rabbits. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1976, Bd. 57, Nr. 5, S. 637–649. ISSN 0032-1052.
- [135] WOLFRAM D., RAINER C., NIEDEREGGER H., PIZA H. und WICK G., Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants

- with special focus on local immune reactions. *Journal of Autoimmunity*, 2004, Bd. 23, Nr. 1, S. 81–91. ISSN 0896-8411.
- [136] ALFANO C., MAZZOCCHI M. und SCUDERI N., Mammary compliance: An objective measurement of capsular contracture. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2004, Bd. 28, Nr. 2, S. 75–79. ISSN 0364-216X.
- [137] HANDEL N., CORDRAY T., GUTIERREZ J. und JENSEN J A., A long-term study of outcomes, complications, and patient satisfaction with breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006, Bd. 117, Nr. 3, S. 757–767. ISSN 0032-1052.
- [138] HENRIKSEN T. F., FRYZEK J. P., HÖLMICH L. R., MCLAUGHLIN J. K., KJØLLER K., HØYER A. P., OLSEN J. H. und FRIIS S., Surgical intervention and capsular contracture after breast augmentation: a prospective study of risk factors. *Annals of Plastic Surgery*, 2005, Bd. 54, Nr. 4, S. 343–351. ISSN 0148-7043.
- [139] PRANTL L., SCHREML S., FICHTNER-FEIGL S., PÖPPL N., ROLL C., EISENMANN-KLEIN M. und HOFSTÄDTER F., Histologische und immunhistochemische Untersuchungen bei Kapselkontraktur nach glatten Brustimplantaten. *Handchirurgie, Mikrochirurgie und Plastischen Chirurgie*, 2006, Bd. 38, Nr. 4, S. 224–232. ISSN 0722-1819.
- [140] KOSSOVSKY N. und FREIMAN C. J., Immunology of silicone breast implants. *Journal of Biomaterials Applications*, 1994, Bd. 8, Nr. 3, S. 237–246. ISSN 0885-3282.
- [141] BARTZOKA V., MCDERMOTT M. R. und BROOK M. A., Protein-Silicone Interactions. *Advanced Materials*, 1999, Bd. 11, Nr. 3, S. 257–259. ISSN 1521-4095.
- [142] SUN L., ALEXANDER H., LATTARULO N., BLUMENTHAL N. C., RICCI J. L. und CHEN G.-G., Protein denaturation induced by cyclic silicone. *Biomaterials*, 1997, Bd. 18, Nr. 24, S. 1593–1597. ISSN 0142-9612.
- [143] MIRO-MUR F., HINDIE M., KANDHAYA-PILLAI R., TOBAJAS V., SCHWARTZ S. und ALIJOTAS-REIG J., Medical-grade silicone induces release of proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells without activating T cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, Bd. 90, Nr. 2, S. 510–520. ISSN 1552-4981.
- [144] TAVAZZANI F., XING S., WADDELL J. E., SMITH D. und BOYNTON E. L., In vitro interaction between silicone gel and human monocyte-macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research Part*, 2005, Bd. 72, Nr. 2, S. 161–167. ISSN 1552-4965.
- [145] HEGGERS J. P., KOSSOVSKY N., PARSONS R. W., ROBSON M. C., PELLEY R. P. und RAINE T. J., Biocompatibility of silicone implants. *Annals of Plastic Surgery*, 1983, Bd. 11, Nr. 1, S. 38–45. ISSN 0148-7043.
- [146] SPIERA R. F., GIBOFISKY A. und SPIERA H., Silicone gel filled breast implants and connective tissue disease: an overview. *The Journal of rheumatology*, 1994, Bd. 21, Nr. 2, S. 239–245. ISSN 0315-162X.
- [147] FRIIS S. , HÖLMICH L. R., MCLAUGHLIN J. K., KJØLLER K., FRYZEK J. P., HENRIKSEN T. F. und OLSEN J. H., Cancer risk among Danish women with cosmetic breast implants. *International Journal of Cancer*, 2006, Bd. 118, Nr. 4, S. 998–1003. ISSN 1097-0215.

- [148] JANOWSKY E. C., KUPPER L. L. und HULKA B. S., Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases. *New England Journal of Medicine*, 2000, Bd. 342, Nr. 11, S. 781–790. ISSN 0028-4793.
- [149] LEVY Y., ROTMAN-PIKIELNY P., EHRENFELD M. und SHOENFELD Y., Silicone breast implantation-induced scleroderma: description of four patients and a critical review of the literature. *Lupus*, 2009, Bd. 18, Nr. 13, S. 1226–1232. ISSN 0961-2033.
- [150] LIPWORTH L., TARONE R. E., FRIIS S., YE W., OLSEN J. H., NYREN O. und MCLAUGHLIN J. K., Cancer among Scandinavian women with cosmetic breast implants: A pooled long-term follow-up study. *International Journal of Cancer*, 2009, Bd. 124, Nr. 2, S. 490–493. ISSN 1097-0215.
- [151] PRANTL L., FICHTNER-FEIGL S., HOFSTAEDTER F., LENICH A., EISENMANN-KLEIN M. und SCHREML S., Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with silicone breast implants. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2008, Bd. 121, Nr. 1, S. 25–30. ISSN 0032-1052.
- [152] SCHARL A., Seltene Krebserkrankung ALCL – häufiger bei Brustimplantaten? *Geburtshilfe Frauenheilkunde*, 2011, Bd. 71, Nr. 11, S. 1008–1010. ISSN 0016-5751.
- [153] CENTER FOR DEVICES AND RADIOLOGICAL HEALTH. *Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in women with breast implants: Preliminary FDA findings and analyses. January 2011* [online], [Zugriff am: 24. November 2015]. Verfügbar unter: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/ImplantsandProsthetics/BreastImplants/ucm239996.htm#executivesummary>
- [154] JEWELL M., SPEAR S. L., LARGENT J., OEFELEIN M. G. und ADAMS JR. W. P., Anaplastic large T-cell lymphoma and breast implants: a review of the literature. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2011, Bd. 128, Nr. 3, S. 651–661. ISSN 0032-1052.
- [155] EAVES F. und NAHAI F., Anaplastic large cell lymphoma and breast implants: FDA report. *Aesthetic Surgery Journal*. 2011, Bd. 31, Nr. 4, S. 467–468. ISSN 1090-820X.
- [156] BECKER N., DEEG E. und NIETERS A., Epidemiologische Fall-Kontrollstudie zur Ätiologie von Lymphomen. *Fachinformationszentrum Energie, Physik, Mathematik*, 2004. BMU-2004-639, S. 1-170. ISSN 1612-6386
- [157] HARDELL L. und ERIKSSON M., A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer*, 1999, Bd. 85, Nr. 6, S. 1353–1360. ISSN 1097-0142.
- [158] BRINTON L. A., LUBIN J. H., BURICH M. C., COLTON T., BROWN S. L. und HOOVER R. N., Cancer risk at sites other than the breast following augmentation mammoplasty. *Annals of Epidemiology*, 2001, Bd. 11, Nr. 4, S. 248–256. ISSN 1047-2797.
- [159] CROUZET C., GANGLOFF D., CHAPUT B., GROLLEAU J.-L. und GARRIDO I., Bilan à 18 mois du retrait du marché des prothèses Poly Implant Prothèse. Expérience d'un centre anticancéreux. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*, 2012, Bd. 57, Nr. 1, S. 9–15. ISSN 0294-1260.
- [160] BERRY M. G. und STANEK J. J., PIP implant biodurability: A post-publicity update. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2013, Bd. 66, Nr. 9, S. 1174–1181. ISSN 1748-6815.

- [161] SWARTS E., KOP A. M., NILASAROYA A., KEOGH C. V. und COOPER T., Rupture of poly implant prothèse silicone breast implants: an implant retrieval study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2013, Bd. 131, Nr. 4, S. 480e–489e. ISSN 0032-1052.
- [162] VARAPRATH S., STUTTS D. H. und KOZERSKI G. E., A Primer on the Analytical Aspects of Silicones at Trace Levels-Challenges and Artifacts – A Review. *Silicon Chemistry*, 2006, Bd. 3, Nr. 1-2, S. 79–102. ISSN 1569-0660.
- [163] WANG D. G., NORWOOD W., ALAEE M., BYER J. D. und BRIMBLE S., Review of recent advances in research on the toxicity, detection, occurrence and fate of cyclic volatile methyl siloxanes in the environment. *Chemosphere*, 2013, Bd. 93, Nr. 5, S. 711–725. ISSN 0045-6535.
- [164] BRUGGEMAN W. A., WEBER-FUNG D., OPPERHUIZEN A., VANDERSTEEN J., WIJBENGA A. und HUTZINGER O., Absorption and retention of polydimethylsiloxanes (silicones) in fish: Preliminary experiments. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1984, Bd. 7, Nr. 4, S. 287–296. ISSN 0277-2248.
- [165] XU S. und KROPSKOTT B., Method for simultaneous determination of partition coefficients for cyclic volatile methylsiloxanes and dimethylsilanediol. *Analytical Chemistry*, 2012, Bd. 84, Nr. 4, S. 1948–1955. ISSN 0003-2700.
- [166] LENNART K., SCHLABACH M., ANDERSSON J., COUSINS A. P., SCHMIDBAUER N., BRORSTRÖM-LUNDÉN E., MOGENSEN B. B., DAM M., HIRVI J. P. und SIGURDSSON A. S., *Siloxanes in the Nordic Environment*. Copenhagen: Nordic Council of Ministers, 2005. ISBN 9284312688.
- [167] REDMAN A. D., MIHAICH E., WOODBURN K., PAQUIN P., POWELL D., MCGRATH J. A. und DI TORO D. M., Tissue-based risk assessment of cyclic volatile methyl siloxanes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, Bd. 31, Nr. 8, S. 1911–1919. ISSN 1552-8618.
- [168] CHAINET F., LIENEMANN C.-P., COURTIADÉ M., PONTIUS J. und DONARD O. F. X., Silicon speciation by hyphenated techniques for environmental, biological and industrial issues: A review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2011, Bd. 26, Nr. 1, S. 30. ISSN 0267-9477.
- [169] LEI Y. D., WANIA F. und MATHERS D., Temperature-dependent vapor pressure of selected cyclic and linear polydimethylsiloxane oligomers. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 2010, Bd. 55, Nr. 12, S. 5868–5873. ISSN 0021-9568.
- [170] MYERS R. S. und CLEVER H. L., Surface tension of octamethylcyclotetrasiloxane and hexamethyldisilazane and their solutions with carbon tetrachloride and n-hexadecane. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 1969, Bd. 14, Nr. 2, S. 161–164. ISSN 0021-9568.
- [171] VARAPRATH S., FRYE C. L. und HAMELINK J., Aqueous solubility of permethylsiloxanes (silicones). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, Bd. 15, Nr. 8, S. 1263–1265. ISSN 1552-8618.
- [172] ANDRIOT M., CHAO S. H., COLAS A. R., CRAY S. E., DEBUYL F., DEGROOT J. V., DUPONT A., EASTON T., GARAUD J. L. und GERLACH E., Silicones in industrial applications. In: R.D. JAEGER und M. GLERIA, Hrsg. *Silicon-Based Inorganic Polymers*. New York, NY: Nova Science Publishers, 2009, S. 61–161. ISBN 1600216560.

- [173] COMPANIONI-DAMAS E. Y., SANTOS F. J. und GALCERAN M. T., Analysis of linear and cyclic methylsiloxanes in water by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, 2012, Bd. 89, S. 63–69. ISSN 0039-9140.
- [174] COLAS A. und CURTIS J. Silicone biomaterials: history and chemistry and Medical Applications of Silicones. In: B. D. RATNER, A. S. HOFFMAN, F. J. SCHOEN und J. E. LEMONS, Hrsg. *Biomaterials science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2. Aufl., 2004, S. 80–86; 697–707. ISBN 9780125824613.
- [175] HOH E. und MASTOVSKA K., Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2008, Bd. 1186, Nr. 1, S. 2–15. ISSN 0021-9673.
- [176] HORII Y. und KANNAN K., Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, Bd. 55, Nr. 4, S. 701–710. ISSN 0090-4341.
- [177] VARAPRATH S., SALYERS K. L., PLOTZKE K. P. und NANAVATI S., Identification of metabolites of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) in rat urine. *Drug Metabolism and Disposition*, 1999, Bd. 27, Nr. 11, S. 1267–1273. ISSN 1521-009X.
- [178] VARAPRATH S., SEATON M., MCNETT D., CAO L. und PLOTZKE K. P., Quantitative determination of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) in extracts of biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2000, Bd. 77, Nr. 3, S. 203–219. ISSN 0306-7319.
- [179] WANG R., MOODY R. P., KONIECKI D. und ZHU J., Low molecular weight cyclic volatile methylsiloxanes in cosmetic products sold in Canada: Implication for dermal exposure. *Environment International*, 2009, Bd. 35, Nr. 6, S. 900–904. ISSN 0160-4120.
- [180] GODDARD D. E. und GRUBER J. V., *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care*. New York, NY: CRC Press, 1999. ISBN 0824719239.
- [181] LU Y., YUAN T., WANG W. und KANNAN K., Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China. *Environmental Pollution*, 2011, Bd. 159, Nr. 12, S. 3522–3528. ISSN 0269-7491.
- [182] GOUIN T., VAN EGMOND R., SPARHAM C., HASTIE C. und CHOWDHURY N., Simulated use and wash-off release of decamethylcyclopentasiloxane used in anti-perspirants. *Chemosphere*, 2013, Bd. 93, Nr. 5, S. 726–734. ISSN 0045-6535.
- [183] O'LENICK A. J., *Silicones for personal care*. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2. Aufl., 2003. ISBN 0931710979.
- [184] REISCH M. S., Storm over silicones. *Chemical and Engineering News*, 2011, Bd. 89, Nr. 18, S. 10–13. ISSN 0009-2347.
- [185] JOHNSON W., BERGFELD W. F., BELSITO D. V., HILL R., KLAASSEN C. D., LIEBLER D. C., MARKS J. G., SHANK R. C., SLAGA T. J., SNYDER P. W. und ANDERSEN F., Safety Assessment of Cyclomethicone, Cyclotetrasiloxane, Cyclopentasiloxane, Cyclohexasiloxane, and Cycloheptasiloxane. *International Journal of Toxicology*. 2011, Bd. 30, Nr. 6 Suppl, S. 149S–227S. ISSN 1091-5818.

