

Asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkellichtstreudetektion – Eine neue bedeutende Methode der Pharmazeutischen Analytik zur Charakterisierung von Makromolekülen und Nanopartikeln

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Christian Augsten geboren am 04. August 1977 in Merseburg (Saale)

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten Mäder
- 2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Jörg Kreßler
- 3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Winter

Halle (Saale), den 22. Februar 2008

Verteidigungsdatum: 20.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013808 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013808]

Den Wind vermagst Du nicht zu lenken, Deine Segel wohl.

(Leonard Simon Nemoy)

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzun	gs- und Symbolverzeichnis	VI
1	Einleitung	und Aufgabenstellung	1
2	Theoretisc	her Teil	4
	2.1 As	symmetrische Fluß-FFF und MALS/RI-Detektion	4
	2.1.1	Die FFF-Familie	4
	2.1.2	Geräteaufbau und Prinzip der aF-FFF	5
	2.1.3	Molmassen- und Radienbestimmung mit Hilfe von MALS	9
	2.1.4	Anwendungen der aF-FFF/MALS	13
	2.2 Ve	erwendete Licht- und Röntgenstreuverfahren	15
	2.2.1	Raman-Spektroskopie	15
	2.2.2	Photonenkorrelationsspektroskopie	16
	2.2.3	Röntgenkleinwinkelstreuung	17
3	Charakter	isierung der Partikelgröße bioabbaubarer Nanosphären	
	3.1 Ein	nleitung	
	3.2 Ma	aterialien und Methoden	20
	3.2.1 Herstellung der Nanosuspensionen		20
	3.2.2	TEM von Gefrierbruchnachbildungen	21
	3.2.3	Bestimmung der Viskosität sowie Größe anhand PCS	21
	3.2.4	Charakterisierung mittels SAXS	21
	3.2.5	Charakterisierung mittels aF-FFF/MALS	22
	3.3 Er	gebnisse und Diskussion	23
	3.3.1	TEM von Gefrierbruchnachbildungen	23
	3.3.2	Bestimmung der Viskosität sowie Größe anhand PCS	23
	3.3.3	Charakterisierung mittels SAXS im Vergleich zu PCS	25
	3.3.4	Charakterisierung mittels aF-FFF/MALS im Vergleich zu PCS	27
	3.4 Zu	sammenfassung	
4	Charakter	isierung unterschiedlicher Typen von κ-Carrageenan	
	4.1 Ei	nleitung	
	4.2 Ma	aterialien und Methoden	
	4.3 Er	gebnisse und Diskussion	
	4.3.1	Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR	
	4.3.2	Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI	37
	4.4 Zu	sammenfassung	41
5	Charakter	isierung unterschiedlicher Typen und Komplexe von HES	
	5.1 Ein	nleitung	

	5.2 Materialien und Methoden5.3 Ergebnisse und Diskussion		
	5.3.1 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR		46
	5.3	.2 Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI	48
	5.4	Zusammenfassung	
6	Charal	xterisierung von wäßrigen Lösungen amphiphiler Triblock-Copolyme	ere 53
	6.1	Einleitung	
	6.2	Materialien und Methoden	
	6.3	Ergebnisse und Diskussion	
	6.4	Zusammenfassung	
7	Charal	tterisierung von Chitosanen unterschiedlicher Typen und Chargen	59
	7.1	Einleitung	
	7.1	.1 Chitosan	59
	7.1	.2 Besonderheiten der Molmassencharakterisierung von Chitosan	61
	7.2	Materialien und Methoden	
	7.3	Resultate und Diskussion	
	7.3	.1 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR	63
	7.3	.2 Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI	67
	7.4	Zusammenfassung	72
8	Charal	tterisierung von β ⁻ -bestrahlten Scleroglucanen und Levanen	73
	8.1	Einleitung	73
	8.1	.1 Scleroglucan	74
	8.1	.2 Levan	76
	8.2	Materialien und Methoden	77
	8.2	.1 Materialien	77
	8.2	.2 Durchführung der β ⁻ -Bestrahlung	78
	8.2	.3 Radikaldetektion mittels ESR	78
	8.2	.4 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR	78
	8.2	.5 Charakterisierung mittels Raman-Spektroskopie	79
	8.2	.6 Herstellung von wäßrigen Lösungen der Polysaccharide	
	8.2	7 Viskosimetrie	
	8.2	.8 Molmassencharakterisierung mittels GPC- und aF-FFF/MALS/KI	80
	ð.3		
	8.3	 Radikaldetektion mittels ESK. Chamiasha Charakteriaiamura mittala 111 und 120 ND/D 	
	8.3 0 2	Cherakterisierung mittels Paman Snektroskonia	83
	۵.۵ ۵.2	A Charakterisjerung der Seleroglucane binsichtlich Viskosität und Molmosse	
	8.3 8.3	.5 Molmassencharakterisierung der Levane mittels aF-FFF/MALS/RI	
	0.0		

	8.4 Z	usammenfassung	
9	Zusamme	enfassung und Ausblick	
10	Literatur		
	10.1	Alphabetischer Index verwendeter Literaturquellen	
	10.2	Eigene Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	
	10.2.1	Reporte und Artikel	
	10.2.2	Poster und Vorträge	

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

aF-FFF=AF4	Asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung
BP	Britische Pharmakopöe
BSA	Bovines Serumalbumin
DA	3,6-Anhydro-D-galaktose
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FFF	Feld-Fluß Fraktionierung
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
G4S	D-Galaktose-4-sulfat
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPC	Gelpermeationschromatographie
HES	Hydroxyethylstärke
MALS	Mehrwinkellichtstreuung
MHKS	Mark-Houwink-Kuhn-Sekurada
NIR	Nahes Infrarot
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEO = PEG	Polyethylenoxid
PGMA	Polymer aus Glycerolmonomethacrylat (= 2,3-Dihydroxypropylmethacrylat)
Ph. Eur.	Europäische Pharmakopöe
PLGA	Poly(D,L-Laktid-co-Glykolid)
PPO	Polypropylenoxid
RI	Brechungsindex
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TG	Thermogravimetrie
USP	Pharmakopöe der Vereinigten Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
β ⁻ -Strahlung	Korpuskularstrahlung auf Basis von beschleunigten Elektronen
γ-Strahlung	Wellenstrahlung auf Basis von Gammaphotonen

Symbole

A_2	Zweiter Virialkoeffizient
В	Magnetische Flußdichte [T =Tesla]
c	Konzentration [g/ml]
D	Diffusionskoeffizient [m ² s ⁻¹]
D _{deac}	Deacetylierungsgrad [%]
d_{geom}	Geometrischer Durchmesser [nm]
d_{H}	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]
D _m	Fraktale Dimension des Massenfraktals
dn/dc	Brechungsindexinkrement [ml/g]
d_{NE}	Netzebenenabstand [nm]
DS	Substitutionsgrad
ED	Energiedosis $[Gy = J/kg]$
f	Reibungskoeffizient des Analyten
F	Kraft [N]
F _A	Molarer Anteil der restlichen GlcNAc-Einheiten bei Chitosan
G _(S)	Anzahl der Hauptkettenspaltungen [(100eV) ⁻¹]
G _(X)	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹]
G _(X) HWD _{Mw}	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen $[(100 \text{eV})^{-1}]$ Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy]
G _(X) HWD _{Mw} k	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen $[(100 \text{eV})^{-1}]$ Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504 $\cdot 10^{-23}$ J/K = 8.617343 $\cdot 10^{-5}$ eV/K)
G _(X) HWD _{Mw} k HK	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen $[(100 \text{eV})^{-1}]$ Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504 $\cdot 10^{-23}$ J/K = 8.617343 $\cdot 10^{-5}$ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s]
G _(X) HWD _{Mw} k HK I ₀	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen $[(100eV)^{-1}]$ Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504 $\cdot 10^{-23}$ J/K = 8.617343 $\cdot 10^{-5}$ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes
$\begin{array}{l} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen $[(100eV)^{-1}]$ Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504 \cdot 10 ⁻²³ J/K = 8.617343 \cdot 10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes
$\begin{array}{l} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \\ I_{\theta}^{LM} \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels
$\begin{array}{l} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{SR} \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen $[(100eV)^{-1}]$ Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR)
$\begin{array}{c} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{B} \\ I'_{ESR} \\ M \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da]
$\begin{array}{c} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{B} \\ M \\ M_N \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da] Anzahlgemittelte Molmasse [g/mol od. Da]
$\begin{array}{c} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ M \\ M_N \\ M_V \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Primärlichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da] Anzahlgemittelte Molmasse [g/mol od. Da]
$\begin{array}{c} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ I_{\theta} \\ M_N \\ M_N \\ M_V \\ M_W \end{array}$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da] Anzahlgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Viskositätsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da]
$\begin{array}{c} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da] Anzahlgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Viskositätsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Gewichtsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da]
$\begin{array}{c} G_{(X)} \\ HWD_{Mw} \\ k \\ HK \\ I_0 \\$	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da] Anzahlgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Viskositätsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Gewichtsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Molare Substitution
$G_{(X)}$ HWD _{Mw} k HK I_0	Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen [(100eV) ⁻¹] Halbwertsdosis, auf M _W bezogen [Gy] Boltzmann-Konstante (1.3806504·10 ⁻²³ J/K = 8.617343·10 ⁻⁵ eV/K) Hagenbach-Korrekturfaktor [s] Intensität des Primärlichtes Intensität des Streulichtes Streuintensität des Lösungsmittels Erste Ableitung der Intensität (ESR) Molmasse [g/mol od. Da] Anzahlgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Viskositätsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Gewichtsgemittelte Molmasse [g/mol od. Da] Molare Substitution Mittelwert Beugungsordnung

N _A	Avogadro-Zahl $(6.02214 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1})$
PDI	Polydispersität, Relation M _W /M _N
PI	Polydispersitätsindex, bestimmt anhand PCS
PS	Substitutionsmuster, für HES Verhältnis von C2 zu C6
q	Streuvektor [1/nm]
R_{θ}	Rayleigh-Ratio
$\langle r_g{}^2\rangle^{1/2}$ oder r_g	Streumassen- bzw. Gyrationsradius [nm]
r _{SD}	Abstand zwischen Streuvolumen und Photodiode
R ²	Bestimmtheitsmaß
RP	Retentionsparameter
RV	Retentionsverhältnis
SD	Standardabweichung der Stichprobe
t_0	Totzeit [s]
t _r	Retentionszeit [s]
Т	Temperatur [K]
Vc	Querflußvolumenstrom durch die Membran [ml/min]
V_0	Totvolumen des Kanals [ml]
Vs	Streuvolumen [µl]
W	Kanalhöhe [µm]
WR	Gesamtwiederfindungsrate RI [%]
α	MHKS-Exponent
β	Flory-Exponent
γ	Bragg-Winkel [°] (Streuwinkel = 2γ)
Γ	Halbwertsbreite des Frequenzpeaks [s ⁻¹]
η	Dynamische Viskosität [cP = mPa·s]
[η]	Intrinsische Viskosität [ml/g]
θ	Detektorwinkel [°]
λ	Wellenlänge [nm]
λ_0	Wellenlänge des Lasers [nm]
ν_0	Frequenz der Anregungsstrahlung [Hz]
v _{vib}	Frequenz der Eigenschwingung des Moleküls [Hz]
ρ	Massendichte [g/cm ³]
τ	Korrelator-Verzögerungszeit [s]

Weitere Abkürzungen und Symbole, die nur an jeweils einer Stelle erläutert bzw. verwendet werden, sowie Substanzkürzel finden sich nur im folgenden Text.

1 <u>Einleitung und Aufgabenstellung</u>

Nanotechnologie,

die Herstellung und Verarbeitung von Strukturen und Teilchen im Nanometerbereich (→Nano…). Die Nanotechnologie erlaubt die Manipulation von Materie im atomaren Maßstab. Ziel sind präzise Strukturierungen zur Herstellung extrem kleiner Bauelemente oder Strukturen nach vorgegebenen Eigenschaften.

(Brockhaus, 2005)

Der Begriff der Nanotechnologie leitet sich vom griechischen Wort für Zwerg "nanos" ab. Hiermit wird meist der kolloidale Größenbereich zwischen etwa 10 und 1000nm beschrieben (Allemann et al., 1993). Neben dem Einfluß des atomaren Aufbaus bestimmt aber auch die Strukturgröße von Materialien deren Eigenschaften. Somit führen größeninduzierte Phänomene gerade im nanoskaligen Bereich zu einem teils komplett veränderten chemischen oder physikalischen Verhalten.

Bedingt durch ihre Größe sind nanopartikuläre Arzneiformen in der pharmazeutischen Forschung von besonderem Interesse. Die alleinige Verringerung der Größe führt z.B. zu einer enormen Zunahme der Oberfläche. Dies kann die Reaktivität beeinflussen, aber auch die Lösungsgeschwindigkeit von schlecht löslichen Substanzen erhöhen oder die Benetzung verändern. Damit eröffnet sich ein weites Spektrum neuer Anwendungsmöglichkeiten. Weiterhin können durch eine Größenverringerung schlecht lösliche Substanzen in kolloidale Suspensionen überführt werden, was damit z.B. eine parenterale oder gar intravenöse Applikation erst ermöglich (Müller und Hildebrand, 1998). Nutzbare nanoskalige Systeme sind unter anderem Micellen, Liposomen und Polymernanopartikel als Sphäre oder Kapsel (Müller und Hildebrand, 1998).

Nanoskalige Arzneiformen sind weiterhin in der Lage, die Wirksamkeit von Arzneistoffen zu erhöhen oder deren Toxizität zu senken. So konnten bereits etablierte Substanzen hinsichtlich ihres Wirkprofils verbessert werden. Ein Beispiel hierfür ist Amphothericin B, welches als liposomale Formulierung z.B. in Ambisome[®] ein anderes pharmakokinetisches Verhalten und damit eine niedrigere Häufigkeit von Nebenwirkungen aufweist (Bekersky et al., 2001).

Nanopartikel können viele Körperbarrieren relativ einfach überwinden. Sie können künftig dazu beitragen, Arzneistoffe zielgerichtet lokal anfluten zu lassen, was mit "drug targeting" bzw. "drug delivery" umschrieben wird (Fattal und Vauthier, 2002). Speziell schlecht zugängliche Organe wie Knochen, Lunge und Gehirn sind ein wichtiges zukünftiges,

wenn auch anspruchsvolles, Ziel. So sind speziell Krebsleiden dieser Organe bislang nur mit relativ geringem Erfolg therapierbar (Beers und Berkow, 2000). Die Krebstherapie könnte somit von diesen neuen Systemen profitieren (Kreuter, 1992). Auch an nanopartikulären DNA-Vektoren wird intensiv geforscht (Kumar et al., 2004). Dies geschieht mit dem Ziel der Übertragung von DNA ohne die Gefahr von Mutationen, wie sie Viren als Träger hervorrufen können.

Zusätzlich ergibt sich auch die Möglichkeit des Einsatzes am Auge (Kreuter, 1992) oder die Verwendung als Trägermaterial bei subkutanen oder intramuskulären Applikationen (Fattal und Vauthier, 2002). Weiterhin können oral angewendete Nanopartikel lokal im Darm zu einer Arzneistoffanreicherung beitragen (Lamprecht et al., 2001). Es verdichten sich auch Anzeichen einer möglichen kompletten Aufnahme aus dem Darm ins Blut (Delie, 1998; Florence, 1997), wobei scheinbar ein Größenoptimum existiert (Florence und Hussain, 2001).

Aber auch größere Makromoleküle können dem kolloiddispersen Bereich zugeordnet werden. Hierzu gehören z.B. eine Vielzahl von Proteinen, Antikörpern sowie Polysacchariden. In der Vergangenheit wurden so bereits die Eigenschaften vieler nanoskaliger Systeme genutzt, ein Beispiel wären Vakzine. Nicht alles ist demnach neu, sondern wird erst heute bewußt in den nanoskaligen Bereich klassifiziert. Zusätzlich ergeben sich umfangreiche neue Anwendungen in der Nanobiotechnologie als Brücke zwischen der belebten und unbelebten Natur (http://www.bmbf.de/de/1155.php).

Bei aller Euphorie bezüglich der Nano(bio)technologie sollte aber auch erwähnt werden, daß gerade im pharmazeutischen Bereich die realen Marktentwicklungen mit den im vorigen Jahrzehnt vorhergesagten Werten bei weitem nicht schritthalten (Cremer, 2005). Hierfür gibt es viele Gründe. So sind als Zielorgan systemisch zirkulierender Partikel bislang hauptsächlich nur Leber, Milz und Lunge verfügbar. Diese Organe fangen aber beinahe jegliche körperfremde Nanopartikel ab. Auch die orale Applikation von Proteinen, die ein großes Marktpotential aufwiese, blieb trotz zahlreicher positiver Studien (Fattal und Vauthier, 2002) in der Praxis bislang Wunschdenken. Aber auch die teils unvorhersehbaren Eigenschaften und damit das größere Gefahrenbewußtsein haben zu einem vorsichtigeren Umgang beigetragen.

Das Gefahrenpotential von Nanopartikeln ergibt sich gerade aus der raschen Überwindung vieler Körperbarrieren (Hintergrundpapier Umweltbundesamt 08/2006: "Nanotechnik: Chancen und Risiken für Mensch und Umwelt). Dies läßt sich an nicht pharmazeutisch genutzten Systemen gut verdeutlichen. Es wird befürchtet, daß Nanoteilchen sich im Körper unkontrolliert ablagern können und zu Konflikten mit dem Immunsystem

2

führen (Hartmann, 2006). Nachgewiesen ist dies z.B. für lungengängige Nanopartikel unter 10µm (PM 10, Environmental Protection Agency) bzw. für den alveolengängigen Teil unter 2.5µm (PM 2.5). Nebenwirkungen dieses Feinstaubs der Umwelt sind z.B. Bronchitiden, kardiovaskuläre Effekte und Lungenkrebs (Zylka-Menhorn, 2005; Mutlu et al., 2007).