- [186] MONTEMAYOR B. P., PRICE B. B. und VAN EGMOND R. A., Accounting for intended use application in characterizing the contributions of cyclopentasiloxane (D5) to aquatic loadings following personal care product use: Antiperspirants, skin care products and hair care products. *Chemosphere*, 2013, Bd. 93, Nr. 5, S. 735–740. ISSN 0045-6535.
- [187] KIERKEGAARD Amelie., ADOLFSSON-ERICI M. und MCLACHLAN M. S., Determination of cyclic volatile methylsiloxanes in biota with a purge and trap method. *Analytical chemistry*, 2010, Bd. 82, Nr. 22, S. 9573–9578. ISSN 0003-2700.
- [188] SPARHAM C., VAN EGMOND R., O'CONNOR S., HASTIE C., WHELAN M., KANDA R. und FRANKLIN O., Determination of decamethylcyclopentasiloxane in river water and final effluent by headspace gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, Bd. 1212, Nr. 1-2, S. 124–129. ISSN 00219673.
- [189] ARAMENDIA M. A., BORAU V., GARCIA I., JIMENEZ C., LAFONT F., MARINAS J. M. und URBANO F. J., Determination of volatile organic compounds in drinking and waste water from Cordoba (Spain) by closed-loop stripping analysis in combination with gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1998, Bd. 67, Nr. 1-2, S. 9–25. ISSN 0277-2248.
- [190] TRIMBORN M., ROTH M. und NELLESSEN U., Untersuchung des Ausbreitungsverhaltens von Siliciumverbindungen am Beispiel der Kläranlage Zülpich-Bessenich (Erftverband). *KA. Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall*, 2003, Bd. 50, Nr. 7, S. 908–913. ISSN 1616-430X.
- [191] FENDINGER N. J., MCAVOY D. C., ECKHOFF W. S. und PRICE B. B., Environmental occurrence of polydimethylsiloxane. *Environmental Science and Technology*, 1997, Bd. 31, Nr. 5, S. 1555–1563. ISSN 0013-936X.
- [192] WARNER N., EVENSET A., CHRISTENSEN G., GABRIELSEN G. W., BORGÄ K. und LEKNES H., Volatile siloxanes in the European Arctic: Assessment of sources and spatial distribution. *Environmental Science and Technology*, 2010, Bd. 44, Nr. 19, S. 7705–7710. ISSN 0013-936X.
- [193] MUIR D. C. G. und HOWARD P. H., Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. *Environmental Science and Technology*, 2006, Bd. 40, Nr. 23, S. 7157–7166. ISSN 0013-936X.
- [194] KIERKEGAARD A., VAN EGMOND R. und MCLACHLAN M. S. Cyclic volatile methylsiloxane bioaccumulation in flounder and ragworm in the humber estuary. *Environmental Science and Technology*, 2011, Bd. 45, Nr. 14, S. 5936–5942. ISSN 0013-936X.
- [195] UNITED NATIONS. *Final act of the conference of plenipotentiaries on the Stockholm Convention on persistent organic pollutants*. In: United Nations Environment Program [online]. 2001, S. 1–44. [Zugriff: 24. November 2015]. Verfügbar unter: http://www.pops.int/documents/meetings/dipcon/25june2001/conf4_finalact/en/FINALACT-English.PDF
- [196] FACKLER P. H., DIONNE E., HARTLEY D. A. und HAMELINK J. L., Bioconcentration by fish of a highly volatile silicone compound in a totally enclosed aquatic exposure system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, Bd. 14, Nr. 10, S. 1649–1656. ISSN 1552-8618.

- [197] GOBAS F. A. P. C., POWELL D. E., WOODBURN K. B., SPRINGER T. HUGGETT und D. B., Bioaccumulation of decamethylpentacyclosiloxane (D5): A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online], 2015. ISSN 1552-8618. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.3242/epdf>
- [198] ANDERSEN M. E., SARANGAPANI R., REITZ R. H., GALLAVAN R. H., DOBREV I. D. und PLOTZKE K. P., Physiological modeling reveals novel pharmacokinetic behavior for inhaled octamethylcyclotetrasiloxane in rats. *Toxicological Sciences*, 2001, Bd. 60, Nr. 2, S. 214–231. ISSN 1096-6080.
- [199] PLOTZKE K. P., CROFOOT S. D., FERDINANDI E. S., BEATTIE J. G., REITZ R. H., MCNETT D., MEEKS R. G., Disposition of Radioactivity in Fischer 344 Rats After Single and Multiple Inhalation Exposure To [¹⁴C]Octamethylcyclotetrasiloxane ([¹⁴C] D4). *Drug Metabolism and Disposition*, 2000, Bd. 28, Nr. 2, S. 192–204. ISSN 0090-9556.
- [200] PARROTT J. L., ALAEE M., WANG D. und SVERKO E., Fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryo to adult exposure to decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Chemosphere*, 2013, Bd. 93, Nr. 5, S. 813–818. ISSN 0045-6535.
- [201] OPPERHUIZEN A., DAMEN H. W. J., ASYEE G. M., VAN DER STEEN J.M. D. und HUTZINGER O., Uptake and elimination by fish of polydimethylsiloxanes (silicones) after dietary and aqueous exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1987, Bd. 13, Nr. 3-4, S. 265–285. ISSN 0277-2248.
- [202] POWELL D. E., DURHAM J., HUFF D. W., BÖHMER T., GERHARDS R. und KOERNER M., Bioaccumulation and Trophic Transfer of Cyclic Volatile Methylsiloxane (cVMS) Materials in the Aquatic Marine Food Webs of Inner and Outer Oslofjord, Norway. *Dow Corning Corporation, Auburn, Health and Environmental Sciences*, 2010, Bd. 22, S. 11060–11108.
- [203] SCHWEIGKOFER M. und NIESSNER R., Determination of siloxanes and VOC in landfill gas and sewage gas by canister sampling and GC-MS/AES analysis. *Environmental Science and Technology*, 1999, Bd. 33, Nr. 20, S. 3680–3685. ISSN 0013-936X.
- [204] BADJAGBO K., FURTOS A., ALAEE M., MOORE S. und SAUVE S., Direct analysis of volatile methylsiloxanes in gaseous matrixes using atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2009, Bd. 81, Nr. 17, S. 7288–7293. ISSN 0003-2700.
- [205] MCBEAN E. A., Siloxanes in biogases from landfills and wastewater digesters. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 2008, Bd. 35, Nr. 4, S. 431–436. ISSN 0315-1468.
- [206] PIERI F., KATSOYIANNIS A., MARTELLINI T., HUGHES D., JONES K. C. und CINCINELLI A., Occurrence of linear and cyclic volatile methyl siloxanes in indoor air samples (UK and Italy) and their isotopic characterization. *Environment International*, 2013, Bd. 59, S. 363–371. ISSN 0160-4120.
- [207] TRAN T. M. und KANNAN K., Occurrence of cyclic and linear siloxanes in indoor air from Albany, New York, USA, and its implications for inhalation exposure. *Science of the Total Environment*, 2015, Bd. 511, S. 138–144. ISSN 0048-9697.
- [208] HANSEN L., WARNER N. A., BRAATHEN T., ODLAND J., LUND E., NIEBOER E. und SANDANGER T. M., Plasma concentrations of cyclic volatile

- methylsiloxanes (cVMS) in pregnant and postmenopausal Norwegian women and self-reported use of personal care products (PCPs). *Environment International*, 2013, Bd. 51, S. 82–87. ISSN 0160-4120.
- [209] BIESTERBOS J. W. H., BECKMANN G., ANZION R. B. M., RAGAS A. M. J., RUSSEL F. G. M. und SCHEEPERS P. T. J., Sensitive Method for Quantification of Octamethylcyclotetrasiloxane (D4) and Decamethylcyclopentasiloxane (D5) in End-Exhaled Air by Thermal Desorption Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2014, Bd. 86, S. 5794–5799. ISSN 0003-2700.
- [210] JOVANOVIĆ M. L., MCMAHON J. M., MCNETT D. A., TOBIN J. M. und PLOTZKE K. P., In vitro and In vivo percutaneous absorption of 14 C-octamethylcyclotetrasiloxane (14C-D4) and 14 C-decamethylcyclopentasiloxane (14C-D5). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, Bd. 50, Nr. 2, S. 239–248. ISSN 0273-2300.
- [211] REDDY M. B., LOONEY R. J., UTELL M. J., PLOTZKE K. P. und ANDERSEN M. E., Human Dermal Absorption Modeling of Octamethylcyclotetrasiloxane (D4) and Decamethylcyclopentasiloxane (D5). *Toxicological Sciences*, 2007, Bd. 99, Nr. 2, S. 422–431. ISSN 1096-6080.
- [212] HUTTER H.-P., WALLNER P., MOSHAMMER H., HARTL W., SATTELBERGER R., LORBEER G. und KUNDI M., Synthetic musks in blood of healthy young adults: Relationship to cosmetics use. *Science of the Total Environment*, 2009, Bd. 407, Nr. 17, S. 4821–4825. ISSN 0048-9697.
- [213] HUTTER H.-P., WALLNER P., HARTL W., UHL M., LORBEER G., GMINSKI R., MERSCH-SUNDERMANN V. und KUNDI M., Higher blood concentrations of synthetic musks in women above fifty years than in younger women. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2010, Bd. 213, Nr. 2, S. 124–130. ISSN 1438-4639.
- [214] UTELL M. J., GELEIN R., YU C. P., KENAGA C., GEIGEL E., TORRES A., CHALUPA D., GIBB F. R., SPEERS D. M., MAST R. W. und MORROW P. E., Quantitative exposure of humans to an octamethylcyclotetrasiloxane (D4) vapor. *Toxicological Science*, 1998, Bd. 44, Nr. 2, S. 206–213. ISSN 1096-6080.
- [215] LU Y., YUAN T., YUN S. H., WANG W., WU Q. und KANNAN K., Occurrence of cyclic and linear siloxanes in indoor dust from China, and implications for human exposures. *Environmental Science and Technology*, 2010, Bd. 44, Nr. 16, S. 6081–6087. ISSN 0013-936X.
- [216] XU L., SHI Y., WANG T., DONG Z., SU W. und CAI Y., Methyl siloxanes in environmental matrices around a siloxane production facility, and their distribution and elimination in plasma of exposed population. *Environmental Science and Technology*, 2012, Bd. 46, Nr. 21, S. 11718–11726. ISSN 0013-936X.
- [217] XU L., SHI Y., LIU N. und CAI Y., Methyl siloxanes in environmental matrices and human plasma/fat from both general industries and residential areas in China. *Science of The Total Environment*, 2015, Bd. 505, S. 454–463. ISSN 0048-9697.
- [218] BASSINDALE A. R., BRANDSTADT K. F., LANE T. H. und TAYLOR P. G., Enzyme-catalysed siloxane bond formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, Bd. 96, Nr. 2–3, S. 401–406. ISSN 0162-0134.

- [219] BRANDSTADT K. F., Inspired by nature: an exploration of biocatalyzed siloxane bond formation and cleavage. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, Bd. 16, Nr. 4, S. 393–397. ISSN 0958-1669.
- [220] DEWIL R., APPELS L., BAEYENS J., BUCZYNSKA A. und VAN VAECK L., The analysis of volatile siloxanes in waste activated sludge. *Talanta*, 2007, Bd. 74, Nr. 1, S. 14–19. ISSN 0039-9140.
- [221] ATKINSON R., Kinetics of the gas-phase reactions of a series of organosilicon compounds with hydroxyl and nitrate (NO₃) radicals and ozone at 297±2 K. *Environmental Science and Technology*, 1991, Bd. 25, Nr. 5, S. 863–866. ISSN 0013-936X.
- [222] WHELAN M. J., ESTRADA E. und VAN EGMOND R., A modelling assessment of the atmospheric fate of volatile methyl siloxanes and their reaction products. *Chemosphere*, 2004, Bd. 57, Nr. 10, S. 1427–1437. ISSN 0045-6535.
- [223] UMWELTBUNDESAMT. Richtwerte für zyklische Dimethylsiloxane in der Innenraumluft. Mitteilung der Ad-hoc-Arbeitsgruppe Innenraumrichtwerte der Innenraumlufthygiene-Kommission des Umweltbundesamtes und der Obersten Landesgesundheitsbehörden. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2011, Bd. 54, S. 388–400. ISSN 1436-9990.
- [224] SOMMERLADE R., PARLAR H., WROBEL D. und KOCHS P., Product analysis and kinetics of the gasphase reactions of selected organosilicon compounds with OH radicals using a smog chamber-mass spectrometer system. *Environmental Science and Technology*, 1993, Bd. 27, Nr. 12, S. 2435–2440. ISSN 0013-936X.
- [225] XU S., Fate of cyclic methylsiloxanes in soils. 1. The degradation pathway. *Environmental Science and Technology*, 1999, Bd. 33, Nr. 4, S. 603–608. ISSN 0013-936X.
- [226] GRIESSBACH E. F. C. und LEHMANN R. G., Degradation of polydimethylsiloxane fluids in the environment—a review. *Chemosphere*. 1999, Bd. 38, Nr. 6, S. 1461–1468. ISSN 0045-6535.
- [227] CARPENTER J. C., CELLA J. A. und DORN S. B., Study of the degradation of polydimethylsiloxanes on soil. *Environmental Science and Technology*, 1995, Bd. 29, Nr. 4, S. 864–868. ISSN 0013-936X.
- [228] HIRNER A. V., FLASSBECK D. und GRUEMPING R. Organosilicon compounds in the environment. In: P. J. CRAIG, Hrsg. *Oganometallic compounds in the environment*. Wiley-VCH Weinheim, 2. Aufl., 2003, S. 305–351. ISBN 9780471899938.
- [229] LEHMANN R. G., FRYE C. L., TOLLE D. A. und ZWICK T. C., Fate of sludge-applied silicones in agricultural soil microcosms. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1996, Bd. 87, Nr. 1-4, S. 231–243. ISSN 0049-6979.
- [230] GRÜMPING R., MICHALKE K., HIRNER A. V. und HENSEL R., Microbial degradation of octamethylcyclotetrasiloxane. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, Bd. 65, Nr. 5, S. 2276–2278. ISSN 0099-2240.
- [231] HOBBS E. J., KEPLINGER M. L. und CALANDRA J. C., Toxicity of polydimethylsiloxanes in certain environmental systems. *Environmental research*, 1975, Bd. 10, Nr. 3, S. 397–406. ISSN 0013-9351.

- [232] PARKER W. J., SHI J., FENDINGER N. J., MONTEITH H. D. und CHANDRA G., Pilot plant study to assess the fate of two volatile methyl siloxane compounds during municipal wastewater treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, Bd. 18, Nr. 2, S. 172–181. ISSN 1552-8618.
- [233] MCKIM J. M., KOLESAR G. B., CHOUDHURI S., MADAN A., DOCHTERMAN L. W., BREEN J.G., PARKINSON A., MAST R. W. und MEEKS R. G., Evaluation of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) as an inducer of rat hepatic microsomal cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase, and epoxide hydrolase: a 28-day inhalation study. *Toxicological Sciences*, 1998, Bd. 41, Nr. 1, S. 29–41. ISSN 1096-6080.
- [234] REDDY M. B., ANDERSEN M. E., MORROW P. E., DOBREV I. D., VARAPRATH S., PLOTZKE K. P. und UTELL M. J., Physiological modeling of inhalation kinetics of octamethylcyclotetrasiloxane in humans during rest and exercise. *Toxicological Sciences*, 2003, Bd. 72, Nr. 1, S. 3–18. ISSN 1096-6080.
- [235] DOBREV I. D., NONG A., LIAO K. H., M. B. REDDY, K. P. PLOTZKE und ANDERSEN M. E., Assessing kinetic determinants for metabolism and oral uptake of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) from inhalation chamber studies. *Inhalation Toxicology*, 2008, Bd. 20, Nr. 4, S. 361–373. ISSN 1091-7691.
- [236] VARAPRATH S. und CAO L., Efficient solid phase extraction procedures for organo siloxanes and silanols from aqueous and biological matrices. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2000, Bd. 23, S. 1539–1553. ISSN 1082-6076.
- [237] FALANY C. N. und LI G., Effects of age and pregnancy on cytochrome P450 induction by octamethyltetracyclosiloxane in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Biochemical and molecular Toxicology*, 2005, Bd. 19, Nr. 2, S. 129–138. ISSN 1099-0461.
- [238] MEEKS R. G., STUMP D. G., SIDDIQUI W. H., HOLSON J. F., PLOTZKE K. P. und REYNOLDS V. L., An inhalation reproductive toxicity study of octamethylcyclotetrasiloxane (D 4) in female rats using multiple and single day exposure regimens. *Reproductive Toxicology*, 2007, Bd. 23, Nr. 2, S. 192–201. ISSN 0890-6238.
- [239] HE B., RHODES-BROWER S., MILLER M. R., MUNSON A. E., GERMOLEC D. R., WALKER V. R., KORACH K. S. und MEADE B. J., Octamethylcyclotetrasiloxane exhibits estrogenic activity in mice via ER α . *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, Bd. 192, Nr. 3, S. 254–261. ISSN 0041-008X.
- [240] DARBRE P. D., Underarm cosmetics are a cause of breast cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 2001, Bd. 10, Nr. 5, S. 389–394. ISSN 0959-8278.
- [241] DARBRE P. D., Underarm cosmetics and breast cancer. *Journal of Applied Toxicology*, 2003, Bd. 23, Nr. 2, S. 89–95. ISSN 1099-1263.
- [242] DARBRE P. D., Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006, Bd. 20, Nr. 1, S. 121–143. ISSN 1521-690X.
- [243] SOUSA J. V., MCNAMARA P. C., PUTT A. E., MACHADO M. W., SURPRENANT D. C., HAMELINK J. L., KENT D. J., SILBERHORN E. M. und HOBSON J. F., Effects of octamethylcyclotetrasiloxane (OMCTS) on freshwater and

- marine organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, Bd. 14, Nr. 10, S. 1639–1647. ISSN 1552-8618.
- [244] PETERS W., SMITH D., LUGOWSKI S., MCHUGH A., KERESTECI A. und BAINES C., Analysis of silicon levels in capsules of gel and saline breast implants and of penile prostheses. *Annals of Plastic Surgery*, 1995, Bd. 34, Nr. 6, S. 578–584. ISSN 0148-7043.
- [245] LUGOWSKI S. J., SMITH D. C., LUGOWSKI J. Z., PETERS W. und SEMPLE J., A review of silicon and silicone determination in tissue and body fluids—a need for standard reference materials. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1998, Bd. 360, Nr. 3-4, S. 486–488. ISSN 0937-0633.
- [246] HORNER H. J., WEILER J. E. und ANGELOTTI N. C., Visible and infrared spectroscopic determination of trace amounts of silicones in foods and biological materials. *Analytical Chemistry*, 1960, Bd. 32, Nr. 7, S. 858–861. ISSN 0003-2700.
- [247] FRICK R. und BAUDISCH H., Physikalisch-chemischer Nachweis von intravasalem Silikon in Hirn und Niere. *Beiträge zur Pathologie*, 1973, Bd. 149, Nr. 1, S. 39–46. ISSN 0005-8165.
- [248] LIPP E. D. und SMITH A. L., Infrared, Raman, Near-Infrared and Ultraviolet spectroscopy. In: A. L. Smith, Hrsg. *The Analytical Chemistry of Silicones*: Wiley-Interscience New York, Bd. 112, 1991, S. 305–345. ISBN 0471516244.
- [249] PFLEIDERER B., MOORE A., TOKAREVA E., ACKERMAN J. L. und GARRIDO L., Biodegradation of polysiloxanes in lymph nodes of rats measured with ²⁹Si-NMR. *Biomaterials*, 1999, Bd. 20, Nr. 6, S. 561–571. ISSN 0142-9612.
- [250] BADJAGBO K., HEROUX M., ALAEE M., MOORE S. und SAUVE S., Quantitative analysis of volatile methylsiloxanes in waste-to-energy landfill biogases using direct APCI-MS/MS. *Environmental Science and Technology*, 2010, Bd. 44, Nr. 2, S. 600–605. ISSN 0013-936X.
- [251] DORN S. B. und FRAME S. E. M., Development of a high-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma method for speciation and quantification of silicones: from silanols to polysiloxanes. *The Analyst*, 1994, Bd. 119, Nr. 8, S. 1687–1694. ISSN 0003-2654.
- [252] WANG D. G., ALAEE M., STEER H., TAIT T., WILLIAMS Z., BRIMBLE S., SVOBODA L., BARRESI E., DEJONG M., SCHACHTSCHNEIDER J., KAMINSKI E., NORWOOD W. und SVERKO E., Determination of cyclic volatile methylsiloxanes in water, sediment, soil, biota, and biosolid using large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 2013, Bd. 93, Nr. 5, S. 741–748. ISSN 0045-6535.
- [253] VARAPRATH S., Speciation and Quantitation of Degradation Products of Silicones (Silane/Siloxane Diols) by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Stability of Dimethylsilanediol. *Journal of Polymer Degradation*, 1997, Bd. 5, Nr. 1, S. 17–31. ISSN 1064-7546.
- [254] KALA S. V., LYKISSA E. D. und LEOVITZ R. M., Detection and characterization of poly (dimethylsiloxane) s in biological tissues by GC/AED and GC/MS. *Analytical Chemistry*, 1997, Bd. 69, Nr. 7, S. 1267–1272. ISSN 0003-2700.
- [255] SPARHAM C., VAN EGMOND R., HASTIE C., O'CONNOR S., GORE D. und CHOWDHURY N., Determination of decamethylcyclopentasiloxane in river and

- estuarine sediments in the UK. *Journal of Chromatography A*, 2011, Bd. 1218, Nr. 6, S. 817–823. ISSN 0021-9673.
- [256] COMPANIONI-DAMAS E. Y., SANTOS F. J. und GALCERAN M. T., Analysis of linear and cyclic methylsiloxanes in sewage sludges and urban soils by concurrent solvent recondensation–large volume injection–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2012, Bd. 1268, S. 150–156. ISSN 0021-9673.
- [257] SÁNCHEZ-BRUNETE C., MIGUEL E., ALBERO B. und TADEO J. L., Determination of cyclic and linear siloxanes in soil samples by ultrasonic-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, Bd. 1217, Nr. 45, S. 7024–7030. ISSN 0021-9673.
- [258] XU L., SHI Y. und CAI Y., Occurrence and fate of volatile siloxanes in a municipal Wastewater Treatment Plant of Beijing, China. *Water Research*, 2013, Bd. 47, Nr. 2, S. 715–724. ISSN 0043-1354.
- [259] KIERKEGAARD A. und MCLACHLAN M. S., Determination of decamethylcyclopentasiloxane in air using commercial solid phase extraction cartridges. *Journal of Chromatography A*, 2010, Bd. 1217, Nr. 21, S. 3557–3560. ISSN 0021-9673.
- [260] CHAINET F., COURTIADÉ M., LIENEMANN C.-P., PONTIUS J. und DONARD O. F. X., Silicon speciation by gas chromatography coupled to mass spectrometry in gasolines. *Journal of chromatography A*, 2011, Bd. 1218, Nr. 51, S. 9269–78. ISSN 1873-3778.
- [261] HUPPMANN R., LOHOFF H. W. und SCHRÖDER H. F., Cyclic siloxanes in the biological waste water treatment process–determination, quantification and possibilities of elimination. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1996, Bd. 354, Nr. 1, S. 66–71. ISSN 0937-0633.
- [262] CAMMANN, K. *Instrumentelle Analytische Chemie*. Spektrum-Verlag Heidelberg, 2001. ISBN 3827400570.
- [263] LEE Y. J., Gas chromatography-high resolution tandem mass spectrometry using a GC-APPI-LIT orbitrap for complex volatile compounds analysis. *Mass Spectrometry Letters*, 2012, Bd. 3, Nr. 2, S. 29. ISSN 2093-8950.
- [264] LAAKS J., JOCHMANN M. A. und SCHMIDT T. C., Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 2012, Bd. 402, Nr. 2, S. 565–571. ISSN 1618-2642.
- [265] LAAKS J., JOCHMANN M. A. und SCHMIDT T. C., Empfindlich, automatisch und ohne Lösungsmittel. *Nachrichten aus der Chemie*, 2013, Bd. 61, Nr. 1, S. 54–56. ISSN 1868-0054.
- [266] MOL H. G. J., JANSSEN H.-G. M., CRAMERS C. A., VREULS J. J. und UDO A., Trace level analysis of micropollutants in aqueous samples using gas chromatography with on-line sample enrichment and large volume injection. *Journal of Chromatography A*, 1995, Bd. 703, Nr. 1, S. 277–307. ISSN 0021-9673.
- [267] GROB K., KARRER G. und RIEKKOLA M.-L., On-column injection of large sample volumes using the retention gap technique in capillary gas-cromatography. *Journal of Chromatography A*, 1985, Bd. 334, S. 129–155. ISSN 0021-9673.

- [268] VOGT W., JACOB K., OHNESORGE A.-B. und OBWEXER H. W., Capillary gas chromatographic injection system for large sample volumes. *Journal of Chromatography A*, 1979, Bd. 186, S. 197–205. ISSN 0021-9673.
- [269] SCHELLIN M., HAUSER B. und POPP P., Determination of organophosphorus pesticides using membrane-assisted solvent extraction combined with large volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2004, Bd. 1040, Nr. 2, S. 251–258. ISSN 0021-9673.
- [270] GHOSH A., SEELEY S. K., NARTKER S. R. und SEELEY J. V., Analysis of siloxanes in hydrocarbon mixtures using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2014, Bd. 1360, S. 258–263. ISSN 0021-9673.
- [271] CHAINET F., LIENEMANN C.-P., PONTIUS J., COURTIADÉ M. und DONARD Olivier François Xavier. Development of heart-cutting multidimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry for silicon speciation at trace levels in gasoline samples. *Journal of Chromatography A*, 2012, Bd. 1264, S. 80–86. ISSN 0021-9673.
- [272] DEANS D. R., A new technique for heart cutting in gas chromatography. *Chromatographia*, 1968, Bd. 1, Nr. 1-2, S. 18–22. ISSN 0009-5893.
- [273] TRANCHIDA P. Q., SCIARRONE D., DUGO P. und MONDELLO L., Heart-cutting multidimensional gas chromatography: A review of recent evolution, applications, and future prospects. *Analytica Chimica Acta*, 2012, Bd. 716, S. 66–75. ISSN 0003-2670.
- [274] SEELEY J. V. und SEELEY S. K., Multidimensional gas chromatography: fundamental advances and new applications. *Analytical Chemistry*, 2012, Bd. 85, Nr. 2, S. 557–578. ISSN 0003-2700.
- [275] LIU Z. und PHILLIPS J. B., Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science*, 1991, Bd. 29, Nr. 6, S. 227–231. ISSN 0021-9665.
- [276] CORTES H. J., WINNIFORD B., LUONG J. und PURSCH M., Comprehensive two dimensional gas chromatography review. *Journal of Separation Science*, 2009, Bd. 32, Nr. 5-6, S. 883–904. ISSN 1615-9314.
- [277] MOSTAFA A., EDWARDS M. und GÓRECKI T., Optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2012, Bd. 1255, S. 38–55. ISSN 0021-9673.
- [278] CHIN S.-T. und MARRIOTT P. J., Multidimensional gas chromatography beyond simple volatiles separation. *Chemical Communications*, 2014, Bd. 50, Nr. 64, S. 8819–8833. ISSN 1359-7345.
- [279] RAMOS L., *Comprehensive two dimensional gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1. Aufl., 2009. ISBN 008093269X.
- [280] LEDFORD E. B., TERMAAT J. R. und BILLESBACH C. A., What is Loop Modulation? *Zoex Corporation*. 2008. Technical Note KT030606-1.
- [281] SCHOENMAKERS P., MARRIOTT P. und BEENS J., Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. *LCGC Europe*, 2003, Bd. 25, Nr. 5, S. 1–4. ISSN 1471-6577.

- [282] MARRIOTT P. J., WU Z.-Y. und SCHOENMAKERS P., Nomenclature and Conventions in Comprehensive Multidimensional Chromatography—An Update. *LCGC Europe*, 2012, Bd. 25, Nr. 5, S. 266–275. ISSN 1471-6577.
- [283] SCHOMBURG G., Two-dimensional gas chromatography: principles, instrumentation, methods. *Journal of Chromatography A*, 1995, Bd. 703, Nr. 1, S. 309–325. ISSN 0021-9673.
- [284] TRANCHIDA P. Q., PURCARO G., DUGO P. und MONDELLO L., Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, Bd. 30, Nr. 9, S. 1437–1461. ISSN 0165-9936.
- [285] BEENS J., ADAHCHOUR M., VREULS R. J. J., VAN ALTENA K. und UDO A. T., Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001, Bd. 919, Nr. 1, S. 127–132. ISSN 0021-9673.
- [286] OLDRIDGE N., PANIC O. und GÓRECKI T., Stop-flow comprehensive two-dimensional gas chromatography with pneumatic switching. *Journal of Separation Science*, 2008, Bd. 31, Nr. 19, S. 3375–3384. ISSN 1615-9314.
- [287] MARRIOTT P. J., CHIN S.-T., MAIKHUNTHOD B., SCHMARR H.-G. und BIERI S., Multidimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 2012, Bd. 34, S. 1–21. ISSN 0165-9936.
- [288] PURCARO G., TRANCHIDA P. Q., CONTE L., OBIEDZIŃSKA A., DUGO P., DUGO G. und MONDELLO L., Performance evaluation of a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer in the comprehensive two-dimensional gas chromatography analysis of pesticides in water. *Journal of Separation Science*, 2011, Bd. 34, Nr. 18, S. 2411–2417. ISSN 1615-9314.
- [289] SEMPLE J. L., LUGOWSKI S. J., BAINES C. J., SMITH D. C. und MCHUGH A., Breast milk contamination and silicone implants: preliminary results using silicon as a proxy measurement for silicone. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1998, Bd. 102, Nr. 2, S. 528–533. ISSN 0032-1052.
- [290] HIRNER A. V. und FLASSBECK D., Speciation of Silicon. In: R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews und K. Heumann, *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*: John Wiley and Sons Chichester, 2005, S. 366–377. ISBN 9780470856000.
- [291] LUGOWSKI S. J., SMITH D. C., BONEK H., LUGOWSKI J., PETERS W. und SEMPLE J., Analysis of silicon in human tissues with special reference to silicone breast implants. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2000, Bd. 14, Nr. 1, S. 31–42. ISSN 0946-672X.
- [292] COOPER D. K. C., GOLLACKNER B. und SACHS D. H., Will the pig solve the transplantation backlog? *Annual Review of Medicine*, 2002, Bd. 53, Nr. 1, S. 133–147. ISSN 0066-4219.
- [293] BINNS R. M. und HALL J. G., The paucity of lymphocytes in the lymph of unanaesthetised pigs. *British Journal of Experimental Pathology*, 1966, Bd. 47, Nr. 3, S. 275.
- [294] VARAPRATH S., LEHMANN R. G. und KLEIN R. A., Speciation and quantitation of silane/siloxanediols by gas chromatography-mass spectrometry, and stability of

- dimethylsilanediol. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1997, Bd. 5, Nr. 1, S. 17–31. ISSN 1064-7546.
- [295] SCHMITZ S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. ISBN 3827425735.
- [296] Norm DIN 32645, *Nachweis-, Chemische Analytik Bestimmungsgrenze, Erfassungsbegriffe, Wiederholbedingungen*. Berlin: Beuth Verlag, 2008. Oktober 2013.
- [297] BASSETTI E., PEDICONI F., LUCIANI M. L., SANTUCCI E., MIGLIO E. und CANDREVA R., Breast prosthesis: Management of patients after plastic surgery. *Journal of Ultrasound*, 2011, Bd. 14, Nr. 3, S. 113–121. ISSN 1971-3495.
- [298] CREMER E. und PRIOR F., Anwendung der chromatographischen Methode zur Trennung von Gasen und zur Bestimmung von Adsorptionsenergien. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, 1951, Bd. 55, Nr. 1, S. 66–70. ISSN 0005-9021.
- [299] JAMES A. T. und MARTIN A. J. P. Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *The Analyst*, 1952, Bd. 77, Nr. 921, S. 915–932. ISSN 1364-5528.
- [300] ADLARD E. R., 50 years of gas chromatography. *Chromatographia*, 2003, Bd. 57, Nr. 1, S. S13–S18. ISSN 0009-5893.
- [301] SIMMONS M. C. und SNYDER L. R., Two-stage gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1958, Bd. 30, Nr. 1, S. 32–35. ISSN 0003-2700.
- [302] BERTSCH W., Two-Dimensional Gas Chromatography. Concepts, Instrumentation, and Applications–Part 1: Fundamentals, Conventional Two-Dimensional Gas Chromatography, Selected Applications. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1999, Bd. 22, Nr. 12, S. 647–665. ISSN 1521-4168.
- [303] DAVIS J. M. und GIDDINGS J. C., Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms. *Analytical Chemistry*, 1983, Bd. 55, Nr. 3, S. 418–424. ISSN 0003-2700.
- [304] HAYWARD D. G., WONG J. W. und ZHANG K., Multiresidue pesticide analysis in ginseng and spinach by nontargeted and targeted screening procedures. *Journal of AOAC International*, 2011, Bd. 94, Nr. 6, S. 1741–1751. ISSN 1060-3271.
- [305] KOUREMENOS K. A., JOHANSSON M. und MARRIOTT P. J., Advances in gas chromatographic methods for the identification of biomarkers in cancer. *Journal of Cancer*. 2012, Bd. 3, S. 404. ISSN 1837-9664.
- [306] KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA J. und JÓŻWIK J. Current applications of chromatographic methods for diagnosis and identification of potential biomarkers in cancer. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, Bd. 56, S. 1–12. ISSN 0165-9936.
- [307] LAMANI X., HORST S., ZIMMERMANN T. und SCHMIDT T. C., Determination of aromatic amines in human urine using comprehensive multi-dimensional gas chromatography mass spectrometry (GCxGC-qMS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, Bd. 407, Nr. 1, S. 241–252. ISSN 1618-2642.
- [308] ZHANG A., SUN H., WANG P., HAN Y. und WANG X., Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, 2012, Bd. 137, Nr. 2, S. 293–300. ISSN 0003-2654.
- [309] MOHLER R. E., DOMBEK K. M., HOGGARD J. C., PIERCE K. M., YOUNG E. T. und SYNOVEC R. E., Comprehensive analysis of yeast metabolite GC x GC-TOFMS