Bei allen nanoskaligen Arzneiformen sind die Partikelgröße und Größenverteilung Schlüsselparameter für die Eigenschaften und Ungefährlichkeit, insbesondere bei intravenösen Systemen, wie z.B. parenteralen Fettemulsionen. Weiterhin können beide Parameter die Blutzirkulation maßgeblich beeinflussen. Hier sind insbesondere der Siebeffekt für Partikel über etwa 7µm in der Lunge und die größenabhängige Opsonierung von vasal applizierten Partikeln durch das retikuloendotheliale System zu nennen (Couvreur et al., 1995). Dies führt zu einer Anreicherung hauptsächlich in Leber, Milz, Lunge und Knochenmark.

Die Größe als Schlüsselparameter ist aber keinesfalls so einfach zu bestimmen wie von Systemen im grobdispersen Bereich. Die hohe Wellenlänge des sichtbaren Lichtes, die Spezies, verschiedener Größenverteilungen, Existenz anisotroper Partikelformen, Kalkulationsmethoden oder unbekannte optische Eigenschaften machen eine eindeutige Bestimmung schwierig (Müller und Schumann, 1996). Hierbei ist es auch wichtig zu beachten, daß primär meist nur bestimmte physikalische Phänomene - und nicht Partikelgrößen - bestimmt werden. Bedingt durch die kurzen Diffusionswege ist bei nanoskaligen Systemen weiterhin von erheblicher Dynamik auszugehen. Partikelgrößen können so unter anderem durch eine Verdünnung rasch beeinflußt werden, wie am Beispiel von Chitosannanopartikeln deutlich wird (Motwani et al., 2006). Insgesamt ergibt sich hieraus die generelle Notwendigkeit der verbesserten und vereinfachten Größenanalyse im nanoskaligen Bereich.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung als Methode der pharmazeutischen Analytik in verschiedenen Problembereichen der Größencharakterisierung etabliert werden. Obwohl bislang nur wenig genutzt, ist die Technik dank heutiger Kombination mit Mehrwinkellichtstreudetektion von zunehmender Bedeutung in der Charakterisierung wäßriger nanoskaliger Dispersionen. Die Größenbestimmung erfolgt auch im Vergleich zu weiteren bislang etablierten Analysenmethoden, die auf unterschiedlichen Eigenschaften der Partikel basieren. Hierzu gehören unter anderem die Elektronenmikroskopie, verschiedene Lichtstreumethoden, Röntgenstreuung oder im Bereich von Makromolekülen auch die Gelpermeationschromatographie und Viskosimetrie.

3

2 <u>Theoretischer Teil</u>

Auf den folgenden Seiten werden die wichtigsten Methoden beschrieben, welche zur Charakterisierung der nanoskaligen Systeme verwendeten wurden.

2.1 Asymmetrische Fluß-FFF und MALS/RI-Detektion

2.1.1 Die FFF-Familie

Die Feld-Fluß Fraktionierung wurde bereits seit den Sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Giddings entwickelt und beschrieben (Giddings, 1968). Allgemein handelt es sich um ein System, in welchem Partikel oder Moleküle in einem Kanal durch Anlegen einer senkrecht zur Strömung gerichteten Kraft aufgetrennt werden können. Allerdings finden sich noch viel weiter zurückreichende Zeugnisse einer analogen Separation mit Hilfe der Schwerkraft. Bereits im Mittelalter wurden absteigende Fließkammerbecken für die Auftrennung von Gold und Silber aus Minen genutzt (Abbildung 2.1-a).

Beginnend von den 1960ern entwickelte sich **FFF-Familie** rasch eine ganze einzelnen (Giddings, 1993). Die Submethoden unterscheiden sich meist in der Art des quer zur Strömungsrichtung Kraftfeldes. Sie angelegten beruhen hierdurch auch auf unterschiedlichen Trennprinzipien. Diese Subtypen und deren liegenden Theorien zugrunde sind ausführlich beschrieben (Giddings, 2000; Dondi and Martin, 2000), erwähnt seien hier nur kurz deren Hauptvertreter:

Die Sedimentations-FFF trennt Partikel im Kanal unter erhöhter Schwerkraft auf



Abbildung 2.1-a: Auftrennung von Gold und Silber aus Minen, aus (Agricola, 1556; Agricola et al., 2005)

(Moon, 2000). Die Trennleistung ist bei hohen Dichteunterschieden zwischen Lösungsmittel und Partikel teils beachtlich, jedoch ist der apparative Aufwand sehr hoch und die Geräte damit sehr teuer. Der Kanal befindet sich in einer rotierenden Zentrifuge, während er von Lösungsmittel und Probe durchströmt wird. Schwachstellen waren in der Vergangenheit die Dichtungen, die den Übergang zum rotierenden Zentrifugenkanal und den äußeren Zu- und Ableitungen darstellen. Jedoch schreitet die Entwicklung momentan in diesem Bereich rasch voran und eine zunehmende Verwendung dieser Subtechnik ist zukünftig wahrscheinlich.

Die *Elektrische FFF* trennt auf Basis elektrischer Kräfte infolge der Molekül- bzw. Partikelladung (Caldwell, 2000b). Problematisch ist die schwer vermeidbare Hydrolyse des Lösungsmittels. Entstehende Gasbläschen verfälschen damit die Signale nachgeschalteter Detektoren massiv, eine Auswertung der Messungen ist unter Umständen unmöglich.

Die *Thermische FFF* eignet sich zur Charakterisierung synthetischer Polymere in organischen Lösungsmitteln (Schimpf, 2000b). Kanalober- und -unterseite weisen hierbei unterschiedliche Temperaturen auf, eine intensive Kühlung bzw. Beheizung ist also notwendig, der apparative Aufwand demnach hoch. Infolge des Temperaturgradienten diffundieren Polymere und Partikel zur kalten Seite.

Die Trennung der *Fluß-FFF* (Ratanathanawongs-Williams, 2000) wiederum ist bedingt durch einen Querfluß von Hintergrundlösungsmittel, der senkrecht zum eigentlichen Durchfluß durch den Kanal gerichtet ist. Dies wird z.B. mit Hilfe eines zweiten Pumpensystems realisiert, das zusätzlich Lösungsmittel durch zwei semipermeable Kanalseiten senkrecht durch den Kanal bewegt. Diese Membranen gewährleisten, daß das Lösungsmittel passieren kann, jedoch die Probe im Kanal verbleibt. Der Aufbau ist im Vergleich zu anderen Submethoden recht einfach, die Pumpensysteme sind bereits durch andere Techniken etabliert.

2.1.2 Geräteaufbau und Prinzip der aF-FFF

Eine Weiterentwicklung der Fluß-FFF ist die heute meist eingesetzte asymmetrische Fluß-FFF (aF-FFF oder AF4), welche auf Wahlund und Giddings zurückgeht (Wahlund und Giddings, 1987). Man verwendet meist einen Kanal von etwa 30cm Länge und 2cm Breite, wie er schematisch in **Abbildung 2.1-b** wiedergegeben ist.

Hierbei besteht nur eine Kanalseite aus einer



Abbildung 2.1-b: Aufbau eines Kanals der aF-FFF

5

semipermeablen Membran sowie einer darunterliegenden formgebenden Fritte. Dem Kanal wird also nur vom Eingang her Lösungsmittel zugeführt. Ein Teil des Lösungsmittels verläßt den Kanal am anderen Ende wieder in Richtung Detektor, ein anderer Teil passiert aber die semipermeable Membran, wodurch die notwendige Querflußkraft aufgebaut wird. Eine Verbesserung der Trennung ermöglicht weiterhin eine optimierte Kanalform, die zum Auslaß hin enger wird (Wahlund, 2000). Hierdurch wird trotz Lösungsmittelverlust durch die Membran eine annähernd konstante Strömungsgeschwindigkeit während des Durchlaufs im gesamten Kanal ermöglicht.

Weiterhin wird die Probe nicht mit dem Hintergrundlösungsmittel in den Kanal gepumpt. Sie wird statt dessen durch den speziellen Probeneinlaß injiziert. Dies ermöglicht ein genaueres Fokussieren der Probe auf eine schmale Bande vor der Trennung und damit eine bessere Trennleistung (Hassellöv et al., 2007). Vor der eigentlichen Trennung wird also durch Lösungsmitteleinlaß und Detektorauslaß reines Lösungsmittel in den Kanal gepumpt, welches durch die Membran den Kanal wieder verläßt (**Abbildung 2.1-c**, F).



Abbildung 2.1-c: Anordnung von Partikeln unterschiedlicher Größe im Kanal während der Fokussierung (F), normalen Separation (S_N) und sterischen Elution (S_{St})

Beide Volumenströme werden so eingestellt, daß die Strömungsgeschwindigkeit im Kanal nur in der Nähe des Probeneinlasses 0ml/min beträgt. Unter Beibehaltung dieses Gleichgewichtes wird die Probe injiziert und nachfolgend weiterhin auf eine Bande fokussiert. Gleichzeitig können sich die Partikel je nach Größe im entsprechenden Abstand von der Membran positionieren, die Relaxation findet statt. Danach beginnt die eigentliche Separation, welche meist 10-30min dauert (Abbildung 2.1-c, S_N). Die Trennung der Moleküle oder Partikel im Kanal erfolgt nach deren hydrodynamischem Durchmesser d_H. Insbesondere größere Partikel bzw. Moleküle werden stärker der Querbewegung des Lösungsmittels folgen und sich vermehrt in Membrannähe aufhalten. Hauptsächlich kleine Partikel werden hiervon weniger betroffen sein und infolge des entstehenden Konzentrationsgefälles und ihrer Eigendiffusion verstärkt in die Kanalmitte zurückdiffundieren. Abhängig von der Größe halten sich die Partikel demnach statistisch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in Membrannähe oder weiter entfernt von der Membran auf. Infolge des Querflusses ist aber der Aufenthalt aller Partikel auf etwa 10% der Kanalhöhe in Membrannähe beschränkt. Abbildung 2.1-c ist also nicht maßstabsgetreu. In der Mitte des Kanals herrscht infolge der Außenwandreibung eine weitaus schnellere Strömung als in Membrannähe, ein Strömungsgeschwindigkeitsgefälle entsteht. Große Partikel, die sich in Membrannähe befinden, bewegen sich demnach langsamer durch den Kanal und eluieren aus diesem zuletzt. Kleinere Partikel eluieren zuerst.

Die Retention im Kanal ist in der FFF-Theorie bereits gut beschrieben. Bei allen FFF-Methoden steht der dimensionslose Retentionsparameter RP mit der Kraft, die auf den Analyten ausgeübt wird, folgendermaßen in Beziehung (Schure et al., 2000):

$$RP = \frac{kT}{Fw}$$
(2.1a)

Hierbei repräsentieren k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und w die Kanalhöhe. Die Kraft F, die auf den Analyten in Richtung Membran ausgeübt wird, ist bei der Fluß-FFF abhängig vom Totvolumen des Kanals V₀, dem Querflußvolumenstrom durch die Membran V_c, der Kanalhöhe w und dem Reibungskoeffizienten des Analyten f:

$$F = \frac{V_C w}{V_0} f \tag{2.1b}$$

Setz man nun Gleichung 2.1b in 2.1a ein, so ergibt sich:

$$RP = \frac{kTV_0}{fV_c w^2} \tag{2.1c}$$

Unter Einsetzung der Nernst-Einstein-Gleichung mit dem Diffusionskoeffizienten D

$$f = \frac{kT}{D} \tag{2.1d}$$

in 2.1c ergibt sich:

$$RP = \frac{V_0 D}{V_c w^2}$$
 bzw. $D = \frac{V_c w^2 RP}{V^0}$ (2.1e)

Das Retentionsverhältnis RV wird analog zur Chromatographie als Verhältnis von Totzeit t₀ zu Retentionszeit t_r des jeweiligen Peakmaximums beschrieben:

$$RV = \frac{t_0}{t_r} \tag{2.1f}$$

Da sich die Probe während der Messung praktisch nur in Membrannähe und nicht in der Mitte des Kanals aufhält, gilt die Annäherung RV \approx 6RP. Daraus ergibt sich aus Gleichung 2.1e und 2.1f folgende Formel, nach der die Verweildauer im Kanal mit dem Diffusionskoeffizienten in Beziehung gesetzt wird:

$$D = \frac{t_0 V_c w^2}{6t_r V_0}$$
(2.1g)

Anhand dieser Formel wird deutlich, wie stark der Einfluß der beiden wichtigsten einstellbaren Parameter, der Kanalhöhe w und des Querflußvolumenstroms V_c , ist. Für kommerziell erhältliche Systeme haben sich w-Werte von etwa 100-500µm etabliert. V_c ist durch die meist begrenzte Permeabilität der Membran und dem daraus resultierenden hohen Druck im Kanal auf etwa 0-5ml/min begrenzt.

Der Diffusionskoeffizient und der hydrodynamische Durchmesser eines Partikels lassen sich anhand der Stokes-Einstein-Beziehung unter der Annahme einer sphärischen Partikelform ineinander umrechnen, wobei η die Viskosität des Hintergrundlösungsmittels repräsentiert:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_{H}}$$
(2.1h)

Damit kann aus Retentionszeit und den anderen bekannten Parametern der Messung der hydrodynamische Durchmesser der Probe errechnet werden.

Obwohl theoretisch eine normale Auftrennung mit Hilfe der Fluß-FFF ab 1kDa möglich ist, wird die Untergrenze praktisch durch die Ausschlußgröße der Membran gesetzt, welche meist bei 5-10kDa liegt. Vorteilhafterweise werden damit auch während der Messung niedermolekulare Probenverunreinigungen abgetrennt. Sie können die Membran passieren.

Dieses normale Elutionsverhalten ist bis zu einer Obergrenze von etwa 500nm zu beobachten, abhängig von den verwendeten Meßbedingungen. Der nutzbare Größenbereich der Fluß-FFF kann aber bis zu einigen Mikrometern erweitert werden. Die obere Grenze setzt praktisch der Durchmesser der kleinsten verwendeten Kapillare. Diese großen Partikel werden nach einem anderen Prinzip aufgetrennt. Sie durchlaufen die sterische Elution, eventuell auch durch den Lift-Hyperlayer-Einfluß verstärkt (Caldwell, 2000a; Giddings, 2000). Hierbei sind die Partikel so groß, daß sie infolge des Querflusses praktisch auf der Membran aufliegen

(**Abbildung 2.1-c**, S_{St}). Je größer aber ein Partikel ist, desto weiter ragt es in das Kanalinnere und ist deshalb einer schnelleren Strömung ausgesetzt. Hierdurch eluieren die größeren Partikel zuerst, die Reihenfolge der Trennung ist also invers.

2.1.3 Molmassen- und Radienbestimmung mit Hilfe von MALS

Die Umrechnungen von t_r in D (Gleichung 2.1g) und d_H (Gleichung 2.1h) anhand der aF-FFF-Theorie gilt nur unter der Annahme einer sphärischen Partikelform und nur, sofern keine Wechselwirkungen zwischen Probe und Membran auftreten. Aber auch andere Effekte können zu einer Verfälschung der Werte führen, wie eine Überladung des Kanals oder auch starke elektrostatische Abstoßungen zwischen den Partikeln (Cölfen und Antonietti, 2000). Die Anwendung der aF-FFF-Theorie hat sich daher in der Vergangenheit als störungsanfällig erwiesen, außerdem sind hierzu nachgeschaltete Konzentrationsdetektoren wie UV oder Brechungsindex (RI) Voraussetzung. Zu bedenken ist, daß z.B. ein UV-Detektor insbesondere bei größeren Partikeln neben deren Absorption



Abbildung 2.1-d: Asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung (aF-FFF): Kanal, Eclipse™ F (organische Version) und Dawn[®] EOS (18 Winkel-Lichtstreudetektor) von Wyatt Technology Europe (Derbach, Deutschland), Brechungsindexdetektor Shodex[®] RI-101 von Showa Denke K.K. (Kanagawa, Japan)

auch deren Streuung mißt. Das Konzentrationssignal ist demnach verfälscht. Optimal ist folglich eine Kopplung mit Detektoren, die Molmassen bzw. Partikelgrößen direkt auswerten können. Nachgeschaltete Massenspektrometrie ist möglich, wird jedoch hauptsächlich in Spezialfällen wie der organischen FFF (Kassalainen und Williams, 2003) oder in der Analyse von niedermolekularen Abbauprodukten angewendet. Vorteilhafter und weiter verbreitet ist eine Kombination mit einem zusätzlichen Mehrwinkellichtstreudetektor (MALS), basierend auf elastischer Lichtstreuung. Dieser kann im Gegensatz zu PCS-Detektoren in sehr kurzen Zeitintervallen über die gesamte Messung hinweg Werte registrieren. Voraussetzung ist nur eine verwertbare Lichtstreuung, d.h. ein genügender optischer Kontrast der Probe zum Lösungsmittel. Das Brechungsindexinkrement sollte daher möglichst groß sein. In Abbildung 2.1-d ist die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Apparatur dargestellt, welche über eine solche Detektorkombination verfügt. Alle folgend aufgeführten Trennungen wurden mit diesem Gerät durchgeführt. Verfügbar sind sensitive MALS-Detektoren, die Streuintensitäten über 18 verschiedene Winkel detektieren.