- data: combining discovery-mode and deconvolution chemometric software. *The Analyst*, 2007, Bd. 132, Nr. 8, S. 756–767. ISSN 0003-2654.
- [310] KEIZERS P. H. J., VREDENBREGT M. J., BAKKER F., DE KASTE D. und VENHUIS B. J., Chemical fingerprinting of silicone-based breast implants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, Bd. 102, S. 340–345. ISSN 0731-7085.
- [311] FORMES A. und Bernd D., Investigation of the silicone structure in breast implants using ^1H NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, Bd. 93, S. 95–101. ISSN 0731-7085.
- [312] WAZIR U., KASEM A. und MOKBEL K., The Clinical Implications of Poly Implant Prothèse Breast Implants: An Overview. *Archives of Plastic Surgery*, 2015, Bd. 42, Nr. 1, S. 4–10. ISSN 2234-6163.
- [313] Norm ISO 14949, *Implants for surgery - Two-part addition-cure silicone elastomers*. Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2001.
- [314] JAMES S. E., TARR G., BUTTERWORTH M. S., MCCARTHY J. und BUTLER P. E., Silicone in the sputum after rupture of a calf implant. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2001, Bd. 94, Nr. 3, S. 133–134. ISSN 0141-0768.
- [315] SMITH A. L., Comments on “Determination of low molecular weight silicones in plasma and blood of women after exposure to silicone breast implants by GC/MS”. *Analytical Chemistry*, 2002, Bd. 74, Nr. 5, S. 1207. ISSN 0003-2700.
- [316] SPIES R. B., ANDRESEN B. D. und RICE JR. D. W., Benzthiazoles in estuarine sediments as indicators of street runoff. *Nature*, 1987, Bd. 327, Nr. 11, S. 697-699. ISSN 0028-0836.
- [317] STREICHER R. P., REH C. M., KEY-SCHWARTZ R. J., SCHLECHT P. C., CASSINELLI M. E. und O’CONNOR P. F., Determination of airborne isocyanate exposure: considerations in method selection. *American Industrial Hygiene Association*, 2000, Bd. 61, Nr. 4, S. 544–556. ISSN 1529-8663.
- [318] SCHAAL S. , KUNSCH K. und KUNSCH S., *Der Mensch in Zahlen: Eine Datensammlung in Tabellen mit über 20000 Einzelwerten*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. ISBN 3642553990.
- [319] BONNET U., Einschätzung des Abhängigkeitsrisikos von Propofol. *Fortschritte Neurologie Psychiatrie*, 2011, Bd. 79, S. 442–452. ISSN 0720-4299.
- [320] THÜRMAN P. A. und SCHMIEDL S., Pharmakotherapie alter Patienten. *Medizinische Klinik-Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2011, Bd. 106, Nr. 1, S. 16–23. ISSN 0723-5003.
- [321] WITTSIEPE J., SCHREY P., LEMM F., EBERWEIN G. und WILHELM M., Polychlorinated dibenzo-p-dioxins/polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and organochlorine pesticides in human blood of pregnant women from Germany. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2008, Bd. 71, Nr. 11-12, S. 703–709. ISSN 1528-7394.
- [322] MCGOLDRICK D. J., DURHAM J., LEKNES H., KIERKEGAARD A., GERHARDS R., POWELL D. E. und MCLACHLAN M. S., Assessing inter-laboratory comparability and limits of determination for the analysis of cyclic volatile methyl siloxanes in whole Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere*, 2011, Bd. 85, Nr. 8, S. 1241–1247. ISSN 0045-6535.

- [323] GENUALDI S., HARNER T., CHENG Y., MACLEOD M., HANSEN K. M., VAN EGMOND R., SHOEIB M. und LEE S. C., Global distribution of linear and cyclic volatile methyl siloxanes in air. *Environmental Science and Technology*, 2011, Bd. 45, Nr. 8, S. 3349–3354. ISSN 0013-936X.
- [324] LAUTAMO R., SCHIRMER R. und JENNINGS W., A brief history of column developments in gas chromatography. *American Laboratory*, 1998, Bd. 30, Nr. 25, S. 28–32. ISSN 0044-7749.
- [325] GRIFFIN S., Fused-Silica Capillary-The Story Behind the Technology. *LC GC EUROPE*, 2003, Bd. 16, Nr. 5, S. 276–289. ISSN 1471-6577.
- [326] VAN TULDER P. J. M., FRANKE J. P. und DE ZEEUW R. A., Evaluation of dead time calculation in liquid chromatography using a linearization procedure for homologous series. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1987, Bd. 10, Nr. 4, S. 191–200. ISSN 1521-4168.
- [327] ETTRE L. S., Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 1993, Bd. 65, Nr. 4, S. 819–872. ISSN 1365-3075.
- [328] JOCHMANN M. A., YUAN X., SCHILLING B. und SCHMIDT T. C., In-tube extraction for enrichment of volatile organic hydrocarbons from aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 2008, Bd. 1179, Nr. 2, S. 96–105. ISSN 0021-9673.
- [329] LAAKS J., JOCHMANN M. A., SCHILLING B. und SCHMIDT T. C. In-tube extraction of volatile organic compounds from aqueous samples: an economical alternative to purge and trap enrichment. *Analytical Chemistry*, 2010, Bd. 82, Nr. 18, S. 7641–7648. ISSN 0003-2700.
- [330] BICCHI C., CORDERO C., LIBERTO E., RUBIOLO P. und SGORBINI B., Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices. *Journal of Chromatography A*, 2004, Bd. 1024, Nr. 1, S. 217–226. ISSN 0021-9673.
- [331] BALTUSSEN E., CRAMERS C. und SANDRA P., Sorptive sample preparation—a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, Bd. 373, Nr. 1-2, S. 3–22. ISSN 1618-2642.
- [332] RASANEN I., VIINAMÄKI J., VUORI E. und OJANPERÄ I., Headspace in-tube extraction gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of hydroxylic methyl-derivatized and volatile organic compounds in blood and urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 2010, Bd. 34, Nr. 3, S. 113–121. ISSN 0146-4760.
- [333] DURHAM J. und KOZERSKI G. E., Soil–water distribution of decamethylcyclopentasiloxane (D5) using a batch equilibrium method. *HES Study*. 2007, Nr. 10352-108.
- [334] MILLER J. und KOZERSKI G. E. Soil–water distribution of octamethylcyclotetrasiloxane (D4) using a batch equilibrium method. *Draft Report. Centre European des Silicones*. 2007.
- [335] WHELAN M. J., VAN EGMOND R., GORE D. und SANDERS D., Dynamic multi-phase partitioning of decamethylcyclopentasiloxane (D5) in river water. *Water research*, 2010, Bd. 44, Nr. 12, S. 3679–3686. ISSN 0043-1354.
- [336] HADA M., TAKINO M., YAMAGAMI T., DAISHIMA S. und YAMAGUCHI K., Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas

- chromatography–mass spectrometry with programmable temperature vaporizer. *Journal of Chromatography A*, 2000, Bd. 874, Nr. 1, S. 81–90. ISSN 0021-9673.
- [337] BENEDIKTSSON K. und PERBECK L. G., Fluid retention in Bioplasty Misti Gold II breast prostheses with development of capsular contracture. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 2000, Bd. 34, Nr. 1, S. 65–70. ISSN 0284-4311.
- [338] STEIN S. E. und SCOTT D. R., Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1994, Bd. 5, Nr. 9, S. 859–866. ISSN 1044-0305.
- [339] OTTO M., *Analytische Chemie*. Weinheim: John Wiley and Sons, 2. Aufl., 2011. ISBN 3527328815.
- [340] HORNING E. C., HORNING M. G., CARROLL D. I., DZIDIC I. und STILLWELL R. N., New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Analytical Chemistry*, 1973, Bd. 45, Nr. 6, S. 936–943. ISSN 0003-2700.
- [341] REVEL'SKII I. A., YASHIN Y., VOZNESENSKII V. N., KUROCHKIN V. K. und KOSTYANOVSKII R. G., Mass spectrometric analysis of gas mixture. *USSR Patent No. 1,159,412*, 1985, Byull. Izobr. No. 47. (1985).
- [342] REVEL'SKII I. A., YASHIN Y., VOZNESENSKII V. N., KUROCHKIN V. K. und KOSTYANOVSKII R. G., Mass spectrometry with photoionization of N-alkanes, alcohols, ketones, esters, and amines at atmospheric pressure. *Russian Chemical Bulletin*, 1986, Bd. 35, Nr. 9, S. 1806–1810. ISSN 1066-5285.
- [343] SYAGE J. A., EVANS M. D. und HANOLD K. A., Photoionization mass spectrometry. *American Laboratory*, 2000, Bd. 32, Nr. 24, S. 24–29. ISSN 0044-7749.
- [344] ROBB D. B., COVEY T. R. und BRUINS A. P., Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2000, Bd. 72, Nr. 15, S. 3653–3659. ISSN 0003-2700.
- [345] REVELSKY I. A., YASHIN Y. S., SOBOLEVSKY T. G., REVELSKY A. I., MILLER B. und ORIEDO V., Electron ionization and atmospheric pressure photochemical ionization in gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acids. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2003, Bd. 9, Nr. 5, S. 497–508. ISSN 1469-0667.
- [346] KERSTEN H., KROLL K., HABERER K., BROCKMANN K. J., BENTER T., PETERSON A. und MAKAROV A., Design Study of an Atmospheric Pressure Photoionization Interface for GC-MS. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* [online], 2016, ISSN 1044-0305. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/article/10.1007/s13361-015-1320-x>
- [347] LI D.-X., GAN L., BRONJA A. und SCHMITZ O. J., Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Analytica Chimica Acta*, 2015, Bd. 891, S. 43–61. ISSN 0003-2670.
- [348] MARCHI I., RUDAZ S. und VEUTHEY J.-L., Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review. *Talanta*, 2009, Bd. 78, Nr. 1, S. 1–18. ISSN 0039-9140.
- [349] GUTMANN V., *Chemische Funktionslehre*. Wien: Springer-Verlag, 1971. ISBN 9783709182734.

- [350] GROSS J. H., *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. ISBN 3827429811.
- [351] ERMAKOV A. I., KIRICHENKO E. A., PIMKIN N. I., CHIZHOV Y. V. und KLEIMENOV V. I., The photoelectron spectra and electronic structure of disiloxanes. *Journal of Structural Chemistry*, 1982, Bd. 23, Nr. 1, S. 62–67. ISSN 0022-4766.
- [352] STARZEWSKI K. A. O., DIECK H. T. und BOCK H. Photoelectron spectra and molecular properties: XXIII. Photoelectron spectra of silicon-substituted ylidic systems. *Journal of Organometallic Chemistry*, 1974, Bd. 65, Nr. 3, S. 311–325. ISSN 0022-328X.
- [353] YOUNG C. L., Critical properties of mixtures containing siloxanes. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 1972, Bd. 68, S. 452–459. ISSN 0300-9238.
- [354] ERMAKOV A. I., KIRICHENKO E. A., PIMKIN N. I., CHIZHOV Y. V. und KLEIMENOV V. I., Photoelectronic spectra and electronic structure of organotri- and organotetrasiloxanes of linear and cyclic structure. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, Bd. 23, Nr. 4, S. 539–545. ISSN 0022-4766.
- [355] KOSSOVSKY N., HEGGERS J. P., PARSONS R. W. und ROBSON M. C., Acceleration of capsule formation around silicone implants by infection in a guinea pig model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1984, Bd. 73, Nr. 1, S. 91–96. ISSN 0032-1052.
- [356] KUBIC V. L. und ANDERS M. W., Metabolism of Dihalomethans to Carbon Monoxide II. In Vitro Studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 1975, Bd. 3, Nr. 2, S. 104–112. ISSN 1521-009X.
- [357] TOFTGÅRD R., NILSEN O. G. und GUSTAFSSON J.-Å., Dose Dependent Induction of Rat Liver Microsomal Cytochrome P-450 and Microsomal Enzymatic Activities after Inhalation of Toluene and Dichloromethane. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 1982, Bd. 51, Nr. 2, S. 108–114. ISSN 1600-0773.
- [358] VOHR H.-W., Organische Halogenverbindungen I. In: H.-W. VOHR, Hrsg. *Toxikologie: Band 2-Toxikologie der Stoffe*. Weinheim: Wiley-VCH, 2010, S. 149–176. ISBN 3527635556.
- [359] BRENNAN R. J. und SCHIESTL R. H., Chloroform and carbon tetrachloride induce intrachromosomal recombination and oxidative free radicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, Bd. 397, Nr. 2, S. 271–278. ISSN 0027-5107.
- [360] KIM H.-H., KIM S.-R., PARK A., HAN T. und CHOI E.-M., The role of glutathione in dichloromethane toxicity to *Lemna paucicostata*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2013, Bd. 5, Nr. 1, S. 1–8. ISSN 2005-9752.
- [361] ROTH L., RUPP G. und WISSFEL M., *Chlorierte Kohlenwasserstoffe*. Landsberg/Lech: Ecomed Sicherheit, 2007. ISBN 60965103001.
- [362] BOUJARD D., ANSELME B., CULLIN C. und RAGUÉNÈS-NICOL C., *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. ISBN 3642417612.
- [363] SHIPP A. M., VAN LANDINGHAM C. V. und MEEKS R. G. Estimation of margins of exposure: A preliminary risk assessment for Octamethylcyclotetrasiloxane (D4)

- based on reproductive toxicity studies in Sprague-Dawley rats. *The Toxicologist*, 2000, Bd. 54, S. 108.
- [364] BIESTERBOS J. W. H., BECKMANN G., VAN WEL L., ANZION R. B. M., VON GOETZ N., DUDZINA T., ROELEVELD N., RAGAS A. M. J., RUSSEL F. G. M. und SCHEEPERS P. T. J., Aggregate dermal exposure to cyclic siloxanes in personal care products: Implications for risk assessment. *Environment International*, 2015, Bd. 74, S. 231–239. ISSN 0160-4120.
- [365] CASKEY C. I., BERG W. A., HAMPER U. M., SHETH S., CHANG B. W. und ANDERSON N. D., Imaging Spectrum of Extracapsular Silicone: Correlation of US, MR Imaging, Mammographic, and Histopathologic Findings 1. *Radiographics*, 1999, Bd. 19, Nr. suppl_1, S. S39–S51. ISSN 0271-5333.
- [366] HÖLMICH L. R., VEJBORG I., CONRAD C., SLETTING S. und MCLAUGHLIN J. K., The diagnosis of breast implant rupture: MRI findings compared with findings at explantation. *European Journal of Radiology*, 2005, Bd. 53, Nr. 2, S. 213–225. ISSN 0720-048X.
- [367] HARYNUK J. und GÓRECKI T., New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2003, Bd. 1019, Nr. 1, S. 53–63. ISSN 0021-9673.
- [368] MARRIOTT P. und SHELLIE R., Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, Bd. 21, Nr. 9, S. 573–583. ISSN 0165-9936.
- [369] SEELEY J. V., KRAMP F. und HICKS C. J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography via differential flow modulation. *Analytical Chemistry*, 2000, Bd. 72, Nr. 18, S. 4346–4352. ISSN 0003-2700.

8 Anhang

Ergänzungen zu Kap. 5.1:

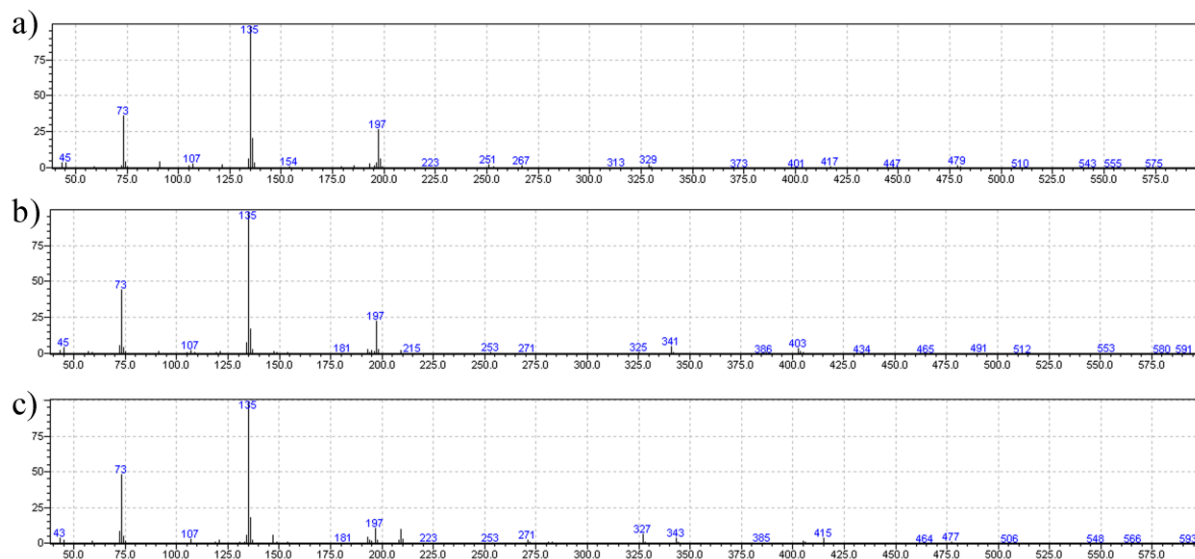


Abbildung 35: Vergleich der EI-Massenspektren (m/z-Bereich: 40-600) der mutmaßlichen phenylsubstituierten Silane. a) Spot-Nr. 25 (1,2-Diphenyltetramethyldisilan; Pentamethyl-Phenyl-Disilan 75 %), b) Spot-Nr. 27 (Pentamethyl-Phenyl-Disilane 73 %), c) Spot-Nr. 28 (Pentamethyl-Phenyl-Disilane 73 %).

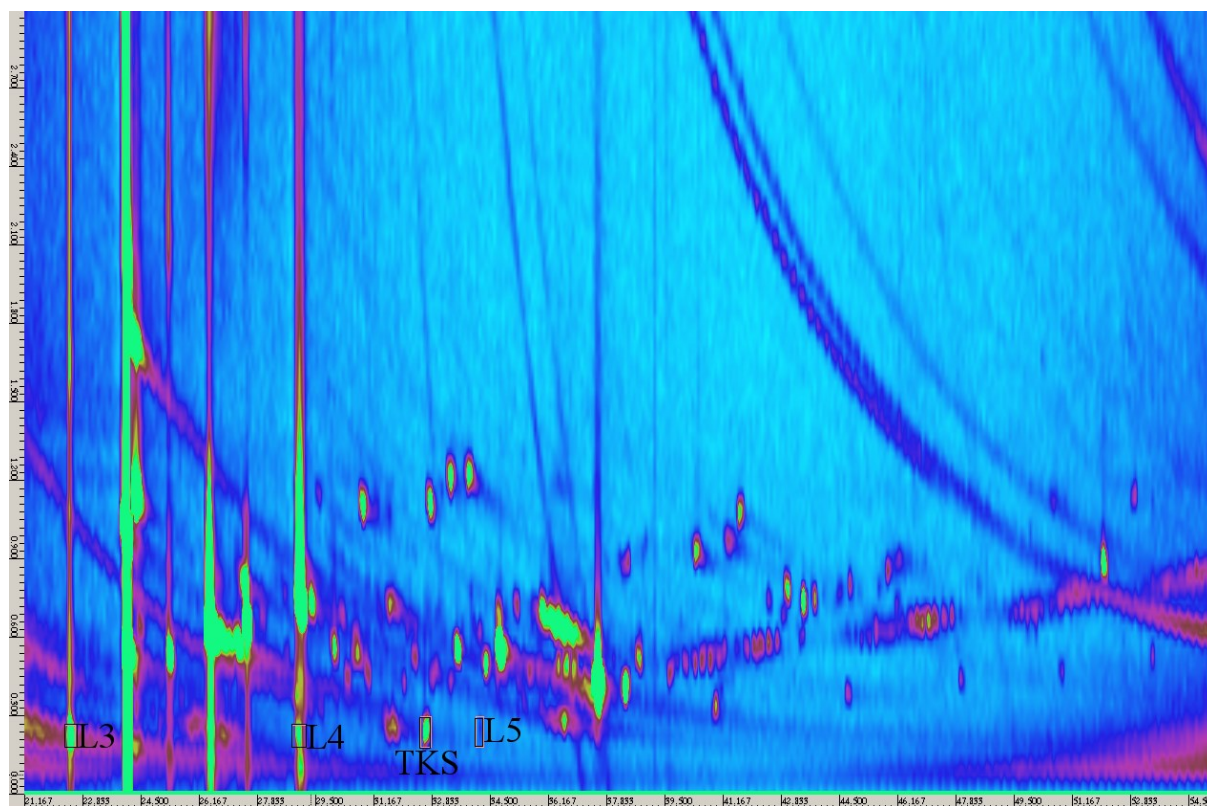
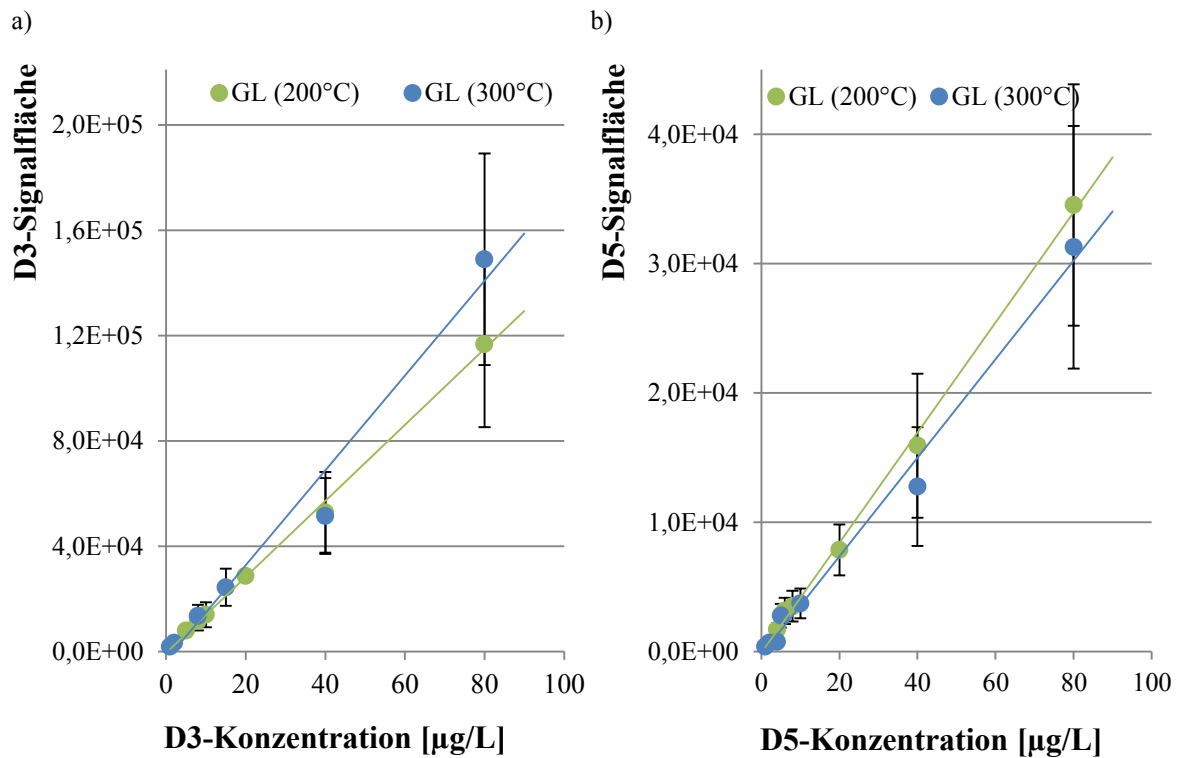


Abbildung 36: GCxGC-MS-Analyse nach BSTFA-Derivatisierung eines Acetonitril-Extraktes einer mit einem Silanol-Gemisch aufgestockten Blutserumprobe, Plasmakonzentration 375 μg Silanole/L (Ausschnitt aus dem Konturplot, Farbskala von ca. 1,0 bis $9,5 \times 10^5$ Counts).

Ergänzungen zu Kap. 5.2:



GL (200 °C): $R^2 = 0,9972$ (RSD 25-34 %)

GL (300 °C): $R^2 = 0,9751$ (RSD 24-31 %)

GL (200 °C): $R^2 = 0,9973$ (RSD 27-35 %)

GL (300 °C): $R^2 = 0,9900$ (RSD 26-36 %)

Abbildung 37: Auftragung der D3 (a)- und D5 (b)-Siloxan-Signalflächen gegen die Konzentration in [$\mu\text{g/L}$] nach GC-MS-Analyse (M1) bei Variation der Injektortemperatur.

Tabelle 18: Nach DIN 32645 ermittelte Bestimmungsgrenzen für D3-D6 in [$\mu\text{g/L}$] Dichlormethan. Mit VB bei ($\alpha = \beta = 0,05$; $n = 2$; $m = 6$) in Abhängigkeit der Injektortemperatur (200 °C, 300 °C).

	D3 [$\mu\text{g/L}$]	D4 [$\mu\text{g/L}$]	D5 [$\mu\text{g/L}$]	D6 [$\mu\text{g/L}$]
GL (200 °C)	$10,9 \pm 3,3$	$19,7 \pm 5,1$	$12,9 \pm 4,0$	$18,5 \pm 1,5$
GL (300 °C)	$9,8 \pm 2,8$	$12,8 \pm 3,5$	$20,9 \pm 6,5$	$4,6 \pm 1,8$

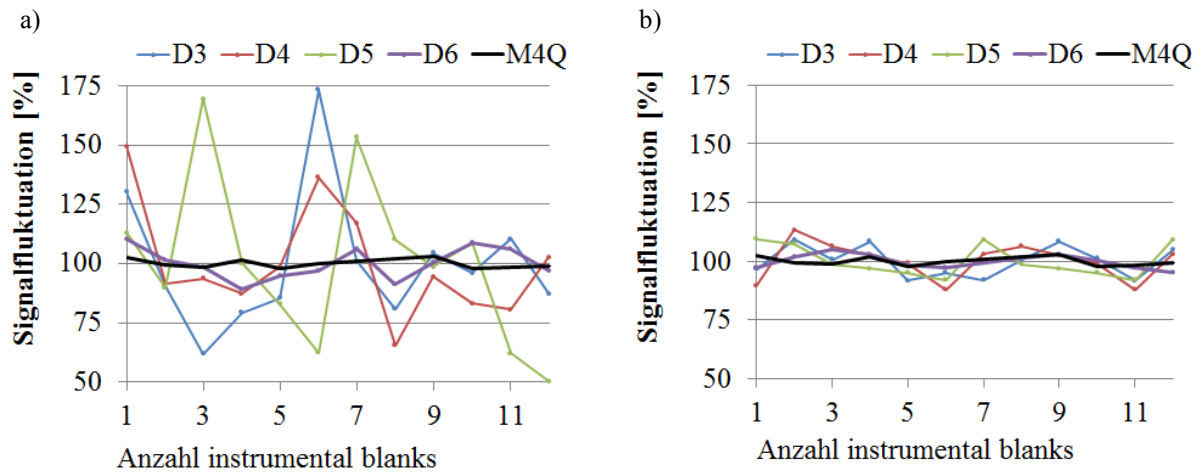


Abbildung 38: Darstellung der Signalfuktuation der zyklischen Siloxane D3-D6 bei einer Standardabweichung des internen Standards (M4Q) von $< 5\%$ im *instrumental blank*. a) an einem Tag, b) an einem Tag bei Verwendung des Argon-Hauses.

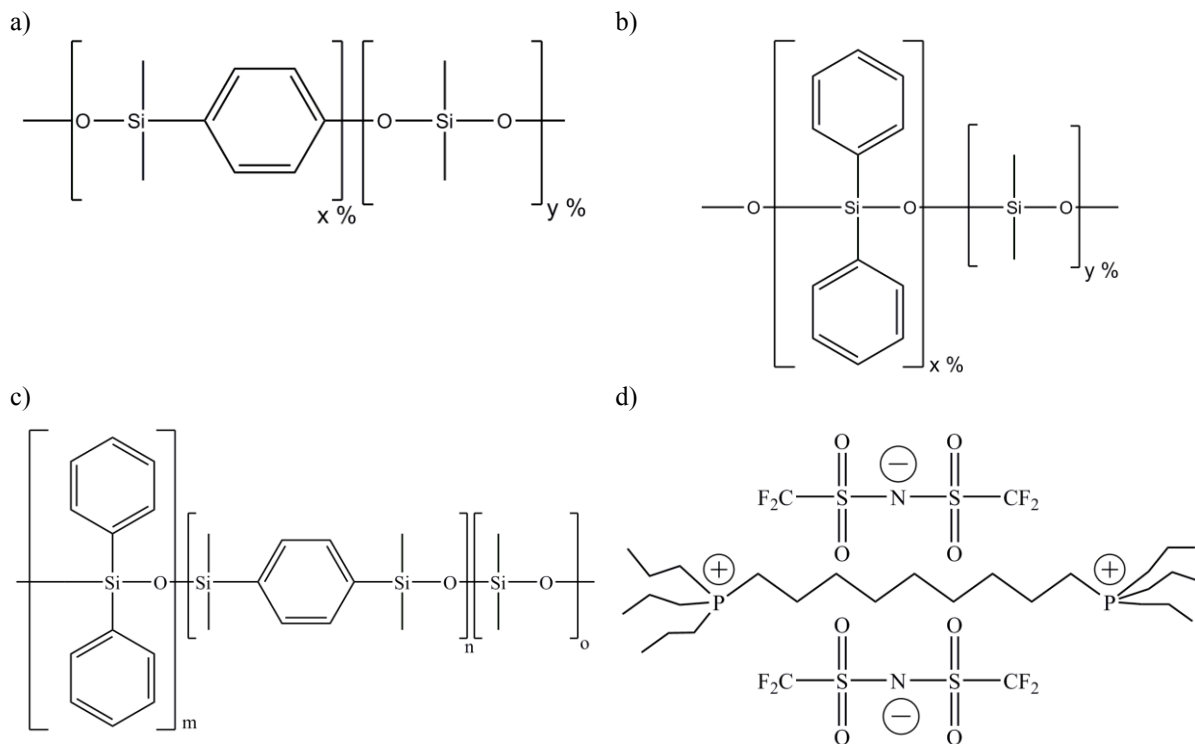


Abbildung 39: Verschiedene Modifizierungen von stationären Phasen a) Di(dimethylsiloxy)phenylene-PDMS, b) Cyanopropylphenylsiloxan-PDMS, c) Diphenyl-polysilphenylene-Siloxan, d) Ionische Flüssigkeit (1,12-(tripropylphosphonium) dodecane-bis(trifluoromethylsulfonyl)imide) [Angabe nach Säulen-Hersteller vgl. Kap. 4.7.1.1].