Handelt es sich um ein Makromolekül, so genügen bereits wenige Winkel, um die Molmasse aus der Intensität bei Detektorwinkel $\theta=0^{\circ}$ zu extrapolieren. Dies geschieht meist mit Hilfe der Zimm-Gleichung (Wyatt, 1993):

$$\frac{Kc}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_{W}P_{\theta}} + 2A_{2}c$$
(2.1i)

Wobei K sich aufschlüsselt in:

$$K = \frac{4\pi^2 (dn/dc)^2 n_L^2}{N_A \lambda_0^4}$$
(2.1j)

Bekannte oder leicht zugängliche Werte sind die Wellenlänge des Lasers λ_0 , die Avogadro-Zahl N_A und der Brechungsindex des Lösungsmittels n_L. Das Brechungsindexinkrement dn/dc ist für viele Substanzen bereits bekannt oder kann vor der Messung bestimmt werden. Da Makromoleküle und Partikel unterhalb einer Größe von $\lambda_0/20$ praktisch richtungsunabhängig streuen, kann für sie die Streufunktion P₀ vernachlässigt werden. A₂ stellt den zweiten Virialkoeffizienten als Maß der Lösungsmittel-Substanz-Wechselwirkung dar und kann vor einer Messung bestimmt werden. Meist ist der Term 2A₂c der Gleichung 2.1i aber vernachlässigbar klein.

Während der Messung veränderliche Werte sind also die Konzentration c und die Rayleigh-Ratio R_{θ} . R_{θ} errechnet sich aus der Intensität des Streulichtes I_{θ} nach folgender Formel (Wyatt, 1993):

$$R_{\theta} = \frac{(I_{\theta} - I_{\theta}^{LM}) \cdot r_{SD}^2}{I_0 \cdot V_S}$$
(2.1k)

Subtrahiert werden muß aber die Streuintensität des Lösungsmittels I_{θ}^{LM} . Weiterhin gehen die Intensität des Primärlichtes I_0 , das Streuvolumen V_S und der Abstand zwischen Streuvolumen und Photodiode r_{SD} in die Formel ein. Bei einer winkelabhängigen Auftragung von Kc/R_{θ} gegen sin²(θ /2) wird mit Hilfe von Gleichung 2.1i als Ordinatenschnittpunkt 1/M_W erhalten. M_W ist der gesuchte Wert, die gewichtsgemittelte Molmasse.

Die aus dem aF-FFF-Kanal eluierende Probe ist aber bereits aufgetrennt. Das heißt, bedingt durch die Detektion in kurzen Zeitintervallen werden viele Werte jeweils monomodaler Fraktionen erhalten. Aus diesen einzelnen Molmassen läßt sich wiederum ein M_w-Wert errechen (Winter und Noll, 1998):

$$M_{W} = \frac{\sum_{i} (N_{i}M_{i})M_{i}}{\sum_{i} N_{i}M_{i}}$$
(2.11)

Aus der Probengesamtheit läßt sich damit auch die anzahlgemittelte (M_N) Molmasse errechnen:

$$M_N = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$
(2.1m)

Beide Werte eignen sich, um polydisperse Proben zu charakterisieren. Aus der Relation M_W/M_N errechnet sich daher die Polydispersität (PDI).

Sind Partikel größer als $\lambda_0/20$ (bei Laser im roten Licht ist typischerweise λ_0 =690nm), so ist die Streuung anisotrop, also richtungsabhängig. Die Partikelgröße in Form des Streumassen- bzw. Gyrationsradius $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ kann errechnet werden, wenn man eine entsprechende Theorie zugrunde legt (Wyatt, 1998), wobei $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ meist als r_g , vereinfacht wird. Für kleinere Partikel läßt sich auch hierzu oft die Zimm-Gleichung nutzen und der Anstieg des Graphen Kc/R_{θ} gegen sin²($\theta/2$) auswerten. Wenn die Polymerkette aus i Atomen der Masse m_i besteht, wird r_g definiert als:

$$r_g^2 = \frac{\sum_{i} m_i r_i^2}{\sum_{i} m_i}$$
(2.1n)

Hierbei gibt r_i^2 das mittlere Abstandsquadrat des Atoms i vom Massenschwerpunkt des Moleküls an. Aus r_g läßt sich mit Hilfe einfacher Umrechungsfaktoren auch der geometrische Radius für entsprechende Partikelformen wie Kugel, Hohlkugel, Stäbchen etc. bestimmen (Winter und Noll, 1998). Für größere Partikel ist damit eine hohe Zahl an detektierten Winkeln notwendig, um eine adäquate Theorie anzupassen. Eine Möglichkeit der Radienbestimmung größerer sphärischer Partikel wäre z.B. die Mie-Theorie.

Der Kanal dient bei aF-FFF/MALS damit nur der Trennung, die Berechnung von absoluten Molmassen oder die Größenbestimmung erfolgt mit Hilfe eines MALS- und Konzentrationsdetektors.

Die aus aF-FFF/MALS gewonnen Parameter können zusätzlich Aussagen zur Partikelform bzw. zur Offenheit der untersuchten Struktur liefern. Zwischen den Parametern M_W und $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ gilt folgende Beziehung (Wittgren und Wahlund, 1997):

$$\left\langle r_g^2 \right\rangle^{1/2} = k_\beta \cdot M_W^\beta \tag{2.10}$$

Trägt man M_W und r_g logarithmisch gegeneinander auf, kann man die Konstante k_β vernachlässigen und aus dem Anstieg den Flory-Exponenten β bzw. dessen Kehrwert, die fraktale Dimension des Massenfraktals D_m , bestimmen (Thielking und Kulicke, 1996; Schmidt, 1989):

$$D_m = \frac{1}{\beta} \tag{2.1p}$$

Bislang weitaus stärker genutzt ist die analoge Beziehung zwischen intrinsischer Viskosität $[\eta]$ und viskositätsgemittelter Molmasse M_V als Mark-Houwink-Kuhn-Sekurada (MHKS)-Gleichung (Berth und Dautzenberg, 1998):

$$[\eta] = k_{\alpha} \cdot M_{\nu}^{\alpha} \tag{2.1q}$$

Die Konstante repräsentiert k_{α} , α ist der MHKS-Exponent. Die Gleichung findet auch Anwendung, sofern Viskositätsdetektoren zur Molmassenbestimmung eingesetzt werden. M_V liegt meist zwischen der Werten von M_W und M_N (Winter und Noll, 1998), wird aber oft gegen diese ausgetauscht.

Ein Vergleich verschiedener Literaturwerte wird dadurch vereinfacht, daß der Flory-Exponent β und der MHKS-Exponent theoretisch ineinander umgewandelt werden können nach (Thielking und Kulicke, 1996):

$$\alpha = 3\beta - 1 \tag{2.1r}$$

Wie in **Tabelle 2.1-a** zu erkennen ist, resultieren für eindimensionale (Stäbchen) oder dreidimensionale Strukturen (Kugeln) Extremwerte, wohingegen gelöste Polymerketten meist im mittleren Bereich vorzufinden sind.

Struktur	α	β	D _m
Ideale Kugel	0	0.33	3
Scheibe / Polymer Theta - Knäuel	0.5	0.5	2
Gut gelöstes Polymer	1	0.67	1.5
Idealer Stab	2	1	1

2.1.4 Anwendungen der aF-FFF/MALS

Der größte Vorteil der aF-FFF ist die Anwendbarkeit in einem weiten Größenbereich. Es können theoretisch Makromoleküle zwischen 1kDa und einigen GDa sowie Partikel zwischen etwa 2nm und 100µm separiert werden (Schimpf, 2000c). Die Stärke der aF-FFF sind hierbei größere Makromoleküle von mehr als 50-100kDa, diese zeigen eine bessere Trennung im Vergleich zur Gelpermeationschromatographie (GPC) (Hansen und Klein, 2001; Schimpf, 2000a). Eine detaillierte Beschreibung der GPC ist hier nicht gegeben, sie findet sich z.B. bei (Viovy und Lesec, 1994). Stark adsorbierende Proben können bei der GPC in der Trennsäule festgehalten werden. Diese Gefahr der Adsorption ist auch beim Kanal der aF-FFF vorhanden, doch aufgrund der geringen Oberfläche der Membran weitaus geringer. Ein weiterer Vorteil ist, daß die mittels MALS detektierten Molmassen Absolutwerte sind. Somit kann auf Vergleichsstandards, die nur für wenige Substanzen vorhanden sind, verzichtet werden.

In den analysierbaren Größenbereich der Fluß-FFF gehört auch eine Vielzahl pharmazeutischer Proben (Gimbert et al., 2003; Fraunhofer und Winter, 2004a). Häufig wurden in der Vergangenheit bereits *Proteine oder Immunglobuline* charakterisiert, z.B. bei (Liu et al., 1993; Litzen et al., 1993; Reschiglian et al., 2005). Als eigene Trennbeispiele finden sich Bovines Serumalbumin (BSA) (Augsten und Mäder, 2006a) oder Pankreatin als komplexe Proteinmischung (Augsten et al., 2007a). Diese sehr empfindichen Systeme lassen sich rasch hinsichtlich ihrer Stabilität untersuchen, deren Mischungen können außerdem voneinander abgetrennt und jeweils in ihrer Molmasse bestimmt werden.

Besondere Bedeutung hat auch die Untersuchung von *Polysacchariden* mit Hilfe der Fluß-FFF gewonnen. Die Charakterisierungsmöglichkeiten mit Hilfe von MALS wurden bereits an Dextranen und Pullulanen (Wittgren und Wahlund, 1997) oder κ-Carrageenan und Xanthan (Viebke and Williams, 2000) gezeigt. Spezielle Molekül-Strukturuntersuchungen waren damit an z.B. κ-Carrageenanen möglich (Wittgren et al., 1998). Von Vorteil ist bei der Fluß-FFF/MALS, daß die oft sehr breit verteilten Polysaccharide bis zu sehr hohen Molmassen gut aufgetrennt und detektiert werden können (Andersson et al., 2001) und eventuelle Verunreinigungen von z.B. unerwünschten Ionen durch die Membran abgetrennt werden.

Weitere mit Fluß-FFF charakterisierbare biologische Proben sind Zellorganellen, DNA, Viren und Bakterien (Reschiglian et al., 2002). Mit Hilfe der Sterischen Fluß-FFF lassen sich weiterhin Blutbestandteile und humane und tierische Zellen separieren (Reschiglian et al., 2005).

Ein Feld, auf welchem die Kombination Fluß-FFF/MALS zunehmend angewendet wird, ist die Charakterisierung von Nanopartikeln, Liposomen oder Micellen (Fraunhofer und Winter, 2004a). Die Partikel eluieren, je nach Größe, zu unterschiedlichen Zeiten. Große Partikel überlagern daher nicht die Analyse kleinerer. Eine aufwendige Vorreinigung vieler Proben ist damit nicht mehr notwendig. Insbesondere in der Lichtstreudetektion ist dies von Vorteil, da geringe Mengen Staub oder auch unvermeidbare Aggregate das Ergebnis sonst stark verfälschen können. Aufgrund der Analyse jeder aufgetrennten Fraktion, die den Kanal verläßt, lassen sich neben Mittelwerten auch komplexe Partikelgrößenverteilungen angeben (Korgel et al., 1998). Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den meist verwendeten Batch-Methoden dar. Ein Beispiel einer zwei vollkommen unterschiedliche Größen enthaltenden Probe sind proteinhaltige Nanopartikel. Bei Gelatine-Nanopartikeln wurde Erythropoetin abgetrennt und beide Komponenten während einer Messung analysiert (Fraunhofer et al., 2004b). Es gibt auch Literatur, nach der mittels FFF/MALS selbst Suspensionen auftrennbar waren, die sich nur in etwa 4nm Größe unterschieden (White, 1997). Dies steht im Gegensatz zur dynamischen Lichtstreuung, die gerade bei breiten oder polymodalen Verteilungen an ihre Grenzen stößt (Glatter et al., 1991).

2.2 Verwendete Licht- und Röntgenstreuverfahren

Auch der allergewöhnlichste Gegenstand, in Licht und Gegenlicht, ist wert der Betrachtung.

(Wilhelm Busch)

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zahlreiche Analyseverfahren zum Einsatz, die auf Lichtstreuung basieren. Diese werden nachfolgend kurz erläutert. Die bei der aF-FFF verwendete MALS-Detektion ist in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

2.2.1 Raman-Spektroskopie

Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie werden Informationen über Schwingungszustände von Molekülen erhalten. Im Gegensatz zur Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) wird aber Streulicht detektiert. Der größte Teil der Strahlung kann die Probe ohne Wechselwirkungen passieren. Ein erheblicher Anteil wird aber in alle Richtungen elastisch gestreut, also mit derselben Frequenz wie die Anregungsstrahlung (v₀). Zusätzlich unterliegen einige Photonen auch dem Raman-Effekt, von etwa 10¹⁰ eingestrahlten Photonen aber nur eines. Sie zeigen also eine inelastische und damit frequenzverschobene Streuung. Das Anregungslicht des Lasers wechselwirkt dabei mit den Elektronenhüllen der Atome bzw. Moleküle der Probe und regt diese zu erzwungenen Schwingungen an. Voraussetzung für eine Anregung ist eine ausreichende Polarisierbarkeit, bei gelösten Proben also ein sich vom Lösungsmittel unterscheidender Brechungsindex. Das entstandene oszillierende Dipolmoment sendet wiederum Photonen aus. Die Frequenz der Eigenschwingung des Moleküls (v_{vib}) kann hierbei aber zu einer Veränderung der Oszillationsfrequenz führen. Damit werden drei Frequenzen erhalten (**Tabelle 2.2-a**). Tabelle 2.2-a: Mögliche Raman-Frequenzen

Die Raman-Spektren bestehen jedoch praktisch nur aus einer Darstellung der Stokes-Linien, wobei diese trotz der geringeren Frequenz mit

Spektrenbande	Frequenz	Streuung	
Rayleigh	ν_0	Elastisch	
Stokes	v_0 - v_{vib}	Inelastisch	
Anti-Stokes	$v_0 + v_{vib}$	Inelastisch	

positiven Wellenzahlen beschrieben werden. Viele der Banden weisen in Raman- und FTIR-Spektren selbige Wellenzahl auf (McCreery, 2000). Aber im Gegensatz zu FTIR-Spektren führen apolare Atomgruppen zu intensiveren Banden in Raman-Spektren. Somit können auch wäßrige Lösungen gut untersucht werden (Sandler et al., 2007).

2.2.2 Photonenkorrelationsspektroskopie

Mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) lassen sich Partikelgrößen zwischen etwa 10nm und 3µm bestimmen. Kleinere Partikel streuen nicht ausreichend intensiv und größere können sedimentieren. Das Meßprinzip ist anderswo bereits detailliert beschrieben (Müller und Schumann, 1996; Nitzsche, 1997). Als Basis dient die Brownsche Molekularbewegung der kolloidalen Partikel im vom Laserstrahl durchleuchteten Volumen. Diese führt durch den Doppler-Effekt zu Interferenzerscheinungen, die in Peakverbreiterungen der Frequenz der Streustrahlung resultieren. Aus der Halbwertsbreite des Frequenzpeaks Γ kann mit Hilfe des Streuvektors q der Diffusionskoeffizient D der Probe errechnet werden:

$$\Gamma = D \cdot q^2 \tag{2.2a}$$

Vorteilhafterweise ist die Fluktuationszeit der Streulichtintensität zu Γ proportional. Zur Auswertung dient daher nicht der Gesamtbetrag der Intensität, sondern die Intensitätsfluktuation. Die Detektion der Fluktuation setzt eine hohe Genauigkeit bei hoher zeitlicher Auflösung voraus. Die Auswertung erfolgt über eine Zeit-Autokorrelation des Signals. Aus dieser Korrelationsfunktion g(τ) läßt sich D errechnen, wobei τ die Korrelator-Verzögerungszeit darstellt (Spezialfall monomodale Probe):

$$g(\tau) = e^{-2Dq^2\tau} \tag{2.2b}$$

Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung kann unter der Annahme einer sphärischen Partikelform der hydrodynamische Durchmesser d_H errechnet werden:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_H} \tag{2.2c}$$

wobei η die Viskosität des Hintergrundlösungsmittels, T die Temperatur und k die Boltzmann-Konstante repräsentieren. Als wichtige Größen werden d_H und der Polydispersitätsindex (PI) als Maß der Verteilungsbreite erhalten. PI<0.05 charakterisiert monodipserse, 0.1<PI<0.2 enge und 0.2<PI<0.5 breite Verteilungen (Nitzsche, 1997). Oberhalb PI von 0.7 sind praktisch keine Messungen mehr durchführbar. Von Vorteil sind die relativ geringe Meßdauer und die relativ geringen technischen Anforderungen. Von Nachteil ist aber, daß sich multimodale Verteilungen praktisch nur im Anstieg des PI manifestieren und die Berechnung von Größenverteilungen vom Auflösungsfaktor abhängt (Schuhmann und Müller, 1995). Hierdurch ist bei multimodalen Verteilungen eine Vergleichbarkeit der Daten nur sehr bedingt gegeben.

2.2.3 Röntgenkleinwinkelstreuung

Das Prinzip der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) ist mit zahlreichen Anwendungsbeispielen umfassend beschrieben worden (Glatter und Kratky, 1982; Chu und Liu, 2000). Die Bragg'sche Gleichung verbindet den Netzebenenabstand d_{NE} mit dem Bragg-Winkel γ zwischen Primärstrahl und gebeugtem Strahl

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{NE} \cdot \sin \gamma \tag{2.2d}$$

wobei n die Beugungsordnung und λ die Wellenlänge darstellen. Bei SAXS werden im Gegensatz zu Röntgenweitwinkelstreuung sehr kleine γ betrachtet, um relativ große Strukturen bis zu über 100nm zu charakterisieren. Für kurze Meßzeiten und eine hohe Auflösung sind exakt kollimierte und intensive Röntgenstrahlen Voraussetzung. Diese werden von Synchrotronquellen erhalten, was einen großen apparativen Aufwand erfordert.