Tabelle 19: Nach DIN 32645 ermittelte Nachweis (LOD)- und Bestimmungsgrenzen (LOQ) für D3-D6 in [$\mu\text{g/L}$] Dichlormethan. Mit VB bei ($\alpha = \beta = 0,05$; $n = 2$; $m = 8$) für verschiedene Trennsäulen (M1).

		D3	D4	D5	D6
Rxi 5Sil MS (0,25 μm)	LOD [$\mu\text{g/L}$]	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	2,5 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1
	LOQ [$\mu\text{g/L}$]	4,9 \pm 0,3	5,5 \pm 0,4	5,6 \pm 0,4	2,5 \pm 0,1
	<i>Tailing</i> -Faktor (RSD [%])	1,2 (10)	1,0 (2)	0,9 (1)	2,0 (8)
Rxi 5Sil MS (0,10 μm)	LOD [$\mu\text{g/L}$]	2,4 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1
	LOQ [$\mu\text{g/L}$]	6,0 \pm 0,4	6,0 \pm 0,5	4,4 \pm 0,3	1,9 \pm 0,1
	<i>Tailing</i> -Faktor (RSD [%])	1,0 (3)	1,2 (11)	1,1 (19)	2,2 (7)
Optima PXLB	LOD [$\mu\text{g/L}$]	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
	LOQ [$\mu\text{g/L}$]	2,6 \pm 0,2	2,9 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1
	<i>Tailing</i> -Faktor (RSD [%])	2,0 (5)	1,1 (1)	1,2 (3)	1,3 (3)
Rtx 1701	LOD [$\mu\text{g/L}$]	1,9 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
	LOQ [$\mu\text{g/L}$]	5,8 \pm 0,4	2,4 \pm 0,3	2,4 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2
	<i>Tailing</i> -Faktor (RSD [%])	1,1 (10)	1,5 (5)	2,1 (10)	1,1 (4)
SLB-IL60	LOD [$\mu\text{g/L}$]	x	0,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
	LOQ [$\mu\text{g/L}$]	x	1,6 \pm 0,1	4,8 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2
		x	1,5 (14)	1,5 (20)	1,1 (5)

Tabelle 20: Resultierende S/N-Verhältnisse der zyklischen Methylsiloxane bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/L}$ nach erfolgter LVI-GC-MS-Analyse unter Variation der Injektionsgeschwindigkeit und der Inlettemperatur.

Inlet- temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	<i>vent</i> <i>flow</i> [mL/min]	Injektions- geschwindig- keit [$\mu\text{L/s}$]	<i>purge</i> <i>flow</i> nach X min.	D3		D4		D5		D6	
				S/N	SD	S/N	SD	S/N	SD	S/N	SD
-6	470	2,57	0,95	32	1	89	3	83	3	68	5
	600	3,27	0,85	39	5	55	7	49	4	37	2
	750	4,09	0,75	60	5	50	3	62	5	34	3
2	330	2,59	1,1	30	2	113	9	6	0	63	2
	410	3,22	0,85	42	2	147	6	4	0	58	1
	500	3,93	0,8	51	3	150	6	7	0	61	1
10	250	2,77	0,95	6	2	32	3	6	1	48	7
	330	3,65	0,8	23	4	72	14	105	23	65	14
	410	4,54	0,7	34	1	94	6	55	3	55	2

Feste Parameter: Injektionsvolumen: 100 μL ; solvent vent-Modus mit 0 bar bis 0,3 min; *purge flow* 30 mL/min; SD: Standardabweichung des S/N-Verhältnisses

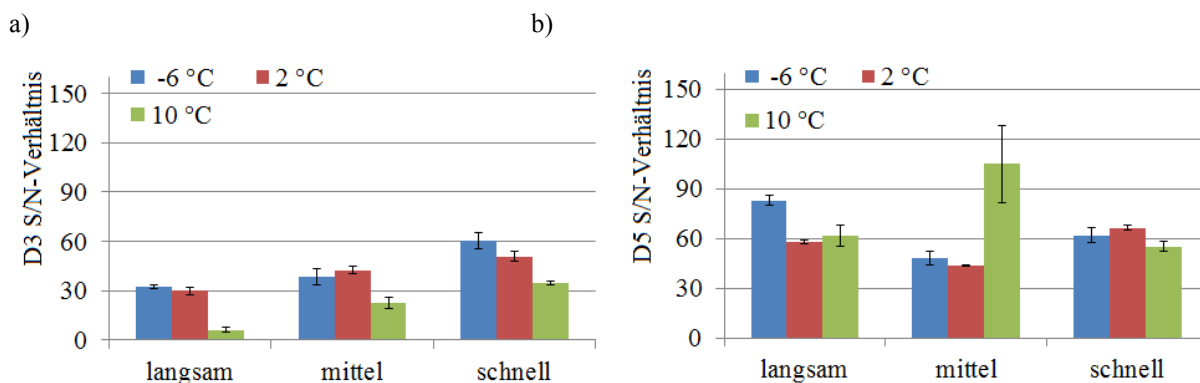


Abbildung 40: Abhängigkeit von der Injektortemperatur und der Injektionsgeschwindigkeit des ermittelten S/N-Verhältnisses eines a) 3 µg D3/L und b) 3 µg D5/L Dichlormethan-Standards nach LVI-GC-MS-Analyse. Geschwindigkeiten von 2,59-2,77 µL/s (langsam), 3,22-3,65 µL/s (mittel) und 3,93-4,54 µL/s (schnell).

Tabelle 21: D3-D6-Wiederfindungsraten im aufgestockten Vollblut in Abhängigkeit von den Lager- und Extraktionsbedingungen. Mit A: Kühlschrank, B: Kühlakku, C: *crushed ice*, D: Tiefkühlschrank und Extraktionsmittel-Vollblut-Verhältnis: 0,4 w/w (1), 0,9 w/w (2).

Variante	Temperatur [°C]	Lagerzeit- raum [h]	Endkon- zentration [ng/g]	Wiederfindungsraten [%]*			
				D3	D4	D5	D6
A1-14h	5	14	83	30 (10)	80 (15)	95 (25)	97 (9)
B1-14h	< 5	14	83	80 (8)	82 (17)	86 (25)	107 (17)
D1-14h	-20	14	83	86 (16)	76 (12)	70 (5)	88 (8)
A2-14h	5	14	53	34 (1)	85 (15)	101 (25)	99 (9)
C2-14h	< 5	14	53	80 (7)	82 (6)	86 (9)	98 (5)
D2-14h	-20	14	53	62 (10)	77 (10)	77 (5)	104 (11)
A1-62h	5	62	83	16 (4)	22 (5)	18 (5)	20 (7)
C2-62h	< 5	62	53	79 (7)	57 (7)	69 (9)	93 (9)

Wiederfindungsrate des internen Standards im Vergleich zu einer am Messtag hergestellten 54 µg M4Q/L-Standardlösung: 95 % (RSD 5 %)

* Die angegebenen VB der Wiederfindungsraten [%] wurden mit P = 95 %, n = 3 berechnet.

Tabelle 22: D3-D6-Wiederfindungsraten in der aufgestockten Vergleichsmatrix bei einer Endkonzentration von 250 ng/g in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung. Mit A: ohne Zugabe und B: mit Zugabe von Wasser vor dem Homogenisieren. Die angegebenen VB der Wiederfindungsraten [%] wurden mit P = 95 %, n = 3 berechnet.

Variante	D3	D4	D5	D6
Extraktion	53 (5)	62 (7)	66 (9)	84 (11)
Homogenisieren A	61 (25)	65 (18)	70 (23)	86 (10)
Homogenisieren B	85 (5)	94 (4)	90 (6)	99 (5)

Ergänzungen zu Kap. 5.3:**Tabelle 23:** D3-D6-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Patienten mit SBI des Herstellers Rofil nach Quantifizierung mittels GC-MS (M1). Mit VB bei P = 95 % und n = 3.

Pat. Nr./Seite	Liegezeit [Jahre]	D3	VB	D4	VB	D5	VB	D6	VB
intakte SBI									
2_r	4	n. n.		n. n.		282	30	301	54
3_l	5	n. n.		n. n.		n. n.		299	16
5_l	8	n. n.		n. n.		n. n.		429	63
5_r	8	n. n.		n. n.		n. n.		406	56
11_l	8	n. n.		n. n.		n. n.		LOQ	
22_l	10	196	122	350	122	778	270	1153	148
22_r	10	n. n.		n. n.		n. n.	33	149	3
	Median (D6)	354	Q0.25	300	Q0.75	423	IQR	124	
bleeding SBI									
1_r	9	n. n.		n. n.		n. n.		382	78
16_l	12	n. n.		33	0,4	615	61	1854	13
16_r	12	n. n.		n. n.		434	32	1115	71
18_l	10	n. n.		n. n.		n. n.		404,8	53
18_r	10	n. n.		38	3,9	260	15	1277	98
2_l	4	n. n.		n. n.		n. n.		21	1,9
20_l	14	n. n.		n. n.		n. n.		1095	7
26_r	14	n. n.		291	53	509	96	986	100
27_l	15	107	34	141	19	258	42	356	5
27_r	15	n. n.		n. n.		LOQ		31	9
3_r	5	n. n.		n. n.		n. n.		649	106
4_l	10	n. n.		n. n.		37	5	98	18
4_r	10	n. n.		14,1	2	56,4	9	137	7
6_l	6	n. n.		n. n.		n. n.		365	5
6_r	6	n. n.		n. n.		n. n.		100	13
8_l	11	n. n.		n. n.		774	24	2004	179
8_r	11	n. n.		n. n.		747	63	1694	112
	Median (D6)	405	Q0.25	137	Q0.75	1115	IQR	978	
	Median (D5)	434		258		615		357	
defekte SBI									
11_r	8	373	129	238	57	668	49	1051	89
20_r	14	n. n.		599	210	954	44	1368	113
26_l	14	477	132	762	108	1010	172	2022	159
	Median (D6)	1368	Q0.25	1209,5	Q0.75	1695	IQR	485,5	
	Median (D5)	954		811		982		171	
	Median (D4)	599		418,5		680,5		262	
	Median (D3)	425		399		451		52	

_r/ _l: rechte/linke Brustseite

N. n.: nicht nachgewiesen mit LOD: D3 15 ± 1 ng/g; D4 9 ± 1 ng/g; D5 14 ± 1 ng/g;LOQ: nachgewiesen, maximaler Wert ist LOQ mit D5 29 ± 2 ng/g; D6 16 ± 1 ng/g;

Tabelle 24: D3-D6-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Patienten mit SBI unbekannter Herstellers nach Quantifizierung mittels GC-MS (M1). Mit VB bei P = 95 % und n = 3.

Pat. Nr./ Seite	Liegezeit [Jahre]	D3	VB	D4	VB	D5	VB	D6	VB
intakte									
7_l	7	n. n.		n. n.		583	20	3816	46
7_r	7	n. n.		n. n.		103	4	420	14
9_l	3	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
13_l	25	252	35	189	57	3707	394	5692	1399
15_l	16	n. n.		n. n.		114	9	250	20
15_r	16	n. n.		n. n.		n. n.		184	13
21_l	4	n. n.		n. n.		n. n.		20	1
24_l	17	n. n.		790	73	31157	11385	81554	27660
24_r	17	n. n.		n. n.		2351	773	2608	996
28_l	2	n. n.		n. n.		115	15	423	14
28_r	2	n. n.		77	18	63	13	92	14
29_r	18	n. n.		10493	1189	17415	1454	9640	482
	Median (D6)	335	Q0.25	201	Q0.75	2967	IQR	2767	
	Median (D5)	349		111		1364		1253	
bleeding									
9_r	3	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
10_l	24	110	30	129	19	326	33	261	16
12_r	17	n. n.		146	46	2420	46	4097	597
12_l	17	n. n.		130		1578	152	2766	232
13_r	25	n. n.		n. n.		861	76	1508	133
17_l	24	9712	3997	33313	4982	45038	7400	16976	3020
	Median (D6)	6414	Q0.25	573	Q0.75	3764	IQR	3192	
	Median (D5)	17985		460		2210		1750	
defekte									
10_r	24	1362	340	3105	176	8420	478	4845	356
13_r	25	632	60	440	150	3138	376	11075	679
19_l	1	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
23_r	unbekannt	n. n.		43	11	170	6	438	35
23_l	unbekannt	n. n.		127	7	457	3	1816	3
35_l	32	541	104	116887	4449	31141	2374	9331	533
35_r	32	n. n.		255412	4165	58299	13223	15840	1077
25_l	38	n. n.		1720	152	5140	68	3499	67
25_r	38	271	39	788	73	2175	20	1373	12
29_l	18	n. n.		2848	208	3438	302	1876	181
	Median (D6)	4845	Q0.25	2423	Q0.75	7960	IQR	5538	
	Median (D5)	3138		1569		5779		4210	
	Median (D4)	440		220		1773		1553	

_r/_l: rechte/linke Brustseite

N. n.: nicht nachgewiesen mit LOD: D3 15 ± 1 ng/g; D4 9 ± 1 ng/g; D5 14 ± 1 ng/g;

D6 6 ± 1 ng/g

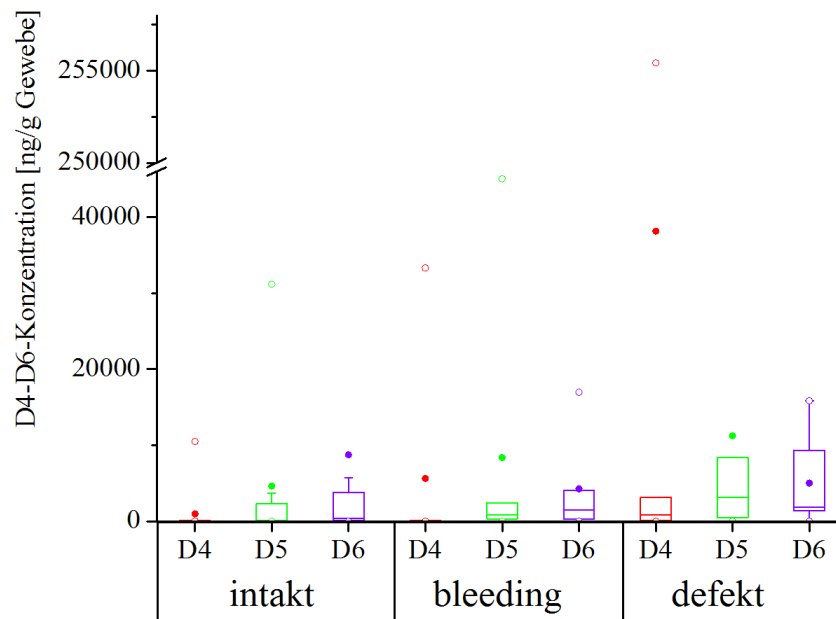


Abbildung 41: Kastengrafik der ermittelten D4-D6-Konzentrationen in [ng/g] in den Kapselgewebeproben von Frauen mit intakten, bleeding und defekten SBI unbekannter oder anderer Hersteller. Mit Mittelwerte (•) und maximaler Konzentration (○), Median und Interquartilsabstand bei 25-75 %.

Tabelle 25: D3-D6-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Patienten mit Bilumen-, Hydrogel- und Bilumen-Hydrogel-Implantaten nach Quantifizierung mittels GC-MS (M1). Mit VB bei P = 95 % und n = 3.