Meist erfolgt eine Umrechnung des Bragg-Winkels γ bzw. des Streuwinkels 2γ in den Streuvektor q, n_L ist der Brechnungsindex des Lösungsmittels (Kratky, 1982):

$$q = \frac{4\pi \cdot n_L}{\lambda} \sin \gamma \tag{2.2e}$$

Bei geringen Streuvektoren werden demnach relative große Strukturen untersucht. Die Streukurve kann zahlreiche Maxima enthalten, die eine Errechnung von r_g leicht ermöglichen (Glatter, 1980). Praktisch ist dies aufgrund der unzureichenden Kohärenz des Röntgenstrahls und der Polydispersität der Probe nur selten möglich. Aus der Streukurve I(q) vs. q läßt sich aber r_g für große Partikel mit etwa q<1/r_g direkt über die Guinier-Gleichung bestimmen:

$$I(q) = I_0 \cdot e^{-\frac{1}{3}r_g^2 \cdot q^2}$$
(2.2f)

 I_0 repräsentiert hier die Intensität des eingehenden Strahles. Aus r_g ist bei sphärischen Partikeln auch der geometrische Durchmesser d_{geom} zugänglich (Porod, 1982):

$$d_{geom} = 2 \cdot \sqrt{\frac{5}{3}} \cdot r_g \tag{2.2g}$$

Der mittlere Teil der Streukurve enthält Daten zur Partikelform, wobei die Intensität zu größeren Streuvektoren exponentiell abfällt (Teixeira, 1994):

$$I(q) \sim q^x \tag{2.2h}$$

Der Exponentient x kann je nach basierendem Streugesetz Werte von -1 bis unter -4 annehmen. Eine Kugel mit glatter Oberfläche folgt dem Gesetz von Porod (Porod, 1982) und nimmt einen Wert von x = -4 an.

3 <u>Charakterisierung der Partikelgröße bioabbaubarer</u> <u>Nanosphären</u>

Alles Große besteht aus Kleinem. Wer vom Kleinen nicht Besitz nimmt, kann das Große nie erwerben.

(Wilhelm Heinse)

3.1 <u>Einleitung</u>

Wie in Kapitel 1 bereits beschrieben, sind Nanopartikel klein genug, um parenteral oder sogar intravenös appliziert zu werden. Sofern sie aus bioabbaubaren Polymeren aufgebaut sind, entstehen bei deren Abbau für den Körper relativ harmlose Produkte (Lill und Tertsch, 1996). Hauptsächlich verschiedene Polyester wurden in dieser Hinsicht bereits intensiv untersucht. Copolymerisate aus Milch- und Glykolsäure sind für eine parenterale Anwendung bereits zugelassen (Markland und Yang, 2002). Ihre Struktur ist in **Abbildung 3.1-a** dargestellt.



Abbildung 3.1-a: Struktur von Poly(D,L-Laktid-co-Glykolid), PLGA, mit jeweiligem Anteil PLA (R=CH₃) und PLG (R=H)

Zur Herstellung von Nanopartikeln aus bereits vorhandenen Polymeren existieren verschiedene Methoden (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Eine relativ simple Herstellungsmöglichkeit ist die "Solvent depostition" (Fessi et al., 1989). Hierbei wird eine Polymerlösung in ein für das Polymer unlösliches, d.h. zumeist wäßriges, Medium langsam eingebracht bzw. injiziert. Da aber beide Lösungsmittel miteinander gut mischbar sind, folgt eine besondere Präzipitation des Polymers in Form von Nanopartikeln. Bei Einhaltung von festgelegten Herstellungsparametern können Partikel einer definierten Größe erhalten werden (Molpeceres et al., 1996; Chacon et al., 1996).

Eine Zugabe von Stabilisatoren ist Voraussetzung, um die Herstellung zu ermöglichen bzw. zu erleichtern und eine rasche Aggregation während der Lagerung zu unterbinden (Murakami et al., 1997; Vandervoort und Ludwig, 2002). Hierfür werden Polyvinylalkohol oder Blockcopolymere aus Polyethylenoxid (PEG oder PEO) und Polypropylenoxid (PPO), also Poloxamere, verwendet. Bei intravenösen Systemen können hydrophile PEG-Beschichtungen zu einer Reduzierung der Aufnahme in Leber und Knochenmark und damit zu einer verlängerten Blutzirkulation führen (Stolnik et al., 1995; Dunn et al., 1997). Diese Aufnahme in die jeweiligen Organe geht auf eine Opsonierung und nachfolgende Phagozytierung durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems zurück (Stolnik et al., 1995). Daher existieren zwei Möglichkeiten der Verlängerung der Blutzirkulation durch PEG. Einerseits können PEG enthaltende amphiphile Substanzen (Poloxamere) der Formulierung zugegeben werden, andererseits kann PEG kovalent an die Partikeloberfläche gebunden werden. (Stolnik et al., 1994). Die kovalente Anbindung führt zu neuen Substanzen, die aber vor ihrer Anwendung intensiv hinsichtlich ihrer Toxizität geprüft werden müssen. Im Gegensatz dazu kann das bereits parenteral zugelassene und mehrfach monographierte Poloxamer 188 (Ph. Eur. 6.0, 2008; USP 31, 2008; BP, 2008) der Formulierung direkt zugegeben werden.

Daher bezieht sich die nachfolgende Studie auf Nanosuspensionen aus Partikeln von Poly(D,L-Laktid-co-Glykolid), kurz (PLGA), die mit Poloxamer 188 stabilisiert wurden. Die Partikelgröße und Größenverteilung sind Schlüsselparameter von Nanosuspensionen, jedoch ist deren eindeutige Bestimmung schwierig (siehe Kapitel 1). Es gibt bislang nur wenige praxisnahe vergleichende Studien verschiedener Techniken, wie z.B. (Bootz, 2004). Daher war hier das Ziel, verschiedene Methoden hinsichtlich der bestimmten Partikelgrößen bzw. Größenverteilungen, deren Leistungsfähigkeit und deren Aufwand zu vergleichen. Die experimentellen Ergebnisse der Nanosphären sind bereits publiziert (Augsten et al., 2008c), Teilergebnisse finden sich auch in weiteren Veröffentlichungen (Augsten und Mäder, 2005; Augsten und Mäder, 2006a). Einige Systeme wurden auch in einer Zusammenarbeit mit A. Hünerbein und Prof. Dr. R. H. H. Neubert hinsichtlich des Zeta-Potentials und der Quartz-Kristall Mikrobalance charakterisiert (Hünerbein et al., 2006).

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erlaubt dank der ausreichenden Auflösung im unteren nanoskaligen Größenbereich die Bestimmung der Partikelform, was eine Voraussetzung zur Berechung der geometrischen Dimension mit Hilfe von Lichtstreumethoden ist. Für die Partikelgrößenbestimmung wurde die PCS als Referenz verwendet. Weiterhin kamen SAXS und aF-FFF in Kombination mit MALS bei ausgesuchten Nanosuspensionen zum Einsatz. Die Prinzipien der Methoden sind bereits in Kapitel 2 erläutert worden. Zur Charakterisierung von Nanopartikeln aus bioabbaubaren Polymeren mit Hilfe von SAXS finden sich nur wenige Artikel, z.B. (Nakata und Takahashi, 2000; Müller et al., 1994). Dies ist vermutlich durch die geringe Röntgenstreuqualität vieler medizinischer Nanosuspensionen bedingt (Koch et al., 2001). Um bei den nachfolgenden Experimenten Daten genügender Qualität zu erhalten, wurde die intensive Synchrotronstrahlung verwendet. Bei der Charakterisierung von pharmazeutischen Nanosphären mit Hilfe der aF-FFF finden sich ebenfalls nur wenige Literaturquellen (Fraunhofer, et al., 2004b).

3.2 Materialien und Methoden

3.2.1 <u>Herstellung der Nanosuspensionen</u>

Die wäßrigen Suspensionen der PLGA-Nanosphären bestanden zu 0.25%, 0.5% oder 1% (m/V) aus Purasorb PDLG (kurz Pura PDLG) oder Resomer RG 502, 503, 502H, 503H bzw. 504H (kurz Res 50X). Die Polyester wurden von Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH (Ingelheim, Deutschland) und von PURAC Deutschland (Bingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die jeweiligen Molmassen sind in **Tabelle 3.2-a** gegeben.

Tabelle 3.2-a: Gewichts- (M_W) und anzahlgemittelte Molmassen (M_N) der verschiedenen Typen an Poly(D,L-Laktid-co-Glykolid) anhand GPC gegen Polystyrenstandards, Angaben des Herstellers (oder nachbestimmt¹)

	Res 502	Res 502H	Res 503	Res 503H	Res 504H	Pura PDLG
M _W [kDa]	18.6	14.6	40.6	37.0	52.5	43.5 ¹
M _N [kDa]	11.4	7.9	25.3	22.5	32.4	20.5^{1}

Die Partikel wurden mit Hilfe der "Solvent deposition"- Methode hergestellt (Fessi et al., 1989), jedoch mit einigen Modifikationen. Die Polymere wurden in Aceton gelöst (Chacon et al., 1996) und automatisiert in die doppelte Menge Wasser mit 0-4% (m/V) Poloxamer 188 (BASF Ludwigshafen, Deutschland) injiziert (Pumpe ISM 834A, Ismatec SA, Schweiz, Stufe 10). Nachfolgend wurden Aceton und ein Teil des Wassers unter reduziertem Druck entfernt und auf das gewünschte Volumen eingeengt (40°C, 200mbar verringert bis auf 30mbar). Alle Zubereitungen wurden dreimal hergestellt und zweifach bzw. dreifach vermessen, je nach verwendeter Methode. Teilweise erfolgte eine Zugabe von Poloxamer 188 erst direkt nach der Herstellung, wie im nachfolgenden Text beschrieben.

3.2.2 TEM von Gefrierbruchnachbildungen

Die TEM-Proben wurden kryofixiert mit einem Propanjet-Gefrierer (JFD 60, BAL-TEC, Liechtenstein), der Gefrierbruch erfolgte bei -110°C mit einer BAF 060-Apparatur (BAL-TEC, Liechtenstein). Nach einer einminütigen Gefrierätzung wurden die Oberflächen mit Platinum (2nm, Beschichtungswinkel 45°) und nachfolgend mit Kohlenstoff (22nm, Beschichtungswinkel 90°) beschichtet. Die Nachbildungen wurden mit Natriumchlorid (4% Cl) für 30min und destilliertem Wasser für 5min behandelt und in 30% Aceton für 30min gewaschen. Nach dem nochmaligen Waschen in destilliertem Wasser wurden die Nachbildungen auf einem Formvar-beschichteten Kupfergitter befestigt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet (EM 900, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, 80kV). Die Aufnahmen erfolgten mit einer Variospeed SSCCD-Kamera SM-1k-120 (TRS, Moorenweis, Deutschland).

3.2.3 Bestimmung der Viskosität sowie Größe anhand PCS

Die hydrodynamischen Durchmesser der Partikel wurden bei 25°C mit einem HPPS 5002 (Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK) bestimmt. Diese werden nachfolgend nur als hydrodynamische Durchmesser bzw. z-averages beschrieben. Die Messungen erfolgten jeweils dreifach, jedes Mal mit mindestens 14 Autokorrelationsfunktionen. Die Fehlerbalken zeigen die zugehörigen Standardabweichungen. Die dynamische Viskosität η der Lösungen von Poloxamer 188 wurde mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters (Schott, type K1c and 0a) unter Zuhilfenahme der Instrumentenkonstante k bestimmt:

$$\eta = k \cdot (t_{Ausfluß} - HK) \cdot \rho \tag{3.2a}$$

Die Messung erfolgte jeweils dreifach. Die Ausflußzeiten wurden der Hagenbach-Korrektur (HK) unterworfen, um den zur Beschleunigung der Flüssigkeit nötigen Anteil der potentiellen Energie zu berücksichtigen. Die Dichte ρ wurde mit Hilfe der Mohr-Westphal-Waage bestimmt (Johannes Hammer, Deutschland).

3.2.4 Charakterisierung mittels SAXS

Um Daten genügender Qualität zu erhalten, waren ein sehr kleiner meßbarer Winkel sowie eine hohe Intensität und eine gute Kollimation der Röntgenstrahlen Voraussetzung. Die Messungen erfolgten daher an der Beamline BW4 im HASYLAB am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg, Deutschland). Die Kalibrierung erfolgte mit Silberbehenat (Blanton et al., 1999). Die Streuung wurde bei einer Wellenlänge von 0.15nm bei einer Proben-Detektor-Entfernung von 13m und 3m sowie einer Temperatur von 27°C registriert.

Ausgewählte Beispielsuspensionen wurden vermessen. Die Intensitäten der jeweiligen Einzelmessungen wurden aufkumuliert. Die Gyrationsradien wurden anhand des Kratky-Porod-Plots von $\ln(I_{(q)})$ gegen q^2 im Bereich von q = 0.029 bis 0.053nm⁻¹ bestimmt. Die Berechnung der geometrischen Größe der Sphären wird in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

3.2.5 Charakterisierung mittels aF-FFF/MALS

Die Suspensionen wurden im Hintergrundlösungsmittel von bidestilliertem Wasser mit 1g/l Natriumdodecylsulfat mittels aF-FFF aufgetrennt. Der verwendete Spacer hatte eine Höhe von 350µm, die Membran aus regenerierter Cellulose eine Ausschlußgrenze von 10kDa (C010F, Microdyn Nadir GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Bei der Charakterisierung der Suspensionen in 2% (m/V) Poloxamer 188 kam selbige Lösung als Hintergrund zum Einsatz. 100µl jeder Probe wurden für 2min mit 0.2ml/min injiziert, für 1min mit 1ml/min fokussiert und nachfolgend mittels eines dreistufigen Querflußgradienten aufgetrennt (Apparatur in Abbildung 2.1-d). Der Querflußvolumenstrom fiel dabei innerhalb 8min linear von 1ml/min bis auf 0.3ml/min und innerhalb 20min auf 0.1ml/min, welche für weitere 10min beibehalten wurden. Der Detektorvolumenstrom blieb dabei konstant bei 1ml/min. Die Auftrennung der Mischung verschiedener Polystyrennanopartikel aus Duke[®] 60, 102, 204 und 300nm erfolgte analog, jedoch mit einer Konzentration von 37µg/100µl in bidestilliertem Wasser mit 10⁻³M KCl und 0,02% (m/V) NaN₃. Zur Auswertung der MALS-Daten kam die Software Astra 4.90 unter Verwendung des Sphären-Modells zum Einsatz. Die geometrischen Größen wurden nach Gleichung 2.2g errechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung dar. Jede Messung wurde mindestens zweifach durchgeführt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 TEM von Gefrierbruchnachbildungen

Einen ersten Eindruck gaben die in **Abbildung 3.3-a** dargestellten TEM-Bilder. Unabhängig von der Poloxamerzugabe zeigten die Partikel eine eindeutige Kugelform. Damit war eine Errechnung der geometrischen Abmessungen auf Basis von Lichtstreuexperimenten möglich. Die beiden dargestellten Partikel hatten Durchmesser von knapp 100nm. Aufgrund der zufälligen Bruchebene und der Betrachtung nur weniger Partikel muß die abgebildete Größe aber nicht repräsentativ sein. Bei der Abbildung des Partikels in Poloxamerlösung deutete sich eine dünne umgebende Hülle an. Diese ließ sich anhand der Bilder allein aber nicht sicher nachweisen.



Abbildung 3.3-a: Gefrierbruchnachbildungen von Nanopartikeln aus 0.5% (m/V) Resomer RG 503 in 0% (m/V) oder 2% Poloxamer 188

3.3.2 Bestimmung der Viskosität sowie Größe anhand PCS

Aufgrund der relativ kurzen Meßdauer wurden die folgenden Vortests mit Hilfe der PCS durchgeführt. Als Basis für die korrekte Angabe von Größen mußte die dynamische Viskosität der verwendeten wäßrigen Lösungen bestimmt werden. Anhand der Daten in **Abbildung 3.3-b** wurde folgende Gleichung des Polynoms zweiten Grades errechnet, um die Abhängigkeit der Viskosität η_{Pol} von der Poloxamerkonzentration c_{Pol} (% m/V) darzustellen:

$$\eta_{Pol} = \eta_{Wasser} + (0.193 \pm 0.004 m Pas) \cdot c_{Pol} + (0.0128 \pm 0.0004 m Pas) \cdot c_{Pol}^2$$
(3.3a)

Die errechneten Viskositäten wurden für alle weiteren PCS-Experimente genutzt. Der Einfluß des Poloxamers war derart hoch, daß z.B. die hydrodynamische Größe in 2% Poloxamer 188 ohne Viskositätskorrektur um den Faktor 1.5 überschätzt würde. Leider finden sich für ähnliche Poloxamerkonzentrationen meist keinerlei Viskositätswerte Suspensionen von (Molpeceres et al., 1996; Chacon et al., 1996; Cauchetier et al., 2003), was einen Literaturvergleich erschwert.



Abbildung 3.3-b: Dynamische Viskosität von wäßrigen Lösungen verschiedener Konzentrationen von Poloxamer 188, Anpassung mit R²=0.999

Unter Verwendung der korrekten Viskositätswerte wurde der Einfluß der Poloxamerzugabe auf die Partikel eines PLGA-Typs untersucht. Die Werte sind in **Abbildung 3.3-c** gegeben.

Für alle Systeme wurden niedrige PI-Werte der PCS zwischen etwa 0.05 und 0.1 gemessen, was auf eine enge Größenverteilung hinwies. Andere parenterale Nanosysteme wie z.B. kommerzielle Fettemulsionen zeigen hingegen Werte von etwa 0.1 bis zu 0.25 (Müller und Schumann, 1996). Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser lagen zwischen etwa 120 und 140nm, was eine intravenöse Applikation erlauben würde. Alle ermittelten Größen

lagen im selbigen Bereich, unabhängig von der Stabilisatorkonzentration. Daher ist davon auszugehen, daß bei den untersuchten Bedingungen Poloxamer keinen maßgeblichen Einfluß auf die Partikelgrößen aufwies. Für die Entstehung der Nanopartikel bei der Herstellung mittels "Solvent deposition" sind Grenzflächenturbulenzen oder ein Ouzo-Effekt beschrieben worden (Quintanar-Guerrero et al., 1997; Ganachaud und Katz,



Abbildung 3.3-c: Hydrodynamische Durchmesser von Nanosphären aus 0.5% (m/V) Resomer RG 503 in wäßriger Lösung von Poloxamer 188 unterschiedlicher Konzentration, Poloxamerzugabe erfolgte vor (initial) oder nach Herstellung (später), zugehörige PI in gestreiften Balken

2005). Unabhängig von der Art der Entstehung verdeutlichen die erhaltenen Größenwerte, daß die Nanopartikelentstehung von Poloxamer nicht beeinflußt wurde.

Je nach Polymer und Herstellungsmethode ist es aber auch manchmal möglich, den Stabilisator erst nach der Herstellung zuzugeben (Stolnik et al., 1994). Dies konnte auch mit den meisten verwendeten Nanosuspensionen durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind ebenfalls in **Abbildung 3.3-c** gegeben. Nur geringe Abweichungen in der Partikelgröße zeigten sich bei beiden Herstellungsprozessen. Da Purasorb PDLG eine initiale Stabilisatorzugabe erforderte, wurde bei allen weiteren Experimenten Poloxamer initial zugegeben.

3.3.3 Charakterisierung mittels SAXS im Vergleich zu PCS

Eine weitere Charakterisierung ausgewählter Nanosuspensionen erfolgte mittels SAXS. In **Abbildung 3.3-d** finden sich beispielhaft zwei Streukurven.

Die PI-Werte der Suspensionen waren gering, wie in Abbildung 3.3-e und Abbildung 3.3-f gegeben. Werte zwischen 0.07 und 0.14 wiesen auf weitgehend eng verteilte Verteilungen hin. Trotzdem waren die Verteilungen breit



Abbildung 3.3-d: SAXS-Streukurven von Nanopartikeln aus 1.0% (m/V) Resomer RG 502 in Wasser ohne (durchgehende Linie) oder mit 2% (m/V) Poloxamer 188 (gestrichelte Linie), ideale Strukturen mit jeweiligem Anstieg (m) nach (Windsor, 1988)

genug, um ein Glätten der Streukurven zu verursachen. Daher sind in **Abbildung 3.3-d** auch keine charakteristischen Minima idealer Kugelsysteme zu erkennen, die eine einfache Größenauswertung ermöglichen (Kratky, 1982).

Zur Auswertung erfolgte zuerst ein Vergleich bei hohen q-Werten. Dieser Bereich kann Informationen zur Partikelstruktur liefern. Alle Streukurven waren für q>0.05nm⁻¹ parallel und entsprachen in etwa dem Verlauf q⁻⁴, was ideale Kugeln beschreibt (Porod, 1982). Dies stützt die TEM-Erkenntnisse in Kapitel 3.3.1. Bei geringen q-Werten hingegen, d.h. sehr kleinen Streuwinkeln, zeigten die Streukurven einen unterschiedlichen Verlauf. Dieser Bereich liefert Informationen zu den größten detektierbaren Strukturen, d.h. zu den Größen der untersuchten Nanopartikel von etwa 120nm. Daher wurden die Partikeldurchmesser in diesem Bereich anhand der Guinieranpassung ermittelt.

Abbildung 3.3-e zeigt einen Vergleich der Durchmesser von PCS und SAXS für die Suspensionen ohne Poloxamer. Vergleichbare Ergebnisse wurden von beiden Methoden registriert. Trotz der komplett unterschiedlichen ausgewerteten Parameter zeigt sich damit eine gute Übereinstimmung, was die Möglichkeit der Größendetektion der PLGA-Nanopartikel speziell mittels SAXS unterstreicht. Da alle Suspensionen unter analogen Bedingungen produziert wurden, sind die geringen Größenunterschiede auf den jeweiligen Polymertyp zurückzuführen. Die einzelnen Typen differierten hinsichtlich der Molmasse, wie bereits in Tabelle 3.2-a gegeben. Weiterhin wiesen sie unterschiedliche Endgruppen auf: Das "Н" Ende am der Resomerbeschreibung markiert die hydrophileren Substanzen mit einer endständigen COOH-Gruppe.



Abbildung 3.3-e: Hydrodynamische (PCS) und geometrische (SAXS) Durchmesser von 1.0% (m/V) PLGA-Nanosuspensionen ohne Poloxamer 188 (zugehörige PI in gestreiften Balken, Pura PDLG setzte Poloxamerzugabe voraus)



Abbildung 3.3-f: Hydrodynamische (PCS) und geometrische (SAXS) Durchmesser von 1.0% (m/V) PLGA-Nanosuspensionen mit 2% (m/V) Poloxamer 188 (zugehörige PI in gestreiften Balken)

Die Ergebnisse der Poloxamer enthaltenden Suspensionen sind in Abbildung 3.3-f gegeben. Wiederum wurden vergleichbare Größen von beiden Methoden registriert. Im Vergleich zu SAXS resultierten bei der PCS meist geringfügig höhere Werte. Eine mögliche Erklärung wäre eine Hydrathülle, die Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel, nicht aber auf den Gyrationsradius hat. Im Vergleich zu den Werten ohne Poloxamer in **Abbildung 3.3-e** zeigen sich geringfügige Größenzunahmen. Beispielsweise für Resomer RG 503 zeigten sich Durchmesserunterschiede von 7.5nm für die PCS und 8.0nm für SAXS. Aufgrund der Vermessung von jeweils nur einer Beispielsuspension genügen diese Werte nicht für eine Bestimmung der Dicke einer eventuellen Poloxamerhülle und sind daher nur als Indiz zu werten.

3.3.4 Charakterisierung mittels aF-FFF/MALS im Vergleich zu PCS



Abbildung 3.3-g: Elugramme der aF-FFF/MALS von Nanopartikeln aus 0.25% (m/V) Resomer in 0.25% (m/V) Poloxamer 188: Linien zeigen die Streulichtintensitäten bei 90°, zugehörige Punkte die geometrischen Radien, gestrichelte waagerechte Linien zeigen die mittleren hydrodynamischen Größen anhand der PCS

In Abbildung 3.3-g sind die Elugramme der aF-FFF-Auftrennungen einiger Nanosuspensionen dargestellt. Die zu höheren Zeiten ansteigenden Radienwerte zeigen, daß entsprechend der Fluß-FFF-Theorie (Schure et al., 2000) kleinere Partikel zuerst aus dem Kanal eluierten, während bei höheren Zeiten Partikelradien bis knapp 200nm detektiert wurden. Abhängig vom Polymertyp zeigten sich Peaks unterschiedlicher Elutionszeiten und -breiten. Die Resomere 502H/503H zeigten Streulichtmaxima bereits bei etwa 13-15min mit einem ausgeprägten Peak tailing. Die Resomere 502/503 hingegen zeigten breite unsymmetrische Peaks mit Maxima bei etwa 22-25min. Alle Proben wiesen damit keine strenge Monomodalität auf.

Die mittleren Durchmesser anhand Fluß-FFF/MALS und PCS sind im Vergleich in **Abbildung 3.3-h** wiedergegeben. Für beide Methoden resultierten vergleichbare Größen. Die etwas größeren Abweichungen der Werte von 502H und insbesondere 503H können mit deren breiteren Größenverteilungen erklärt werden. Diese zeigten sich anhand der höheren PI-Werte von etwa 0.1 bis 0.3, wohingegen für die beiden anderen Suspensionen PI-Werte unter 0.1 erhalten wurden.
In Abbildung 3.3-g sind zusätzlich die mittleren hydrodynamischen Radien als horizontale Linien eingezeichnet. Das erlaubt das Erkennen des FFF/MALS-Größenbereichs, der mittels PCS hauptsächlich detektiert wurde. Dies ist von Vorteil, da die Aussagekraft der PCS bei komplexen Größenmischungen begrenzt ist (Glatter et al., 1991). Wie zu erkennen ist. wurden die



Abbildung 3.3-h: Hydrodynamische (PCS) und geometrische (aF-FFF/MALS) Durchmesser, zugehörige PI-Werte in gestreiften Balken (Suspensionen aus **Abbildung 3.3-g**)

jeweiligen PCS-Mittelwerte hauptsächlich durch die Partikelfraktion mit der jeweils intensivsten MALS-Lichtstreuung bestimmt.

Die Partikelgrößenverteilungen konnten anhand beider Techniken errechnet werden. Die durch PCS ermittelten Daten finden sich in **Abbildung 3.3-i**. Breite Peaks zwischen etwa 20 bis über 400nm resultierten. Im Gegensatz dazu zeigte der Graph anhand FFF/MALS in **Abbildung 3.3-j** die einzelnen Partikelfraktion viel schärfer und mit einer höheren Qualität. Dies erklärt sich anhand der jeweiligen Streulichtanalyse der zuvor aufgetrennten Fraktionen. Für die Suspensionen 502 und 503 deuteten sich anhand der kleinen zusätzlichen Peaks bei geringeren Radien leicht bimodale Verteilungen an.





Abbildung 3.3-i: Differentielle Größenverteilungen (intensitätsgewichtet) der hydrodynamischen Durchmesser anhand PCS (Suspensionen aus Abbildung 3.3-g)

Abbildung 3.3-j: Differentielle Größenverteilungen (massengewichtet) der geometrischen Radien anhand aF-FFF/MALS (Suspensionen aus Abbildung 3.3-g)

Um die Funktionsfähigkeit des Gerätes zu testen und die Trennbedingungen zu optimieren, kommen meist Standard-Latexdispersionen zum Einsatz (Barman, 2000). In

Abbildung 3.3-k ist das Elugramm der durchgeführten Trennung eines Gemisches von 60-300nm Durchmesser abgebildet. Deutlich ist eine Abstufung der einzelnen Größen zu erkennen, die eine Zuordnung der einzelnen Peaks möglich macht. In **Abbildung 3.3-l** ist eine differentielle Darstellung der Verteilung zu sehen. Die einzelnen scharfen Peaks verdeutlichen die Monomodalität der Einzelkomponenten und die Möglichkeit der Charakterisierung polymodaler Proben mittels aF-FFF/MALS. Es zeigt sich hier die gute Übereinstimmung der einzelnen Peaks mit den Herstellervorgaben.



Abbildung 3.3-k: Elugramm einer Mischung Ausschlichener Polystyrennanopartikel (Duke[®] 60, 102, 1204, 300nm), geometrische Radien (graue Punkte) und Clichtstreuintensität 90°-Detektor (schwarze Peaks), aus (Augsten und Mäder, 2006a)



Abbildung 3.3-1: Geometrische Radien der Polystyrenstandards aus Abbildung 3.3-k in differenzieller Darstellung



Abbildung 3.3-m: Korrelation von hydrodynamischem (PCS) und geometrischem (aF-FFF/MALS) Durchmesser der PLGA-Nanosuspensionen; Daten aus **Abbildung 3.3-o** (Res 503(2)), von Suspensionen aus 0.5% (m/V) Resomer 503 in 0.25% (m/V) Poloxamer 188 (Res 503(3)) und aus **Abbildung 3.3-g** (alle anderen Suspensionen). Die Daten der Latices wurden (Augsten und Mäder, 2006a) entnommen.

In Abbildung 3.3-m sind zum Methodenvergleich alle Größenwerte der PLGA-Nanosuspensionen sowie Latices aufgetragen. Bei beiden Graphen zeigt sich die Übereinstimmung von aF-FFF/MALS und den PCS- bzw. Referenzwerten. Die lineare Regression resultiert in folgenden Gleichungen:

PLGA-Nanopartikel:	$d_{FFF/MALS} = (1.03 \pm 0.02) \cdot d_{PCS}$	mit R ² =0.835	(3.3b)
Latex-Nanopartikel:	$d_{FFF/MALS} = (1.03 \pm 0.01) \cdot d_{Vorgabe}$	mit R ² =0.999	(3.3c)

Der niedrigere R²-Wert der PLGA-Partikel war durch die breiteren Größenverteilungen einiger Suspensionen bedingt. Beispielsweise zeigte Resomer RG 503H relativ breit verteilte Suspensionen mit PI-Werten von 0.12 bis 0.16. Die Mittelwerte lagen damit etwas weiter von der Regressionsgeraden entfernt. Im Gegensatz hierzu zeigte Resomer RG 502 fast monomodale Proben mit PI-Werten von 0.06 bis 0.08. Die Abweichungen von der Geraden waren damit gering. Im Vergleich zeigten die Latices als monomodale Referenzsysteme eine exakte Übereinstimmung der Werte beider Methoden mit R²=0.999. Eine breitere Verteilung führt damit vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Meßprinzipien zu stärker abweichenden Mittelwerten beider Methoden.

Alternativ sind die Größenwerte aller PLGA-Nanosphären in Abbildung 3.3-n Bland-Altman-Plot als Diese dargestellt. Darstellung kann zum Vergleich verschiedener Techniken genutzt werden und erlaubt ein einfaches Erkennen der Abhängigkeit der Differenz vom Absolutwert (Bland und Altman, 1995 und



Abbildung 3.3-n: Bland-Altman-Plot der Daten aus Abbildung 3.3-m, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) wurden anhand der PLGA-Werte errechnet, Irrtumswahrscheinlichkeit=5%

1999). Der Ordinatenwertmittelwert (MW) von 6.1nm lag knapp oberhalb des Idealwertes von 0nm. Dies deutete auf geringfügig höhere Werte der aF-FFF/MALS hin. Ein analoger Effekt zeigte sich bereits im Anstieg von 1.03 der Regressionsgleichungen 3.3b und 3.3c. Die Standardabweichung (SD) betrug 16.1nm, was in MW±1.96SD-Linien von ±31.6nm resultierte. Beim Vergleich niedriger und hoher mittlerer Durchmesser zeigte sich im untersuchten Bereich keine erkennbare Zu- oder Abnahme der Differenzen. Beide Methoden sind demnach im gesamten untersuchten Größenbereich einsetzbar.

Einschränkend sei für diesen gesamten Methodenvergleich erwähnt, daß ausschließlich homogen strukturierte Sphären untersucht wurden. Diese Erkenntnisse können nicht einfach auf andere Systeme wie z.B. Partikel aus sich unterscheidendem Kern und Hülle übertragen werden. Bei der Charakterisierung von z.B. Liposomen oder Nanokapseln mit Kern-Hülle-Struktur mittels aF-FFF/MALS, SAXS und PCS sind größere Abweichungen der erhaltenen Mittelwerte zu erwarten. Dies ist bedingt durch die große äußere Abmessung, aber geringe Kontrastdifferenz zu Wasser. Um den Größeneinfluß des Poloxamers auf die aF-FFF/MALS-Werte zu bestimmen, wurden analog zu den SAXS und PCS-Messungen in Kapitel 3.3.3 Nanopartikel mit sowie ohne Poloxamer untersucht. Die zugehörigen Elugramme sind in **Abbildung 3.3-o** gegeben.

Trotz gleicher Trennbedingungen und gleichem Polymer eluierten die Partikel mit Poloxamer weitaus schneller aus dem Kanal. Dies kann anhand des sterischen Effektes des Stabilisators erklärt werden. Im Kanal werden die Partikel mit dem Ouerfluß in Richtung der Membran transportiert. Einerseits könnte eine Poloxamerhülle der Partikel oder auch eine



Abbildung 3.3-o: Elugramme der aF-FFF/MALS von Nanopartikeln aus 0.5% (m/V) Resomer 503 in 0% oder 2% (m/V) Poloxamer 188

Poloxamerbeschichtung der Membran eine starke Annäherung der Partikel an die Membran verhindern. Hierdurch würden sich die Partikel in einer schnelleren Kanalströmung befinden und damit früher eluieren. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser betrugen 94.5±1.9nm bei den Suspensionen ohne und 104.2±1.6nm bei den Suspensionen mit Poloxamer. Die zugehörigen geometrischen Durchmesser anhand aF-FFF/MALS betrugen 112.5±2.7nm ohne und 123.5±0.9nm mit Poloxamer. Die Größe kann demnach nicht für die unterschiedliche Elution verantwortlich gemacht werden. Als Poloxamer-bedingte Differenz ergaben sich damit 11.0±2.9nm für die aF-FFF/MALS und 9.8±2.5nm für die PCS. Diese Werte ähnelten der bereits in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Differenz. Damit läßt sich schlußfolgern, daß zumindest ein Teil des Poloxamers resistent gegenüber dem Spüleffekt während der aF-FFF-Trennung war und auf der Oberfläche der Partikel verblieb. Bei Nanokapseln wurde eine Radienzunahme von 17±6nm bedingt durch die Hülle von Poloxamer 188 bestimmt (Rübe et al., 2005). Dieser vergleichsweise höhere Wert läßt sich durch die unterschiedlichen Partikelgrößen, Kernmaterialien sowie Poloxamerkonzentrationen und angewendeten Größencharakterisierungsmethoden begründen.

3.4 Zusammenfassung

Nanosuspensionen aus PLGA wurden unter konstanten Bedingungen mit Hilfe der "Solvent deposition"-Methode hergestellt. Es resultierten gleichmäßig strukturierte sphärische Partikel, was durch TEM und SAXS bestätigt wurde. Dies ermöglichte die Errechnung korrekter geometrischer Dimensionen mit Hilfe der statischen Licht-/Röntgenstreutechniken. Die dynamischen Viskositäten unterschiedlicher Poloxamerkonzentrationen wurden bestimmt, was eine korrekte Errechnung der hydrodynamischen Größe mit Hilfe der PCS ermöglichte. Die PCS wurde aufgrund der relativ geringen Meß- und Auswertzeiten sowie weitverbreiteten Anwendung als Referenz genutzt.

Die aufwendigere Charakterisierung mittels SAXS wurde bei sehr geringen Detektionswinkeln mit Hilfe von intensiver Synchrotronstrahlung durchgeführt. Mit Hilfe der Röntgenstrahlung konnten auch Strukturen im unteren Nanometerbereich aufgelöst werden. Die anhand der Guinier-Region erhaltenen Größen zeigten Übereinstimmung mit den PCS-Werten.