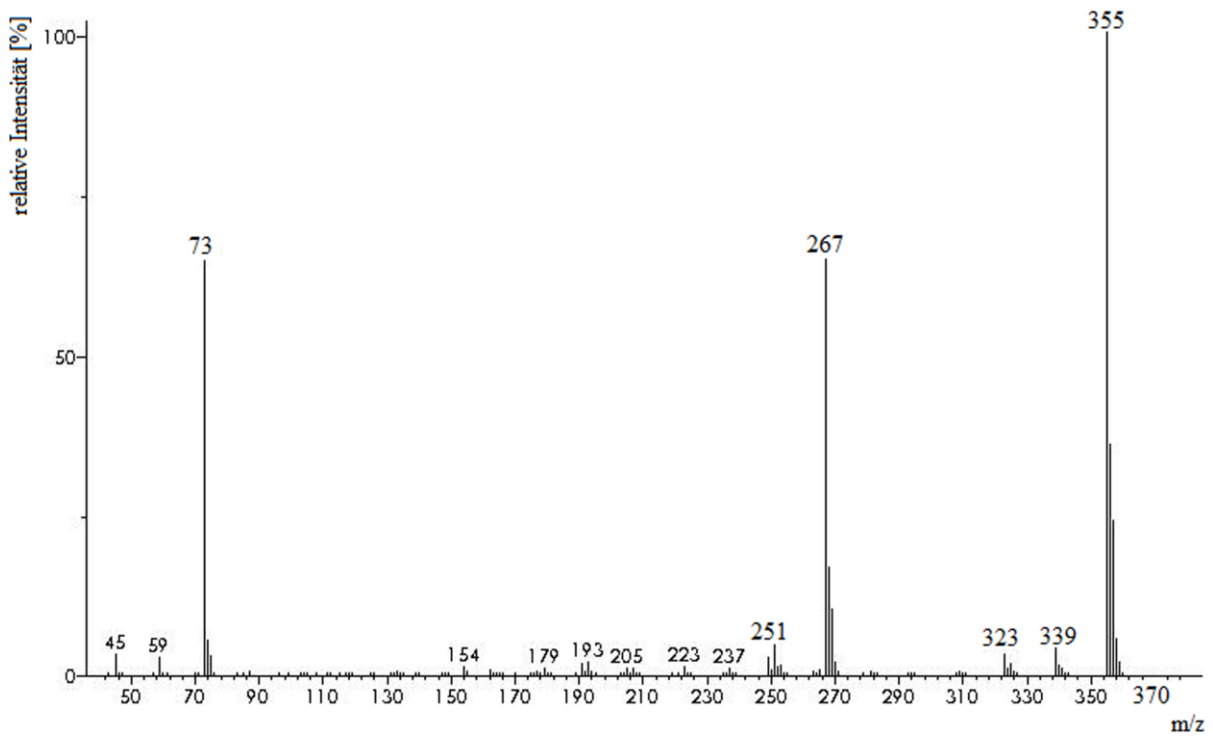
Pat. Nr./Seite	Liegezeit [Jahre]	D3	VB	D4	VB	D5	VB	D6	VB
intakt									
37_r	15	n. n.		n. n.		n. n.		71	16
38_r	18	n. n.		n. n.		501	35	889	82
38_l	18	n. n.		n. n.		196	10	302	45
bleeding									
39_l	20	n. n.		n. n.		136	16	445	27
40_r	4	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
40_l	4	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
defekt									
36_r	13	n. n.		n. n.		n. n.		38	1
37_l	15	n. n.		n. n.		n. n.		73	2

_r/_l: rechte/linke Brustseite

N. n.: nicht nachgewiesen mit LOD: D3 15 ± 1 ng/g; D4 9 ± 1 ng/g; D5 14 ± 1 ng/g;

D6 6 ± 1 ng/g

a)



b)

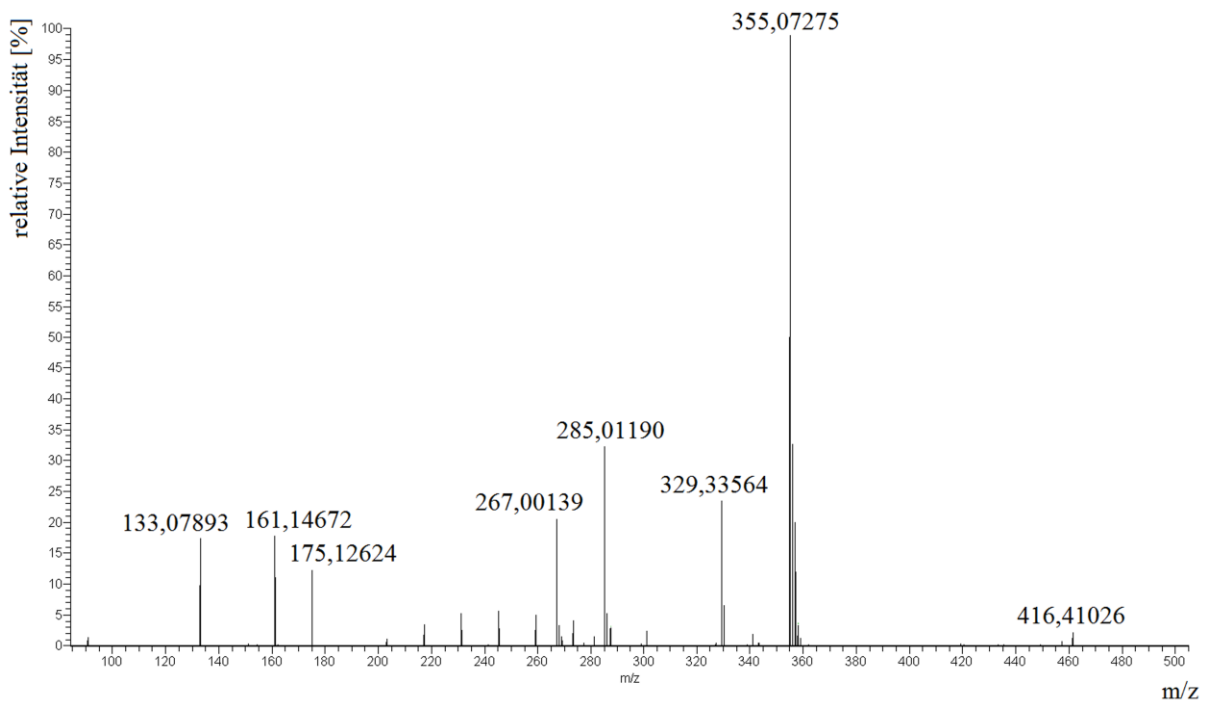


Abbildung 42: Nach GC-MS-Analyse erhaltene D5-Massenspektren bei einer Temperatur der Ionenquelle von 230 °C a) EI-Quadrupol-MS (m/z-Bereich 40-500), b) APPI-Orbitrap-MS (m/z-Bereich 50-500). Nach Subtraktion des Hintergrunds.

Tabelle 26: D5- und D6-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Implantatträgern nach Quantifizierung mittels GC-APPI-MS und GC-EI-MS (M1). Mit VB bei P = 95 % und n = 3.

Pat. Nr./Seite	GC-APPI-MS			GC-EI-MS		
	D5 [ng/g]	VB [ng/g]	VB [%]	D5 [ng/g]	VB [ng/g]	VB [%]
26_l	1205	644	53	1010	172	17
26_r	244	13	6	509	96	19
28_l	85	20	24	115	13	11
28_r	50	25	50	63	13	21
29_l	2849	581	20	3438	302	9
29_r	15111	2816	19	17415	1454	8
	D6 [ng/g]	VB [ng/g]	VB [%]	D6 [ng/g]	VB [ng/g]	VB [%]
26_l	2341	795	34	2022	159	8
26_r	1020	171	17	986	100	10
28_l	400	40	10	423	3	1
28_r	200	46	23	119	15	13
29_l	2807	149	5	2018	335	17
29_r	10091	1029	10	9640	482	5

Tabelle 27: D3-D6-Gehalte [ng/g] in der Waschlösung und in den vorbehandelten und den unbehandelten Kapselgewebeprobe der Implantatträger nach Quantifizierung mittels GC-EI-MS (M1). Unter Angabe der Dauer des Waschvorganges [min]. Die angegebenen VB der Konzentrationen wurden bei P = 95 % und n = 3 berechnet.

Dauer [min]		D3	VB	D4	VB	D5	VB	D6	VB
0,5	Waschlösung	n. n.		n. n.		n. n.		n. n.	
	Gewebe (vorbehandelt)	n. n.		n. n.		n. n.		LOQ	
	Gewebe (direkt)	n. n.		n. n.		n. n.		LOQ	
	Waschlösung	n. n.		n. n.		n. n.		93	8
	Gewebe (vorbehandelt)	96	24	214	30	881	39	1201	106
	Gewebe (direkt)	196	49	350	49	778	150	1153	148
1,0	Waschlösung	n. n.		19	3	67	1	208	6
	Gewebe (vorbehandelt)	n. n.		n. n.		307	41	1029	28
	Gewebe (direkt)	n. n.		127	7	457	3	1816	3
	Waschlösung	n. n.		13	1	27	1	110	1
	Gewebe (vorbehandelt)	n. n.		n. n.		44	6	324	16
	Gewebe (direkt)	n. n.		43	11	170	6	438	35
2,0	Waschlösung	96	10	288	16	784	32	453	7
	Gewebe (vorbehandelt)	146	15	476	38	1341	18	821	13
	Gewebe (direkt)	256	32	732	65	2080	25	1435	17
	Waschlösung	173	15	563	48	431	85	784	52
	Gewebe (vorbehandelt)	247	27	2154	173	3146	254	1476	91
	Gewebe (direkt)	513	43	2741	241	3851	397	1740	157

N. n.: nicht nachgewiesen mit LOD: D3 15 ± 1 ng/g; D4 9 ± 1 ng/g; D5 14 ± 1 ng/g; D6 6 ± 1 ng/g

LOQ: nachgewiesen, maximaler Wert ist LOQ mit D6 16 ± 1 ng/g;

Ergänzungen zu Kap. 5.4:**Tabelle 28:** D4-D6-Gehalte in Vollblut von Frauen mit SBI in [ng/g] (M1).

Pat. Nr.	Liegezeit [Jahre]	Hersteller	operativer Befund	Siloxan-Konzentration im Vollblut [ng/g]
1-3, 5, 6, 8, 16, 18	4-12	Rofil	intakt	D3-D6: n. n.
4	10	Rofil	intakt	D3-D5: n. n.; D6: LOQ
11	8	Rofil	defekt	D3-D5: n. n.; D6: LOQ
7, 9, 12, 14, 15, 17	3-24	unbekannt	intakt	D3-D6: n. n.
10, 13	24-25	unbekannt	defekt	D3-D6: n. n.

N. n.: nicht nachgewiesen mit LOD: D3 $4,1 \pm 0,6$ ng/g; D4 $4,3 \pm 0,3$ ng/g; D5 $7,1 \pm 0,6$ ng/g; D6 $3,1 \pm 0,3$ ng/g
 LOQ: nachgewiesen, maximaler Wert ist LOQ mit D6 $8,0 \pm 0,3$ ng/g

Tabelle 29: D4-D6-Gehalte in Vollblut von Frauen mit SBI in [ng/g] (M2, Verwendung Rxi 5Sil-MS-Trennsäule).

Pat. Nr.	Liegezeit [Jahre]	Hersteller	operativer Befund	D3-D6-Konzentration im Vollblut [ng/g]
19	1	Polytech	defekt	D3, D5: n. n.; D6, D4: LOQ
20; 23	14; 10	Rofil	defekt; intakt	D3-D6: n. n.
21	4	Allergan	intakt	D3-D6: n. n.
23	unbekannt	Polytech	defekt	D3-D6: n. n.

N. n.: nicht nachgewiesen; LOD: $0,12 \pm 0,02$ ng D4/g; $0,13 \pm 0,03$ ng D5/g; $0,04 \pm 0,01$ ng D6/g
 LOQ: nachgewiesen, maximaler Wert ist LOQ mit D5 $0,41 \pm 0,04$ ng/g; D6 $0,14 \pm 0,01$ ng/g

Tabelle 30: D4-D6-Gehalte in Vollblut von Frauen mit SBI und im Vollblut der Kontrollperson (M2, Verwendung Optima PXLB-Trennsäule) in [ng/g] unter Angabe der Lagerdauer der Proben, der SONO-Ergebnisse, der Diagnostik-Einschätzung nach D4 und D6 sowie des operativen SBI-Befundes. Angegebene VB wurden mit $P = 95 \%$, $n = 3$ berechnet.

Pat. Nr.	Lagerdauer [Monate]	SONO	D4	D5	D6	Diagnostik D4 und D6	operativer Befund
Kontrolle							
	0 bzw. 8	x	n. n.	n. n.	n. n.	x	x
8	15	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	intakt
15	12	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	intakt
16	12	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	intakt
17	11	defekt	LOQ	LOQ	LOQ	intakt	intakt
18	11	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	intakt
21	6	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	intakt
22	6	intakt	LOQ	$0,22 \pm 0,09$	LOQ	intakt	intakt
24	6	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	intakt
27	4	intakt	LOQ	n. n.	$0,13 \pm 0,07$	defekt	intakt
28	4	intakt	n. n.	n. n.	n. n.	intakt	intakt
32	1	intakt	n. n.	n. n.	$0,29 \pm 0,07$	intakt	intakt
33	1	intakt	n. n.	n. n.	LOQ	intakt	intakt
34	0	intakt	n. n.	n. n.	LOQ	intakt	intakt
10	14	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	defekt
11	14	intakt	$0,21 \pm 0,03$	n. n.	$0,13 \pm 0,02$	defekt	defekt
13	14	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	defekt
19	8	intakt	$0,22 \pm 0,03$	LOQ	$0,13 \pm 0,01$	defekt	defekt
20	7	intakt	$0,25 \pm 0,04$	LOQ	$0,13 \pm 0,03$	defekt	defekt
23	6	intakt	$0,37 \pm 0,08$	LOQ	$0,13 \pm 0,01$	defekt	defekt
25	6	intakt	$0,19 \pm 0,03$	n. n.	LOQ	intakt	defekt
26	4	intakt	$0,55 \pm 0,12$	n. n.	$0,16 \pm 0,05$	defekt	defekt
29	3	intakt	$0,57 \pm 0,13$	$0,18 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,03$	defekt	defekt
30	2	intakt	LOQ	n. n.	LOQ	intakt	defekt
31	1	defekt	LOQ	n. n.	$0,13 \pm 0,04$	defekt	defekt

N. n.: nicht nachgewiesen bei LOD: D4 $0,05 \pm 0,01$ ng/g; D5 $0,04 \pm 0,01$ ng/g; D6 $0,03 \pm 0,01$ ng/g

LOQ: nachgewiesen, aber nicht quantifizierbar, maximaler Wert ist LOQ

LOQ: D4 $0,18 \pm 0,02$ ng/g; D5 $0,13 \pm 0,01$ ng/g; D6 $0,10 \pm 0,02$ ng/g

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Strukturformel von a) Octamethylcyclotetrasiloxan, b) Tetrakis-(trimethylsiloxy)silan, c) Octa-methyltrisiloxan. _____ 4
- Abbildung 2: Vulkanisierung der Silikonkautschukmasse bei Raumtemperatur und Ausbildung eines Silikon-Elastomer unter Einwirkung eines Zinn-Katalysators und Wasser. _____ 6
- Abbildung 3: Platin-katalysierte Addition eines Vinyl-Siloxans an ein Polyhydromethylsiloxane (Hydrosilylierungsreaktion). _____ 7
- Abbildung 4: Bildgebende Diagnostik eines Patienten mit einem defekten SBI a) Strickleiter-Zeichen im Ultraschallbild, b) Linguini-Zeichen im MRT-Bild (Doppellumen-Implantat). _____ 13
- Abbildung 5: Möglicher Reaktionspfad von Cyclopentasiloxan in Fisher-Ratten. _____ 24
- Abbildung 6: Schematische Darstellung a) eines GCxGC-Systems; b) eines Loop-Modulators. _____ 31
- Abbildung 7: *Extracted ion-Chromatogramme* (EIC) zweier unterschiedlicher Lösungsmittel nach erfolgter GC-MS-Analyse (M1) a) n-Hexan, b) Dichlormethan und Raumluft (Injektionsvolumen 1 μ L; grün) übereinander gelegt. _____ 40
- Abbildung 8: GCxGC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer Silikongelprobe eines explantierten Rofil-SBI (Farbskala von ca. 2,5 bis 7,5 x 10⁵ Counts). _____ 66
- Abbildung 9: GCxGC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer Explantat-Silikongelprobe des Herstellers McGhan (Farbskala von ca. 2,5 bis 7,5 x 10⁵ Counts). _____ 68
- Abbildung 10: Vergleich der EI-Massenspektren (m/z 40-500, jeweils bei t_R (TIC) 30,048 min) zur Identifizierung von D6 in den Extrakten verschiedener SBI-Gelproben nach erfolgter GCxGC-MS-Analyse. a) EI-MS-Spektrum einer Gelprobe des Herstellers Rofil, b) Vorschlag der NIST-Datenbank (Übereinstimmung 87 %), c) EI-MS-Spektrum des D6-Siloxan-Standards. _____ 71
- Abbildung 11: *Suspected-target* GCxGC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer Kapselgewebeprobe eines Implantatträgers (Farbskala von ca. 1,6 bis 6,5 x 10⁵ Counts). _____ 75
- Abbildung 12: *Non-target* GCxGC-MS-Analyse eines Vollblut-Dichlormethan-Extraktes eines Implantatträgers (Farbskala von ca. 1,1 bis 6,5 x 10⁵ Counts). _____ 78