Die Trennung mittels aF-FFF und nachfolgender MALS-Detektion wurde innerhalb von etwa 30min mit kommerziell erhältlichem Equipment durchgeführt. Die Elugramme erlaubten eine einfache Bestimmung der maximalen Partikelgröße, was speziell bei intravenös zu applizierenden Systemen von Vorteil ist. Weiterhin wurden aufgrund der Auftrennung Größenverteilungen einer sehr hohen Qualität erhalten. Die errechneten Mittelwerte zeigten eine gute Korrelation mit den PCS-Werten, insbesondere für monomodale Systeme wie Standardlatices. Nur bei PLGA-Nanosuspensionen mit breiteren Größenverteilungen wurden mit beiden Methoden stärker abweichende Mittelwerte errechnet. Speziell bei derartigen Proben ist daher eine genaue Angabe der Größenverteilung notwendig. Im Vergleich von Suspensionen mit 2% (m/V) bzw. ohne Poloxamer 188 zeigten sich Größenunterschiede. Für aF-FFF/MALS wurden Differenzen des Durchmessers von 11.0±2.9nm und für PCS von 9.8±2.5nm errechnet. Für SAXS wurde ein ähnlicher Wert erhalten. Diese zusätzliche Poloxamerschicht konnte nicht durch intensives Spülen während der aF-FFF-Trennung entfernt werden.

Damit hat sich speziell die aF-FFF/MALS als vorteilhafte Methode zur Charakterisierung von PLGA-Nanosuspensionen erwiesen. Durch die Separierung der einzelnen Bestandteile vor der Größenanalyse kann sie speziell bei Proben breiter Größenverteilungen als Erweiterung der bislang weitgehend genutzten PCS eingesetzt werden. Im Bereich der nanoskaligen pharmazeutischen Systeme findet sich bislang nur sehr wenig Literatur zu dieser Methodenkombination. Speziell in diesem Forschungsbereich ergeben sich damit neue Möglichkeiten.

4 <u>Charakterisierung unterschiedlicher Typen von</u> <u>κ-Carrageenan</u>

4.1 Einleitung

Carrageenan ist der Überbegriff einer Familie von wasserlöslichen sauren Polysacchariden aus Rotalgen, welche hauptsächlich den Gattungen Gigartina, Chondrus, Iridaea oder Eucheuma angehören. Diese Algen nutzen die Substanzen zur osmotischen Regulation und als extrazelluläre Matrix für eine partiell verformbare äußere Gestalt. Carragennane werden durch Kochen der gewaschenen Algen in alkalischer Lösung gewonnen. Hierbei werden teilweise erst Carrageenanvorstufen zum Endprodukt umgewandelt. Alle Carrageenane bestehen aus linear verknüpften Galaktoseeinheiten mit einem Sulfatierungsgrad bei kommerziellen Produkten von etwa 22-38%. Die einzelnen Typen unterschieden sich hinsichtlich ihres Lösungs- und Gelierverhaltens voneinander. Sie werden durch die Angabe von zusätzlichen griechischen Buchstaben unterschieden. Wie in Abbildung 4.1-a dargestellt ist, besteht κ -Carrageenan aus sich wiederholenden Monomeren aus D-Galaktose-4-sulfat (G4S) und zumeist 3,6-Anhydro-D-galaktose (DA). (Van de Velde und De Ruiter, 2005)



Abbildung 4.1-a: Chemische Struktur von κ-Carrageenan, Monomere sind D-Galaktose-4-sulfat (G4S) und 3,6-Anhydro-D-galaktose (DA)

Obwohl pharmakologische Effekte von Carrageenanen bekannt sind (Wagner, 1999), werden sie in der Lebensmittelindustrie seit Jahren erfolgreich als Gelbildner bzw. Viskositätserhöher und Stabilisator eingesetzt. Sie finden sich durch die ionische Wechselwirkung mit Casein meist in Milchprodukten wie z.B. in Schokoladenmilch und Joghurt, aber auch in Marmeladen, Wurst und gefrorenen Desserts (Van de Velde und De Ruiter, 2005). In der Pharmazie ist Carrageenan auf der Basis einer USP-Monographie (USP 31, 2008) einsetzbar. Intensiv erforscht werden z.B. der Einsatz bei der Herstellung von bioadhäsiven Arzneiformen (Garcia und Ghaly, 2001), Tabletten (Schmidt et al., 2003) oder Gelen (Hoffman, 2002).

Bei dieser Substanzklasse handelt es sich hinsichtlich der Molmasse um meist stark polydisperse Systeme, deren mittlere Molmasse zudem chargenabhängig schwankt (Van de Velde und De Ruiter, 2005). Die Molmasse ist jedoch ein Parameter, der das rheologische Verhalten der Carrageenane und damit deren Anwendungsmöglichkeiten beeinflußt. Außerdem finden sich Hinweise, wonach niedermolekulares Carrageenan gefährliche gastrointestinale Effekte, d.h. hämorrhaigsche Dickdarmulcerationen, hervorrufen kann und ein Einfluß auf das Immunsystem hat (Tobacman, 2001; Opinion of the scientific committee on food on carrageenan, 2003). Eine genaue Molmassencharakterisierung der Produkte vor einem Einsatz ist demnach von Vorteil.

Zumeist kommt hierzu GPC/MALS zum Einsatz (White, 1999). Diese Methode kann Probleme wie Probenadsorption und Probendegradation durch hohe Scherkräfte innerhalb der Säule zur Folge haben, auch sehr hochmolekulare Anteile können bei dieser Bestimmung verloren gehen (Van de Velde und De Ruiter, 2005). Daher wurde als Alternative bereits erfolgreich die Fluß-FFF eingesetzt (Viebke und Williams, 2000). Aufgrund der Größe der Moleküle ist zur korrekten Molmassen- und Radienbestimmung ein MALS-Detektor mit einer hohen Zahl an Detektionswinkeln zu empfehlen (Wittgren et al., 1998).

Die nachfolgende Studie beschreibt speziell die Charakterisierung mit Hilfe von aF-FFF/MALS/RI sowie eine chemische Analyse mit Hilfe von 1H und 13C Kernspinresonanzspektroskopie (NMR). Die untersuchten Substanzen wurden als Pelletierhilfsstoff in der Feuchtextrusion und Sphäronisation im Rahmen der Dissertation von Markus Thommes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingesetzt (Thommes, 2006).

4.2 <u>Materialien und Methoden</u>

Bezeichnung	Gelcarin GP	Gelcarin GP	Satiagel ME4	Satiagel	Genugel X-
	911NF	812NF		CT27	930-03
Firma	FMC,	FMC,	Degussa,	Degussa,	CPCelco,
	Philadelphia,	Philadelphia,	Hamburg,	Hamburg,	Lielle Sk.,
	USA	USA	Deutschland	Deutschland	Dänemark
Charge	40701170 (1)	10704040	20042823	20032555	5180004
Wassergehalt*	12.1%	11.1%	10.7%	10.5%	11.2%

Tabelle 4.2-a: Verwendete κ-Carrageenane mit jeweiligem Wassergehalt (*m/m, Karl-Fischer-Titration)

Die in Tabelle 4.2-a gegebenen ĸ-Carrageenane wurden untersucht. Die aF-FFF-Trennung erfolgte in 0.1mol/l NaCl in bidestilliertem Wasser mit 0.02% NaN₃ (m/V), welches 100nm-filtriert wurde (VVLP, Millipore). Die Apparatur ist in Abbildung 2.1-d gegeben. Nach einer großen Anzahl von Vorversuchen, welche der Optimierung der Vorbereitungstemperatur, Probenkonzentration und Separationsmethode dienten, wurden folgende Werte beibehalten: Die Proben wurden eine Stunde bei 80°C aufbewahrt und danach noch mindestens 12h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Detektorvolumenstrom betrug die gesamte Zeit über 1ml/min. Nach dreiminütiger Gleichgewichtseinstellung wurde während der zweiminütigen Injektionsphase und nachträglich 1min fokussiert. Hierbei wurden 100µl einer 0.1%igen (m/V) Lösung mit 0.2ml/min injiziert. Ein Zweistufengradient war zur Auftrennung nötig. Der Querflußvolumenstrom fiel hierbei innerhalb von 5min von 1ml/min auf 0.5ml/min sowie innerhalb weiterer 15min auf 0ml/min. Jede Bestimmung erfolgte dreifach. Das Brechungsindexinkrement von 0.126ml/g wurde der Literatur entnommen (Wittgren et al., 1998). Die genutzte Membran aus regenerierter Cellulose hatte eine Ausschlußgrenze von 10kDa (Microdyn Nadir C010F). Die Molmassenbestimmung erfolgte nach Debye mit einer Detektor-Fitanpassung 2.Ordnung, was sich vorteilhafterweise für niedrige und hohe Molmassen als geeignet erwies. Zur Errechnung von D_m wurde die Zimm-Gleichung bei Molmassen von 300-650kDa genutzt.

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurde Gelcarin 911 der Charge 40701170 von FMC genutzt. Je etwa 10mg/ml Probe wurden in D₂O (99.98%, Chemotrade Leipzig, Charge 117A62) hinsichtlich 1H (500MHz) und 20mg/ml hinsichtlich 13C NMR (125MHz) mit Hilfe eines Varian Inova 500 (Varian Inc., USA) vermessen. Eine Erwärmung der Probe auf 75°C zur Verflüssigung war während des Einfüllens und bei der Messung nötig.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR

1H NMR wird wegen der hohen Spezifität der chemischen Verschiebung häufig zur Charakterisierung von Carragenanen angewendet (Van de Velde und De Ruiter, 2005). Es eignet sich auch in Kombination mit 13C NMR, um die einzelnen Carrageenantypen voneinander zu unterscheiden (Van de Velde et al., 2002).

Das 1H NMR-Spektrum in Abbildung 4.3-a stellt sicher, daß sich eindeutig es um κ-Carrageenan handelte. Eine Zuweisung der einzelnen Signale anhand von Spektren der entsprechenden Oligosaccharide (Van de Velde et al., 2002;



Abbildung 4.3-a: 1H NMR-Spektrum von Gelcarin 911



Abbildung 4.3-b: 13C NMR-Spektrum von Gelcarin 911

Knutsen und Grasdalen, 1992) ist nicht eindeutig möglich, da für das Polysaccharid verbreiterte und überlappende Signale resultierten. Für das Polysaccharid finden sich in der Literatur nur knapp beschriebene Spektren (Van de Velde et al., 2002). Aus dem α -anomerischen Wasserstoffatom, dessen Signal sich relativ isoliert bei hohen chemischen Verschiebungen befindet, kann auf den Typ sowie auf eventuelle Verunreinigungen mit anderen Carrageenanen geschlossen werden. Im gegebenen Spektrum bei etwa 5.5ppm befindet sich das Signal des κ -Carrageenans. Verunreinigt ist es mit geringen Mengen ι (lota)-Carrageenan. Als Hinweis hierauf findet sich ein weiterer kleiner Peak bei etwa 5.75ppm.

Das 13C NMR-Spektrum in Abbildung 4.3-b weist eine schlechte Qualität auf, vermutlich aufgrund der geringen Beweglichkeit der Moleküle. Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte der chemischen Verschiebung lassen sich jedoch anhand der intensivsten Signale wiederfinden. Die Daten sind der nachfolgenden Tabelle 4.3-a zu

entnehmen. Es waren aber noch weitere Signale niedriger Intensität vorhanden, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen.

	Monomer G4S		Monomer DA		
	Literatur*	Messung	Literatur*	Messung	
C-1	102.5	102.6	95.3	95.3	
C-2	69.6	69.6	69.9	70.0	
C-3	78.9	79.0	79.2	79.3	
C-4	74.1	74.2	78.3	78.5	
C-5	74.8	74.9	76.8	76.9	
C-6	61.3	61.4	69.5	69.6	

 Tabelle 4.3-a:
 13C NMR chemische Verschiebungen von Gelcarin 911 im Vergleich zu Literaturwerten* aus

 (Van de Velde et al., 2002)

4.3.2 Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI

In **Abbildung 4.3-c** sind die Elutionsdiagramme der untersuchten κ -Carrageenane abgebildet. Molmassen im Bereich von unter 10⁵Da bis über 10⁷ Da wurden bei allen Proben aufgefunden, was bereits auf stark polydisperse Systeme hindeutet. Unerwünschte kleine Moleküle mit Molmassen unterhalb 50kDa (Opinion of the scientific committee on food on carrageenan, 2003) wurden im auswertbaren Bereich nicht detektiert. Jedoch lagen die in **Abbildung 4.3-c** gegebenen Gesamtwiederfindungsraten im Bereich zwischen etwa 80% und 100%. Es ist daher zu vermuten, daß ein geringer Probenanteil mit Molmassen unter etwa 10kDa die Membranporen passieren konnte und damit noch höhere Werte verhinderte.

Bereits auf den ersten Blick ließen sich alle Elugramme in zwei Teilbereiche untergliedern. Bei geringen Zeiten, meist etwa 10-22min, zeigten die Graphen gleichmäßig ansteigende Molmassen unterhalb etwa 10⁶Da. Bei höheren Zeiten stiegen die Molmassen bis über 10⁷Da rapide an. Dieser rapide ansteigende Teil zeigte etwas stärker verrauschte Molmassenwerte. Eine Erklärung hierfür ist bereits beschrieben (Cölfen und Antonietti, 2000). Bei sehr langkettigen Molekülen kann es trotz geringer Konzentrationen zu einer Überlagerung kommen, da sich die einzelnen Ketten allein aufgrund ihrer Länge unweigerlich überlappen und damit vom Laser des Detektors nicht einzeln aufgelöst werden können.



Abbildung 4.3-c: Elugramme (durchgehende Linien zeigen die Konzentration und Punkte die zugehörigen Molmassen) und Wiederfindungsraten des RI-Detektors der κ-Carrageenane

Die errechneten anzahlgemittelten Molmassen (M_N) finden sich in **Abbildung 4.3-d**. Alle Werte lagen im Bereich zwischen etwa 200 und 400kDa. M_N basierte vorrangig auf den Werten der kleineren und mittleren Probenmoleküle. Die Werte konnten daher mit geringen Standardabweichungen bestimmt werden und eignen sich gut für einen Vergleich der einzelnen Carrageenane. Gelcarin 911 lag beispielsweise im unteren Bereich und Gelcain 812 im oberen Bereich der ermittelten Mittelwerte. Die Unterschiede gingen einher mit dem jeweiligen Elutionsprofil bei etwa 20-25min, welches die höheren Molmassen charakterisiert. Die gewichtsgemittelten Molmassen (M_W) in **Abbildung 4.3-e** lagen gegenüber den jeweiligen M_N weitaus höher und zeigten höhere Standardabweichungen. Dies war auf die verrauschten Molmassen bei hohen Elutionszeiten zurückzuführen. Diese hohen Molmassen wurden bei der Berechung von M_W stärker gewichtet. Andere Angaben für kommerzielle Produkte zeigen etwa 400-600kDa (Van de Velde und De Ruiter, 2005). Vermutlich wurden bei den früheren Bestimmungen diese hohen Molmassen nicht ausreichend miterfaßt. Dies stellt z.B. für die GPC ein bekanntes Problem dar, wo durch das Säulenmaterial große Partikel zurückgehalten werden können.

8000

6000

4000

2000

0

Gelc.911



Abbildung 4.3-d: Anzahlgemittelte Molmassen (M_N) aller Carrageenane



Abbildung 4.3-e: Gewichtsgemittelte Molmassen (M_w) aller Carrageenane

Gelc.812 Satia.ME4 Sati.CT27 Genu.X930



Abbildung 4.3-f: Polydispersitäten (PDI = M_W / M_N) aller Carrageenane

Abbildung 4.3-g: Fraktale Dimensionen des Massenfraktals (D_m) aller Carrageenane

Die M_W -Werte wurden zur Berechnung der Polydispersitäten (PDI) in Abbildung 4.3-f genutzt. Daher waren diese ebenfalls mit hohen Meßunsicherheiten behaftet. Es wurden für alle Substanzen außergewöhnlich hohe Werte erhalten, die auf stark polydisperse Proben rückschließen lassen.

Aus den Lichtstreudaten ließen sich auch Gyrationsradien und mit deren Hilfe die fraktalen Dimensionen in **Abbildung 4.3-g** errechnen. Die Werte lagen etwa im Bereich zwischen 1.5 für ein gut gelöstes und 2.0 für ein schlecht gelöstes Polymer in Knäuelform, was den Werten anderer Autoren (Wittgren et al., 1998) nicht widerspricht.

In den differentiellen Darstellungen in Abbildung 4.3-h sind die Anpassungen logarithmischer Normalverteilungen an die erhaltenen Molmassen aller Carrageenane Die gezeigt. Verteilungen folgten größtenteils dem Verlauf der gaußschen Kurve. Als Werte für das Bestimmtheitsmaß R² wurden 0.97-0.99 erhalten. Nur Satiagel **CT27** höheren wies durch seine zu Molmassen verschobene und damit unsymmetrische Verteilung mit 0.93 einen auffallend geringen Wert auf. Es folgte damit der angepaßten Verteilungsfunktion nur bedingt. Vermutlich war dies auch der Grund für seinen auffallend hohen M_W- und PDI-Wert. Gelcarin 911 fiel durch seinen hohen Anteil geringer Molmassen auf. Dies deckte sich mit den erhaltenen Werten seiner mittleren Molmasse.

Die Graphen in Abbildung 4.3-h



Abbildung 4.3-h: Differentielle Darstellungen der Molmassen aller Carrageenane mit jeweiliger Anpassung der logarithmische Normalverteilung

verdeutlichen weiterhin, daß Molmassen oberhalb etwa 10⁶Da einen erheblichen Anteil in der Verteilung aller Carrageenane ausmachten. Sie sollten daher nicht vernachlässigt werden. Mit Hilfe des genutzten Bestimmungsverfahrens konnten sie sicher detektiert werden.

4.4 Zusammenfassung

Unterschiede zwischen den verschiedenen Typen an κ -Carrageenanen zeigten sich hinsichtlich des Elutionsverhaltens wie auch der erhaltenen mittleren Molmassen, die mit Hilfe des MALS-Detektors erfolgreich bestimmt wurden. Weiterhin wurden ungewöhnliche hochmolekulare Probenbestandteile gefunden. Diese hatten trotz ihres geringen Anteils starken Einfluß auf M_W. Es wurden damit auch hohe PDI-Werte erhalten, die die vorliegenden Substanzen als stark polydispers charakterisieren. Die Molmassen folgten mit Ausnahme eines Carrageenans eindeutig logarithmischen Normalverteilungen.

5 <u>Charakterisierung unterschiedlicher Typen und Komplexe</u> von HES

5.1 <u>Einleitung</u>

Hydroxyethylstärke wird hauptsächlich als kolloidales Volumenersatzmittel eingesetzt. Das Polymer hat sich gegenüber dem früher verwendeten Dextran in den letzten Jahren als Plasmaexpander der ersten Wahl durchgesetzt. Neben dem pharmazeutischen Einsatz finden sich nur wenige Anwendungsbeispiele, wie z.B. als Bindemittel in der Papierindustrie (Iwamuro, 1995).



Abbildung 5.1-a: Chemische Struktur von HES, abgebildete Monomere von $\alpha(1\rightarrow 4)$ -verknüpfter D-Anhydroglucose, deren OH-Gruppen in Position 2 teilweise hydroxyethyliert sind (geringfügig auch in Position 3 oder 6 mgl.)

Bei HES handelt es sich um $\alpha(1\rightarrow 4)$ -verknüpfte Glucoseeinheiten, deren OH-Gruppen teilweise hydroxyethyliert sind. Die Struktur ist in **Abbildung 5.1-a** zu erkennen. Das Molekül bietet eine Vielzahl von Variationsmöglichkeiten und damit auch unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften. Einerseits bestimmt die Molmasse die Geschwindigkeit der renalen Elimination. Andererseits kann die Breite der Molmassenverteilung ebenfalls Einfluß haben und wird in Form des Parameters M_W/M_N (PDI) angegeben. Dieser ist zugleich ein Maß für die Herstellungsgüte, er sollte möglichst geringe Beträge aufweisen. Die Angabe der mittleren Molmasse allein genügt demnach nicht als Qualitätskriterium (Kulicke und Heinze, 2006). Der M_N-Wert bestimmt die onkotischen Eigenschaften und damit das Wasserbindungsvermögen.

Der Substitutionsgrad DS = degree of substitution gibt das Verhältnis mono- und mehrfach substituierter Glucoseeinheiten zur Gesamtzahl der Monomeren an und kann maximal 1.0 betragen. Praktisch liegt er aufgrund der notwendig guten Löslichkeit meist nur bei 0.4-0.7. Bei höheren Werten steigt aufgrund der geringen Löslichkeit die Gefahr der Akkumulation in den Körperorganen und damit auch die Toxizität (Boldt, 2004).

Die Stärken können an C2, C3 und C6 mit einer Hydroxyethylgruppe substituiert werden. Meist wird der PS-Wert = pattern of substitution angegeben, welcher das Verhältnis von C2 zu C6 beschreibt. Eine C2-Substitution verhindert gewünschterweise sterisch den Angriff der Amylase, während dies bei C6 kaum der Fall ist. Der Wert von 8 wird als Grenzwert betrachtet (Serumwerk Bernburg, 2003).

Das Substitutionsmuster kann teilweise mit 1H NMR und ebenfalls, aufwendiger, mit hochauflösender 13C-NMR quantitativ erfaßt werden (Liu und Xu, 2002; Kulicke et al., 1993). Da es sich bei den verwendeten Proben um pharmazeutisch einsetzbare und geprüfte Substanzen handelte, wird sich nachfolgend auf 1H NMR beschränkt.

Um die Molmasse bzw. deren Verteilung zu charakterisieren, kam in der Vergangenheit zumeist GPC/MALS zum Einsatz (Kulicke et al., 1993). Als Alternative wurde bereits erfolgreich Fluß-FFF/MALS eingesetzt (Wittgren et al., 2002), welche insbesondere für breit verteilte Polymere hoher Molmasse eine gute Trennleistung zeigt (Schimpf, 2000a). Nachfolgend ist die Charakterisierung von unterschiedlichen Typen reiner HES sowie von bislang nicht publizierten HES enthaltenden Komplexen beschrieben. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe der aF-FFF sowie eine nachfolgende Analyse mittels MALS/RI. Ein Teil der Daten wurde bereits veröffentlicht (Augsten und Mäder, 2007b; Augsten und Mäder, 2007c). Die Daten der untersuchten Komplexe werden hier aufgrund der Vorgaben der herstellenden Firma nur teilweise sowie ohne genaue Produktbezeichnung wiedergegeben. Sie werden daher auch ohne Vergleich zur Literatur interpretiert.

5.2 <u>Materialien und Methoden</u>

Kürzel	HES 70	HES 130	HES 200	HES-K1^+	$HES-K2^+$
Bezeichnung	HES 70/0.5	HES 130/0.42	HES 200/0.5	-	-
Firma	Serumwerk	Serumwerk	Serumwerk	-	-
	Bernburg AG	Bernburg AG	Bernburg AG		
Charge	0024	0192	0473	-	-
Wassergehalt*	8.4%	8.9%	8.2%	-	-

Tabelle 5.2-a: Verwendete HES bzw. Lösungen der HES-Komplexe mit jeweiligem Wassergehalt, ⁺Daten der Komplexe nicht veröffentlicht, *m/m mittels Thermogravimetrie

Die in Tabelle 5.2-a gegebenen Typen von HES bzw. HES-Komplexen wurden untersucht. Bei der Herstellerbezeichnung der reinen HES beschreibt der erste Wert die mittlere Molmasse in kDa und der zweite die molare Substitution (MS). Letzterer gibt die durchschnittliche Anzahl der Hydroxyethylgruppen je Glucosemolekül wieder. Die aF-FFF-Trennung von HES erfolgte in bidestilliertem Wasser mit 0.02% (m/V) NaN₃, welches vor Verwendung 100nm-filtriert wurde (VVLP, Millipore). 100µl einer Lösung, die 200µg Substanz enthielt, wurden mit 0.2ml/min in den Kanal mit einer Spacerhöhe von 350µm injiziert (Apparatur in Abbildung 2.1-d). Der Detektorvolumenstrom blieb konstant bei 1ml/min, während der Querflußvolumenstrom innerhalb 20min von 2ml/min auf 0ml/min fiel. Fokussiert wurde während der 2minütigen Injektionsphase und nachträglich 1min. Jede Bestimmung erfolgte dreifach. Für HES sind Brechungsindexinkremente zwischen 0.136 und 0.151ml/g bekannt (Huglin, 1989). Das hier genutzte Brechungsindexinkrement für pharmazeutisch eingesetzte HES von 0.142ml/g wurde vom Gerätehersteller (Wyatt Technology Europe, Dernbach) übernommen. Die genutzte Membran aus regenerierter Cellulose hatte eine Ausschlußgrenze von 10kDa (Microdyn Nadir C010F). Die Molmassenbestimmung erfolgte nach Zimm mit Hilfe der Software Astra 4.90 (Wyatt Technology).

Die charakterisierten Komplexe werden nur in chiffrierter Form wiedergegeben. Sie waren gefärbt und die im Komplex gebundene HES wies eine mittlere Molmasse von etwa 70kDa auf. Die Komplexe wurden in autoklavierter (aut) und unautoklavierter Form (un) untersucht. Untersucht wurden Verdünnungen, die 1.6mg/ml HES enthielten. Die nachfolgend beschriebene Methode fand bei allen Komplexen sowie zum Vergleich auch bei reiner HES 70 (Abbildung 5.3-h) Anwendung. Die aF-FFF-Vermessung erfolgte in 100nm filtriertem (Millipore PVDF) Phosphatpuffer pH 7.4 mit 0.2g/l NaN₃ und 50mmol/l NaNO₃.

Abweichend von der für reine HES beschriebenen Methode fiel der Querflußvolumenstrom innerhalb 20min von 1ml/min auf 0ml/min. Die genutzte Membran aus Polyethersulfon (Nadir P010F, Microdyn Nadir) hatte einen cut off von 5kDa. Jede Bestimmung erfolgte ebenfalls dreifach.

Als scheinbares Brechungsindexinkrement wurde für die Zubereitung mit enthaltenen HES-Komplexen ein Wert von 0.357±0.011ml/g erhalten. Dieser Wert konnte aufgrund der zusätzlich enthaltenen Hilfsstoffe aber nur zur Bestimmung der Wiederfindungsrate und nicht zur Molmassenbestimmung der reinen Komplexe genutzt werden. Es wurde deshalb der Wert der reinen HES genutzt. Eine Abweichung von diesem Wert würde sich linear auf die ermittelten Molmassen auswirken. Auch eine eventuelle Absorption der gefärbten Lösungen könnte die Molmassenberechnung beeinträchtigen. Die erhaltenen Molmassen der Komplexe werden daher nachfolgend als scheinbare Molmassen bezeichnet. Diese Art der Auswertung läßt damit nur einen relativen Vergleich der einzelnen analog zusammengesetzten Proben zu. Die PDI- und Radienwerte sind hiervon aber nicht betroffen und können als Absolutwerte angesehen werden. Als Basis der Wiederfindungsraten am RI-Detektor dienten die Peakflächen bei Direktinjektion ohne Kanal, um Adsorptionserscheinungen an der Membran und Probenverlust durch die Membranporen erkennen zu können.

Der Wassergehalt der Proben in **Tabelle 5.2-a** wurde mittels Thermogravimetrie bestimmt (TG 209, Netzsch Gerätebau GmbH, Deutschland).

Zu Aufnahme von NMR-Spektren der HES wurden je etwa 30mg/ml der Probe in D₂O (99.98%, Chemotrade Leipzig, Charge 117A62) bei 27°C mit 500MHz (1H) bzw. 125MHz (13C) mit Hilfe eines Varian Inova 500 (Varian Inc., USA) vermessen.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR

Die 1H NMR-Spektren sind nachfolgend in Abbildung 5.3-a zu sehen.



Abbildung 5.3-a: 1H NMR-Spektren von HES 70, HES 130 und HES 200 (sub = substituiert)

Die Zuordnung der 1H NMR-Signale erfolgte anhand anderer Stärkederivate (De Graaf et al., 1995) sowie der wenigen verfügbaren Referenzspektren von HES (Furuta et al. 1997; Prokof ev und Yurin, 1990). Demnach waren die Signale hoher chemischer Verschiebung von 5.1 bis 5.8ppm den substituierten und unsubstituierten Atomen H1 der Glucoseeinheiten zuzuordnen. Da der PS-Wert für die untersuchten Produkte laut Hersteller größer 8 war (Serumwerk Bernburg, 2003), bezogen sich die entsprechenden Signale hauptsächlich auf die Substitution an C2. Der Bereich zwischen etwa 3.2 und 4.2ppm entsprach den anderen 5 H-Atomen der Glucoseeinheiten (H2-H6) und 4 H-Atomen der Hydroxyethylgruppe (Ethylgruppe). Von einer weiteren Zuordnung der einzelnen Peakbereiche sehen alle anderen Autoren ab, daher basiert die hier gezeigte Zuordnung von H3, H4 und H2 nur auf Vermutungen auf Basis simulierter Spektren von Oligomeren.

Nach der Formel 5.3-a (Prokof'ev und Yurin, 1990) konnte der DS-Wert anhand der 1H NMR-Spektren ermittelt werden:

$$DS = \frac{I_{11} + I_{12}}{I_{11} + I_{12} + I_{13}}$$
(5.3-a)

Hierbei stellen 11, 12 und 13 die drei Signale der Spektren bei etwa 5.6, 5.45 bzw. 5.3ppm dar. Es ergaben sich 0.42 für HES 70/0.5, 0.35 für HES 130/0.42 und 0.42 für HES 200/0.5. Der Hersteller gab für die Substanzen MS-Werte von 0.5 bzw. 0.42 an. Die erhaltenen DS-Werte waren damit etwas geringer als die jeweiligen MS, was bereits für andere Hydroxyethylstärken beschrieben wurde (Prokof´ev und Yurin, 1990). DS und MS von HES 130 waren damit gegenüber den anderen HES-Typen etwas geringer. Die Herstellerangaben und 1H NMR-Daten stützten sich damit gegenseitig.

Die 13C NMR-Spektren sind in **Abbildung 5.3-b** zu sehen. Sie glichen den in anderen Literaturquellen wie z.B. von (Liu und Xu, 2002) gegebenen Spektren, damit war eine Zuordnung einiger Signale möglich. Von einer Quantifizierung wurde aufgrund der relativ geringen Signalauflösung abgesehen.



Abbildung 5.3-b: 13C NMR-Spektren von HES 70, HES 130 und HES 200 (sub = substituiert)

5.3.2 Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI







Abbildung 5.3-c: Elugramme mit Molmassen (ansteigende Punkte) und Konzentration RI-Detektor (Peaks) sowie gewichtsgemittelte Molmassen (M_W) der verschiedenen HES

Abbildung 5.3-d: Summengraphen der Molmassen sowie Polydispersitäten (PDI) der verschiedenen HES

Die Elugramme der einzelnen Typen reiner HES sind in **Abbildung 5.3-c** gegeben. Sie unterschieden sich hinsichtlich ihrer Elutionszeiten. Wie nach der Fluß-FFF-Theorie zu erwarten, eluierten Hydroxyethylstärken geringerer Molmassen schneller aus dem Kanal. Die errechneten M_w-Werte in **Abbildung 5.3-c** zeigten selbige Reihenfolge wie die Vorgaben des Herstellers, unterschieden sich aber geringfügig vom jeweilgen Absolutwert. Dies war vermutlich verfahrensbedingt und ist durchaus nicht überraschend bei der Verwendung verschiedener Molmassenbestimmungsverfahren.

Neben den Mittelwerten ließen sich auch Molmassenverteilungen errechnen. Sie sind als Summenverteilung in **Abbildung 5.3-d** wiedergegeben. Es handelte sich demnach um hauptsächlich monomodal verteilte Proben, deren Verteilung mit steigender mittlerer Molmasse jedoch breiter wurde. HES 70 deckte hierbei einen Bereich von etwa 2.10⁴ bis 7.10⁵Da ab, wohingegen HES 200 noch erhebliche Anteile an Molmassen bis etwa 3.10⁶Da aufwies. Diese Abnahme der Herstellungsgüte zu höheren Molmassen zeigte auch die Relation der PDI-Werte in **Abbildung 5.3-d**.

Hinweise auf niedermolekulare Anteile unter 10⁴Da gaben die Wiederfindungsraten am RI-Detektor. Diese nahmen von HES 200 mit 97.8±0.7% über HES 130 mit 85.4±1.2% bis hin zu HES 70 mit 77.9±3.4% ab. Der niedermolekulare Rest ging durch die Poren der Membran verloren. Dieser war insbesondere bei den HES-Typen niedriger mittlerer Molmasse ausgeprägt.

Eine differentielle Darstellung der Molmassenverteilungen ist in Abbildung 5.3-e zu sehen. Die Anpassung an eine logarithmische Normalverteilung war nicht bzw. nur mit einem relativ geringen Bestimmtheitsmaß von R²≤0.95 möglich. Dies war auf den relativ hohen Anteil von niedriger Molekülen Molmasse zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, daß die Verteilungen einer anderen mathematischen Beschreibung folgten.



Abbildung 5.3-e: Differentielle Molmassenverteilungen aller drei HES-Typen mit jeweiliger Anpassung einer logarithmischen Normalverteilung



5.3.2.2 HES-Komplexe

Abbildung 5.3-f: Elugramme aF-FFF der autoklavierten HES-Komplexe, Konzentration RI (Peaks mit durchgezogener Linie), Streulichtintensität MALS 90° (Peaks mit gestrichelter Linie) und scheinbare Molmasse (M) bzw. Gyrationsradius (r_g) (ansteigenden Punkte)

Vortests unter Nutzung der Membran aus regenerierter Cellulose zeigten eine starke Probenadsorption auf der Membranoberfläche, verdeutlicht anhand eines dauerhaften gefärbten Flecks auf der Membran und eines ausbleibenden RI-Signals. Durch Nutzung von Membranen aus Polyethersulfon konnte dieser Effekt vermieden werden. Nachfolgend ist für die autoklavierten Komplexe je ein Beispielelugramm gezeigt (**Abbildung 5.3-f**). Die Elugramme der nicht autoklavierten Proben unterschieden sich hiervon praktisch nicht (**Abbildung 5.3-g**).



Abbildung 5.3-g: Elugramme der nicht autoklavierten HES-Komplexe, Konzentration RI (Peaks mit durchgezogener Linie), Streulichtintensität MALS 90° (Peaks mit gestrichelter Linie) und scheinbare Molmasse (M) bzw. Gyrationsradius (r_g) (ansteigenden Punkte)

Wie leicht zu erkennen ist, zeigten die HES-Komplexe einen schmalen Peak bei etwa 8min und einen breiten Peak bei hohen Elutionszeiten. Der schmale Peak ließ sich hinsichtlich MALS nicht eindeutig auswerten, da er vom Streulichtsignal des void-Peaks bei etwa 6.5min noch überdeckt wurde. Entsprechend seiner geringen Elutionszeit musste es sich um einen Probenanteil relativ geringer Molmasse handeln (Schure et al., 2000), der aber mehr als etwa 5kDa aufwies, um den Kanal nicht durch die Membranporen zu verlassen. Vermutlich handelte es sich demnach um die nicht im Komplex gebundene HES mit einer mittleren Molmasse von 70kDa. Dies bestätigte sich im Vergleich zum Elutionsverhalten der reinen HES in **Abbildung 5.3-h**. Beide Signale wiesen ein Maximum bei etwa 8min auf.