- Abbildung 13: Auftragung der D4 (a)- und D6 (b)-Signalflächen gegen die Konzentration nach GC-MS-Analyse (M1) bei Variation der Injektortemperatur. _____ 83
- Abbildung 14: a) Offenes Argon-Haus während der Injektion (mit nach vorne aufgeklapptem Deckel und einer blauen Gasleitung für die Argon-Zufuhr), b) schematische Darstellung des Argon-Hauses (mit Deckel in grau und Aussparung am Boden für den Aufgabekopf des Injektors; Abmessungen: Höhe H 10 cm x Breite B 8 cm x Tiefe T 8 cm). _____ 85
- Abbildung 15: EIC-Chromatogramme nach GC-MS-Analyse bei Verwendung einer a) unpolaren Trennsäule (Optima PXLB), b) polaren Trennsäule (SLB-IL 60). ____ 89
- Abbildung 16: Schematische Darstellung zweier headspace-Techniken. a) Statische HS-SPME; b) Dynamische HS-ITEX. _____ 90
- Abbildung 17: TIC-Chromatogramme nach GC-ITEX-Ion Trap MS-Analyse zweier Vollblut-Blindproben vor (schwarz) und nach Injektion einer mit 20 µg D3-D6/L aufgestockten Vollblutprobe (rot). _____ 92
- Abbildung 18: Ablauf einer *large volume*-Injektion im solvent-vent-Modus und Verlauf der zu optimierenden PTV-Parameter. _____ 93
- Abbildung 19: Abhängigkeit von der Injektortemperatur und der Injektionsgeschwindigkeit des ermittelten S/N-Verhältnisses eines a) 3 µg D4/L und b) 3 µg D6/L Dichlormethan-Standards nach LVI-GC-MS-Analyse. _____ 94
- Abbildung 20: S/N-Verhältnisse der Methylsiloxane bei 3 µg D3-D6/L in Abhängigkeit von der Dauer des geschlossenen Split-Ventils bei einer Injektortemperatur von 2 °C und einer Injektionsgeschwindigkeit von 3,22 µL/s (vent flow 410 mL/min). _____ 95
- Abbildung 21: D3-D6-Wiederfindungsraten im aufgestockten Vollblut in Abhängigkeit von den Lagerbedingungen nach einer Lagerdauer von a) 14 h, b) 62 h. _____ 98
- Abbildung 22: D3-D6-Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung. _____ 100
- Abbildung 23: EIC-Chromatogramme nach LVI-GC-MS-Analyse eines Dichlormethan-Extraktes einer mit 0,3 ng D4-D6/g aufgestockten Vollblutprobe unter Verwendung zweier unterschiedlicher Trennsäulen a) Rxi 5Sil-MS (0,25 µm), b) Optima PXLB. _____ 103
- Abbildung 24: D3-D6-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeproben von Patienten mit SBI des Herstellers Rofil mit a) bleeding, b) intakten, c) defekten SBI. _____ 106

- Abbildung 25: Kastengrafik der ermittelten D6-Konzentrationen [ng/g] in den Kapselgewebeprobe von Frauen mit Rofil-Implantaten. _____ 107
- Abbildung 26: Auftragung der Konzentrationen [ng/g] von a) D5 und b) D6 in Kapselgewebeprobe von Frauen mit intakten und bleeding SBI des Herstellers Rofil sowie weiterer bzw. unbekannter SBI-Hersteller gegen die Liegezeit der jeweiligen Implantate. _____ 109
- Abbildung 27: Nach GC-MS-Analyse erhaltene D6-Massenspektren bei einer Temperatur der Ionenquelle von 230 °C a) EI-Quadrupol-MS-Spektrum (m/z-Bereich 40-500), b) APPI-Orbitrap-MS-Spektrum (m/z-Bereich 50-500). _____ 114
- Abbildung 28: Vergleich der mittels GC-APPI-Orbitrap-MS (dunkel) und GC-EI-qMS (M1: hell) ermittelten Siloxan-Gehalte [ng/g] in Kapselgewebeprobe von Implantatträgern. Vergleich der a) D5-Konzentrationen, b) D6-Konzentrationen. _____ 116
- Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der Siloxan-Gehalte in der Waschlösung und im vorbehandelten Kapselgewebe bezogen auf das direkt homogenisierte Gewebe (100 %). _____ 118
- Abbildung 30: Epifluoreszenz-Aufnahmen der mit 10 µM CMFD angefärbten U2OS-Zellen (a-d) und des Kapselgewebes (e-h). Bei der Zugabe von Dichlormethan (a), direkt nach Benetzung des Kapselgewebes mit Dichlormethan (e), nach 30 s (b, f), nach 40 s (c); nach 1 min (d, g) und nach 2 min (h). _____ 120
- Abbildung 31: Bestimmung Siloxan-Gehalte im Vollblut der Patienten mit intakten (linke Seite) und defekten SBI (rechte Seite) und der Kontrollperson in [ng/g] bestimmt mittels LVI-GC-MS (M2). _____ 123
- Abbildung 32: Auftragung der D4- und D6-Konzentrationen im Vollblut von Patienten mit defekten SBI in [ng/g] gegen a) die ermittelten D4- und D6-Konzentrationen der entsprechenden Kapselgewebeprobe in [ng/g], b) Lagerdauer der Vollblutprobe in den Monovetten [Monate]. _____ 126
- Abbildung 33: Ultraschallbilder der Brust von Frauen mit SBI. Mit präoperativem SBI-Befund a) intakt, b) defekt, c) intakt: normaler Achsellymphknoten, d) defekt: vergrößerter, abnormaler Achsellymphknoten. SBI-Hülle (gestrichelte Linie), periprotetische Faserkapsel (gepunktete Linie). _____ 129

- Abbildung 34: Vergleich der klinischen Vordiagnostik (SONO, grau) und der entwickelten analytischen Diagnostikmethode (D4 und D6, rot) mit dem intraoperativen SBI-Befund. _____ 130
- Abbildung 35: Vergleich der EI-Massenspektren (m/z -Bereich: 40-600) der mutmaßlichen phenylsubstituierten Silane. a) Spot-Nr. 25 (1,2-Diphenyltetramethyldisilan; Pentamethyl-Phenyl-Disilan 75 %), b) Spot-Nr. 27 (Pentamethyl-Phenyl-Disilane 73 %), c) Spot-Nr. 28 (Pentamethyl-Phenyl-Disilane 73 %). _____ 165
- Abbildung 36: GCxGC-MS-Analyse nach BSTFA-Derivatisierung eines Acetonitril-Extraktes einer mit einem Silanol-Gemisch aufgestockten Blutserumprobe, Plasmakonzentration 375 μg Silanole/L (Ausschnitt aus dem Konturplot, Farbskala von ca. 1,0 bis 9,5 x 10⁵ Counts). _____ 165
- Abbildung 37: Auftragung der D3 (a)- und D5 (b)-Siloxan-Signalflächen gegen die Konzentration in [$\mu\text{g}/\text{L}$] nach GC-MS-Analyse (M1) bei Variation der Injektortemperatur. _____ 166
- Abbildung 38: Darstellung der Signalfuktuation der zyklischen Siloxane D3-D6 bei einer Standardabweichung des internen Standards (M4Q) von < 5% im instrumental blank. a) an einem Tag, b) an einem Tag bei Verwendung des Argon-Hauses. _____ 167
- Abbildung 39: Verschiedene Modifizierungen von stationären Phasen a) Di(dimethylsiloxy)phenylene-PDMS, b) Cyanopropylphenylsiloxan-PDMS, c) Diphenyl-polysilphenylene-Siloxan, d) Ionische Flüssigkeit (1,12-(tripropylphosphonium) dodecane-bis(trifluoromethylsulfonyl)imide). _____ 167
- Abbildung 40: Abhängigkeit von der Injektortemperatur und der Injektionsgeschwindigkeit des ermittelten S/N-Verhältnisses eines a) 3 μg D3/L und b) 3 μg D5/L Dichlormethan-Standards nach LVI-GC-MS-Analyse. _____ 169
- Abbildung 41: Kastengrafik der ermittelten D4-D6-Konzentrationen in [ng/g] in den Kapselgewebeproben von Frauen mit intakten, bleeding und defekten SBI unbekannter oder anderer Hersteller. _____ 172
- Abbildung 42: Nach GC-MS-Analyse erhaltene D5-Massenspektren bei einer Temperatur der Ionenquelle von 230 °C a) EI-Quadrupol-MS (m/z -Bereich 40-500), b) APPI-Orbitrap-MS (m/z -Bereich 50-500). _____ 173

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften von zyklischen Methylsiloxanen.	18
Tabelle 2: GC-MS basierte Methoden zur cVMS-Analytik in Umweltmatrices und biologischen Proben.	28
Tabelle 3: Charakteristika der Implantatträger (Teil 1), deren Vollblut und Kapselgewebe auf ihren Siloxan-Gehalt hin untersucht wurden.	38
Tabelle 4: Charakteristika der Implantatträger (Teil 2) , deren Kapselgewebe auf ihren Siloxan-Gehalt hin untersucht wurden.	39
Tabelle 5: Aufstockexperimente mit Kontrollblut bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen und Mischungsverhältnissen Vollblut-Extraktionsmittel.	44
Tabelle 6: Aufschlussprogramm der SpeedMill zum Homogenisieren der Gewebeproben.	46
Tabelle 7: Übersicht über die angewendeten GC-MS basierten Methoden zur quantitativen und qualitativen Analyse von Vollblut- und Kapselgewebeproben der Implantatträger.	49
Tabelle 8: Spot-Auflistung der in den Gel-Extrakten vorkommenden möglichen homologen Reihen (HR 1-4).	69
Tabelle 9: Auflistung der zusätzlich in den Gel-Extrakten vorkommenden möglichen Substanzen.	73
Tabelle 10: Auflistung der in den Kapselgewebe- und Blutproben von Patienten mit defekten und intakten SBI, sowie in der Blutprobe der Kontrollperson gefundenen möglichen SBI-Additive.	76
Tabelle 11: Auflistung der im Vollblut-Extrakt eines Patienten mit defektem Rofil-SBI vorkommenden möglichen Substanzen.	79
Tabelle 12: Validierungsergebnisse der splitlosen GC-MS-Methode (M1) zur Bestimmung von D3-D6 in Dichlormethan.	86
Tabelle 13: Vergleich unterschiedlicher Trennsäulen.	87
Tabelle 14: Validierungsergebnisse der LVI-GC-MS-Methode (M2) zur Bestimmung von D3-D6 in Dichlormethan unter Verwendung der Rxi 5Sil-MS- und Optima PXLB-Trennsäule.	96
Tabelle 15: Wiederfindung und Nachweis- und Bestimmungsgrenze von D3-D6 in Vollblut für M1.	101
Tabelle 16: Wiederfindung und Nachweis- und Bestimmungsgrenze von D3-D6 in Vollblut für M2 unter Verwendung zweier unterschiedlicher Trennsäulen.	102

Tabelle 17: Vergleich der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in für D5 und D6 $\mu\text{g/L}$ in Dichlormethan in Abhängigkeit von der Temperatur der APPI-Quelle und der verwendeten Trennsäulen.	115
Tabelle 18: Nach DIN 32645 ermittelte Bestimmungsgrenzen für D3-D6 in $[\mu\text{g/L}]$ Dichlormethan.	166
Tabelle 19: Nach DIN 32645 ermittelte Nachweis (LOD)- und Bestimmungsgrenzen (LOQ) für D3-D6 in $[\mu\text{g/L}]$.	168
Tabelle 20: Resultierende S/N-Verhältnisse der zyklischen Methylsiloxane bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/L}$ nach erfolgter LVI-GC-MS-Analyse unter Variation der Injektionsgeschwindigkeit und der Inlettemperatur.	168
Tabelle 21: D3-D6-Wiederfindungsraten im aufgestockten Vollblut in Abhängigkeit von den Lager- und Extraktionsbedingungen.	169
Tabelle 22: D3-D6-Wiederfindungsraten in der aufgestockten Vergleichsmatrix bei einer Endkonzentration von 250 ng/g in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung.	169
Tabelle 23: D3-D6-Gehalte $[\text{ng/g}]$ in Kapselgewebeproben von Patienten mit SBI des Herstellers Rofil nach Quantifizierung mittels GC-MS (M1).	170
Tabelle 24: D3-D6-Gehalte $[\text{ng/g}]$ in Kapselgewebeproben von Patienten mit SBI unbekannter Herstellers nach Quantifizierung mittels GC-MS (M1).	171
Tabelle 25: D3-D6-Gehalte $[\text{ng/g}]$ in Kapselgewebeproben von Patienten mit Bilumen-, Hydrogel- und Bilumen-Hydrogel-Implantaten nach Quantifizierung mittels GC-MS (M1).	174
Tabelle 26: D5- und D6-Gehalte $[\text{ng/g}]$ in Kapselgewebeproben von Implantatträgern nach Quantifizierung mittels GC-APPI-MS und GC-EI-MS (M1).	174
Tabelle 27: D3-D6-Gehalte $[\text{ng/g}]$ in der Waschlösung und in den vorbehandelten und den unbehandelten Kapselgewebeproben der Implantatträger nach Quantifizierung mittels GC-EI-MS (M1).	175
Tabelle 28: D4-D6-Gehalte in Vollblut von Frauen mit SBI in $[\text{ng/g}]$ (M1).	176
Tabelle 29: D4-D6-Gehalte in Vollblut von Frauen mit SBI in $[\text{ng/g}]$ (M2, Verwendung Rxi 5Sil-MS-Trennsäule).	176
Tabelle 30: D4-D6-Gehalte in Vollblut von Frauen mit SBI und im Vollblut der Kontrollperson (M2, Verwendung Optima PXLB-Trennsäule) in $[\text{ng/g}]$.	177

Publikationsliste

Publikationen

- ROSENDAHL P., HIPPLER J., SCHMITZ O. J., HOFFMANN O., RUSCH P. *Cyclic volatile methylsiloxanes in human blood as marker for ruptured silicone gel-filled breast implants*. Akzeptiert bei *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, doi: 10.1007/s00216-016-9401-7.
- SCHREIBER U., MAYER C., SCHMITZ O. J., ROSENDAHL P., BRONJA A., GREULE M., KEPPLER F., MULDER I., SATTLER T., SCHÖLER H., *Organic compounds in Archean quartz record prebiotic chemistry on early Earth*. In Bearbeitung

Poster

- ROSENDAHL P., HIPPLER J., RUSCH P., SCHMITZ O. J. , *Analysis of cyclic siloxanes in capsular tissue and blood samples of women with silicone breast implants*, 04/2015.
- ROSENDAHL P., STEINHÄUSER A., SCHMITZ O. J., *Development of a multi-dimensional GC-technique (GC+GC) - Preliminary studies for coupling to IM-qTOFMS*, 05/2015.

Vorträge

- 25. Doktorandenseminar des AK Separation Science der GdCh-Fachgruppe Analytische Chemie, *Spezies analytische Untersuchungen zur Sicherheit von Silikon-Brustimplantaten*, Hohenroda, 01/2015.
- GdCh-Neujahrskolloquium der Fakultät Chemie, *Ursuppe in Konserven - Analyse von Flüssigkeitseinschlüssen in Quarzen*, Universität Duisburg-Essen, 01/2015.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.