Abbildung 5.3-h: Elugramme aF-FFF von HES-K2 aut (schwarz) und HES 70 (grau), Konzentration RI (Peaks mit durchgezogener Linie) Abbildung 5.3-i: Scheinbare gewichts- (M_W) und anzahlgemittelte (M_N) Molmassen der HES-Komplexe

Der breite Peak in **Abbildung 5.3-f** zwischen etwa 11 und 25min stellte die eluierenden Komplexe dar. In der Gegenüberstellung wiesen beide Komplexe ein geringfügig verändertes Elutionsverhalten auf. So zeigt HES-K1 ein Maximum ober- und HES-K2 ein Maximum unterhalb 18min.

In **Abbildung 5.3-i** sind die scheinbaren M_W und M_N der Komplexe dargestellt. Die scheinbaren Molmassen waren gegenüber der reinen HES weitaus höher, was eine erfolgreiche Herstellung zeigt. Wie bereits beim Elutionsverhalten ließ sich auch hier ein geringfügiger Unterschied der Werte von K1 und K2 detektieren. Keinen nachweisbaren Einfluß auf die Proben hatte auch hier das Autoklavieren. Alle PDI-Werte in **Abbildung 5.3-j** fielen mit 1.4 bis 1.5 relativ gering aus, was auf nur eine Fraktion d.h. einen Typ von Komplexen hindeutete.

In Abbildung 5.3-f und Abbildung 5.3-g finden sich auch Elugramme mit Gyrationsradien. eingetragenen Die Ermittlung dieser Werte setzte Moleküle höherer Molmassen voraus. die richtungsabhängig streuen. Daher wurden die Streusignale kleiner Molekülen wie z.B. der reinen HES, die unterhalb etwa 14min eluierten. nicht ausgewertet. Wie zu



Abbildung 5.3-j: Polydispersitäten (PDI= M_W/M_N) der HES-Komplexe

erkennen ist, zeigten beide Komplexe Gyrationsradien bis über 60nm bei höheren Elutionszeiten. Nachweisbare Unterschiede zwischen den Komplexen ließen sich hiermit aber nicht festmachen.

Wie in **Abbildung 5.3-k** zu erkennen ist, wurde bei allen Proben der Großteil der Probe am RI-Detektor wiedergefunden.



Abbildung 5.3-k: Wiederfindungsraten des RI-Detektors aller drei HES-Typen sowie der autoklavierten und nicht autoklavierten HES-Komplexe

5.4 Zusammenfassung

Die 1H NMR-Spektren stützen die Angaben des Herstellers hinsichtlich der molaren Substitution der drei Typen reiner Hydroxyethylstärke. Die Molmasse, welche die Geschwindigkeit der renalen Elimination und das Wasserbindungsvermögen von HES bestimmt, konnte mittels aF-FFF/MALS/RI erfolgreich bestimmt werden. Die erhaltenen Werte zeigten ähnliche Beträge wie die Vorgaben des Herstellers. Mit höherer mittlerer Molmasse wiesen die einzelnen Typen aber auch breitere Verteilungen ihrer Molmassen, d.h. geringere Herstellungsgüten, auf. Die detaillierte Analyse der Molmassen zeigte eine Abweichung von einer logarithmischen Normalverteilung. Dies war bedingt durch einen relativ hohen Anteil niedermolekularer Komponenten.

Eine erfolgreiche Herstellung der HES enthaltenden Komplexe konnte aufgrund ihrer Größe im Vergleich zur Reinsubstanz gezeigt werden. Hinweise hierauf gaben das aF-FFF-Elutionsverhalten, die Gyrationsradien und die scheinbaren Molmassen. Die Polydispersität war relativ gering, es handelte sich demnach vermutlich jeweils nur um eine Komplexart. Geringe Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der beiden untersuchten Komplexe. Das vorherige Autoklavieren der Proben hatte aber keinen nachweisbaren Einfluß.

6 <u>Charakterisierung von wäßrigen Lösungen amphiphiler</u> <u>Triblock-Copolymere</u>

6.1 Einleitung

Micellare Systeme werden häufig genutzt, um hydrophobe Substanzen in wäßrige Formulierungen zu inkorporieren. Diese Solubilisation kann mit Hilfe von wasserlöslichen amphiphilen Triblock-Copolymeren geschehen. Polymere einer ABA-Struktur aus innerem PPO und äußerem PEO (Kapitel 3.1) werden bereits seit langer Zeit hierfür genutzt. Sie werden als Pluronic, Poloxamer oder Synperonic bezeichnet und sind pharmazeutisch auf Basis von Monographien in Europa und in den USA einsetzbar (Ph. Eur. 6.0, 2008; USP 31, 2008; BP, 2008). Die mögliche Kombination von Blöcken verschiedener Molmassen erlaubt eine breite Vielfalt von Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die nachgestellte Nummer ist daher nötig, um ihre genaue Struktur aufzuschlüsseln. Einige Typen sind auch im pharmazeutischen Einsatz weit verbreitet. In flüssigen Zubereitungen werden sie z.B. als Emulgator, Stabilisator, Bestandteil von Mikroemulsionen oder Gelbildner und im festen Zustand als Lösungsbeschleuniger oder Feuchthaltemittel verwendet (Fussnegger, 1999 und 2000).

Der variable Aufbau von Blockpolymeren bietet viele Vorteile. Daher wurden neuartige amphiphile Polymere einer analogen ABA-Struktur im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Kressler synthetisiert. Diese bestanden jedoch aus PPO in der Mitte des Polymers und äußeren Ketten aus 2,3-Dihydroxypropylmethacrylat, welches auch als Glycerolmonomethacrylat (GMA) bezeichnet wird. Die Struktur dieser neuen Triblock-Copolymere ist in **Abbildung 6.1-a** dargestellt.



Abbildung 6.1-a: Struktur der Triblock-Copolymere aus n Einheiten 2,3-Dihydroxypropylmethacrylat (PGMA) und m Einheiten Propylenoxid (PPO)

Während der mittlere PPO-Block etwa 34 Monomere (n) mit $M_N \approx 2000$ g/mol aufwies, differierten die PGMA-Polymerketten in ihrer Anzahl zwischen etwa 14, 15, 36 und 221 Einheiten je Block (m). Eine weitreichende Beschreibung und Charakterisierung der neuen Polymere findet sich bei (Amado et al., 2006). GMA ist ein stark hydrophiles Monomer und als Gelbildner von hohem kommerziellem Interesse. Es ist ein potentieller Nachfolger des weniger hydrophilen 2-Hydroxyethlmethacrylat (HEMA), welches bei weichen Kontaktlinsen und Hydrogelen eingesetzt werden kann und Potential beim drug delivery aufweist (Gates et al., 2003a; Gates et al., 2003b).

Der Inhalt der nachfolgenden Studie bezieht sich auf die durchgeführte Separierung und Charakterisierung der wäßrigen Lösungen der Triblock-Copolymere aus PGMA und PPO mit Hilfe vom aF-FFF/MALS/RI (Augsten et al., 2006b). Die Messungen wurden im Rahmen der Zusammenarbeit mit E. Amado und Prof. Dr. J. Kressler durchgeführt (Amado et al., 2006).

6.2 Materialien und Methoden

Es wurden vier verschiedene Polymere untersucht (Tabelle 6.2-a).

Tabelle 6.2-a: Verwendete Copolymere mit den für die aF-FFF verwendeten Konzentrationen, ¹Daten anhand 1H NMR (Amado et al., 2006)

Copolymer mit jeweiligen	(PGMA ₁₄) ₂ -	$(PGMA_{15})_{2}$ -	(PGMA ₃₆) ₂ -	(PGMA ₂₂₁) ₂ -
PGMA-Anteilen ¹	PPO ₃₄	PPO ₃₄	PPO ₃₄	PPO ₃₄
Berechnete Molmasse [kDa]	11	13	14	40
$M_{N} [kDa]^{1}$	6.4	6.6	13.6	73
Konzentration [mg/ml]	10	10	10	11

Die Charakterisierung erfolgte in bidestilliertem Wasser mit 0.02% NaN₃ (m/V), welches zusätzlich zur Entfernung von partikulären Verunreinigungen 100nm-filtriert wurde (VVLP-Filter Millipore). Die verwendete Apparatur ist in Abbildung 2.1-d gegeben. Die Kanalhöhe betrug 350µm, der Detektorvolumenstrom blieb bei allen Methoden konstant bei 1ml/min. 100µl einer Lösung der in Tabelle 6.2-a gegebenen Konzentration wurden mit 0.2ml/min injiziert. Fokussiert wurde während der zweiminütigen Injektionsphase sowie nachträglich 1min. Ein 20minütiger Querflußgradient war zur Separierung der Peaks nötig. Vorversuche von 1-3ml/min max. Querflußvolumenstrom wurden mit (PGMA₁₄)₂-PPO₃₄ durchgeführt, wobei 3ml/min zur ausreichenden Trennung der Peaks notwendig waren und auf alle Polymere angewendet wurden. Der Querflußvolumenstrom verringerte sich linear innerhalb von 20min auf 0ml/min. Eine Vermessung ohne Querfluß diente der Bestimmung des dn/dc-Wertes aus dem erhaltenen Brechungsindexsignal. Der Wert betrug jeweils 0.130ml/g, nur (PGMA₂₂₁)₂-PPO₃₄ wies 0.136ml/g auf. Die genutzte Membran aus regenerierter Cellulose hatte einen cut off von 10kDa. Bei der Streulichtauswertung wurde die Zimm-Gleichung genutzt. Eine Berechnung der mittleren Molmassen erfolgte nach polynomieller Anpassung vierter Ordnung. Jede Bestimmung erfolgte zweifach.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Elugramme aller Auftrennungen der Copolymere mit Hilfe der aF-FFF/MALS/RI finden sich in **Abbildung 6.3-a**.



Abbildung 6.3-a: Elugramme von $(PGMA_{14})_2$ -PPO₃₄ (A), $(PGMA_{15})_2$ -PPO₃₄ (B), $(PGMA_{36})_2$ -PPO₃₄ (C), $(PGMA_{221})_2$ -PPO₃₄ (D), Peaks zeigen die Konzentration und Punkte die zugehörige Molmasse

Die Copolymere (A) und (B) zeigten ein eindeutig bimodales System anhand von zwei Konzentrationspeaks, ein schmaler mit einem Maximum bei etwa 9min und ein weiterer breiter zwischen etwa 13 und 20min. Der Fluß-FFF-Theorie (Schure et al., 2000) folgend, eluierten bei geringen Zeiten kleinere Moleküle. Anhand der Streudaten zeigten sich Molmassen bis etwa 30kDa. Hingegen umfaßte der breitere Peak bei höheren Zeiten Molmassen bis in den MDa-Bereich. Eine analoge Auftrennung von micellaren Systemen aus Makromolekülen mit Hilfe der Fluß-FFF wurde nach intensiver Literaturrecherche nur einmal aufgefunden (Awan et al., 1997). Es wurden Monomere und Micellen bei unterschiedlichen Zeiten detektiert. Vermutlich handelte es sich daher beim ersten Peak in **Abbildung 6.3-a** um einzelne Monomere und beim zweiten Peak um Micellen, die aus den Monomeren aufgebaut sind.

Abbildung 6.3-b zeigt, daß der überwiegende Konzentrationsanteil bei den Copolymeren (A) und (B) in Form von Micellen vorlag (Peak 2). Der Anteil von Monomeren war hingegen relativ gering (Peak 1). Copolymer (C) zeigte im Gegensatz hierzu einen sehr geringen micellaren Anteil. Dies verdeutlicht auch der ausgeprägte micellare Peak kaum in Abbildung 6.3-a. Daß es sich tatsächlich um weitere Fraktionen handelte, zeigte sich an den Daten der Lichtstreuung in Abbildung 6.3-c. Hier war für den Bereich zwischen 14 und 17cm ein weiterer intensiver Peak detektierbar. Das komplexe Elutionsverhalten von (C) wird durch die Vergrößerung des micellaren Peaks in Abbildung 6.3-d deutlich. Es zeigte sich in diesem Bereich ein mehrstufiges Profil mit jeweils unterschiedlichen Molmassen.

Bei (PGMA₂₂₁)₂-PPO₃₄ (D) handelte es sich hingegen um eine monomodale Probe (**Abbildung 6.3-a**). Jedoch war der einzige Peak relativ breit und zeigte Molmassen zwischen etwa 30 und 300kDa.

Die M_W-Werte aller einzelnen Peaks finden sich in **Abbildung 6.3-e**. Die Werte der Micellen waren selbstverständlich höher



Abbildung 6.3-b: RI-Wiederfindungsraten beider Elugramm-Peaks von $(PGMA_{14})_2$ -PPO₃₄ (A), $(PGMA_{15})_2$ -PPO₃₄ (B), $(PGMA_{36})_2$ -PPO₃₄ (C), $(PGMA_{221})_2$ -PPO₃₄ (D)



Abbildung 6.3-c: Elugramm von (PGMA₃₆)₂-PPO₃₄ (C), Konzentration (schwarz) und zugehörige Streuintensität bei 90° (grau)



Abbildung 6.3-d: Teilelugramm von $(PGMA_{36})_2$ -PPO₃₄ (C), Peak zeigt die Konzentration und Punkte die zugehörige Molmasse

als die der Monomere. Die Werte der Monomere stimmten nicht vollständig mit den anhand von 1H NMR erhaltenen M_N -Werten und den errechneten Molmassen (**Tabelle 6.2-a**) überein. Eine Erklärung hierfür bietet einerseits die unterschiedliche Basis von M_W und M_N , wobei kurz- und langkettige Polymere unterschiedlich gewichtet werden (Formeln 2.11 und 2.1m). Andererseits ging durch die Poren der Membran ein niedermolekularer Anteil der Probe verloren, wie aus den Gesamtwiederfindungsraten unter etwa 80% (Abbildung 6.3-b) hervorgeht. Dies führt zu Abweichungen der bestimmten Mittelwerte.

Eine weitaus höhere Molmasse von $(PGMA_{221})_2$ -PPO₃₄ (D) gegenüber den anderen Copolymeren findet sich bei allen Bestimmungsverfahren (**Abbildung 6.3-e** und **Tabelle 6.2-a**). Dies legt nahe, daß es sich bei dem einzigen Elugrammpeak in **Abbildung 6.3-a** (D) hauptsächlich um dessen Monomere handelte.



Abbildung 6.3-e: Gewichtsgemittelte Molmassen (M_W) der Peaks bei niedrigen (Peak 1) und hohen (Peak 2) Elutionszeiten von (PGMA₁₄)₂-PPO₃₄ (A), (PGMA₁₅)₂-PPO₃₄ (B), (PGMA₃₆)₂-PPO₃₄ (C), (PGMA₂₂₁)₂-PPO₃₄ (D)

In Analogie zu Awan et al. (Awan et al., 1997) ließen sich aus den Relationen der Werte von Micellen und Monomeren die Aggregationszahlen bestimmen, d.h. die jeweilige Anzahl der Moleküle je Micelle. Die Werte sind in **Tabelle 6.3-a** gegeben. Sie liegen im zweistelligen Bereich. Der Wert von (PGMA₃₆)₂-PPO₃₄ basiert auf dem Mittelwert beider Molmassenstufen in **Abbildung 6.3-d**. Für die einzelnen Stufen ergeben sich jeweilige M_w-Werte von 3.8·10⁵Da bzw. 8.8·10⁵Da und damit Aggregationszahlen von 14 bzw. 32.

Tabelle 6.3-a: Aggregationszahlen, basierend auf der Relation der gewichtsgemittelten Molmassen (M_w) (*basiert auf M_W beider Molmassenstufen)

Copolymer	$(PGMA_{14})_2$ -PPO ₃₄	$(PGMA_{15})_2$ -PPO ₃₄	$(PGMA_{36})_2$ -PPO ₃₄
Aggregationszahl	31	40	19*

6.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe der aF-FFF/MALS/RI konnten die wäßrigen Lösungen der neu synthetisierten Triblock-Copolymere, basierend auf PGMA und PPO, charakterisiert werden. Die Copolymere zeigten unterschiedliche Trennverhalten in Form von mono- und bimodalen Verteilungen. Bei den bimodalen Proben konnten Monomere und Micellen erfolgreich voneinander getrennt und jeweils in ihrer Molmasse bestimmt werden. Zusätzlich ließ sich die Anzahl der Moleküle je Micelle in Form der Aggregationszahl errechnen. Die einzige rein monomodale Probe (PGMA₂₂₁)₂-PPO₃₄ zeigte keine erkennbare Mizellbildung bei der untersuchten Konzentration. Die ermittelte Molmasse seiner Monomeren war im Vergleich zu den anderen Copolymeren viel höher, was dem Ergebnis anderer Bestimmungsverfahren entsprach.

Die aF-FFF/MALS/RI eignet sich insgesamt zur Charakterisierung des wäßrigen Lösungsverhaltens dieser neuen Substanzklasse.

7 <u>Charakterisierung von Chitosanen unterschiedlicher Typen</u> <u>und Chargen</u>

7.1 Einleitung

Das Ziel der folgenden Studie war die Auftrennung von Lösungen verschiedener Chitosane mit Hilfe der aF-FFF. Die aufgetrennten Proben wurden nachfolgend mittels MALS und RI analysiert. Weiterhin wurden auch unterschiedliche Chargen selbigen Typs untersucht, um auf Chargenvariabilität zu testen. Die erhaltenen Meßwerte finden sich in (Augsten und Mäder, 2008a), Werte früherer Chitosancharakterisierungen auch in (Picker-Freyer und Brink, 2006). Weitere eigene Untersuchungen zu einem Chitosanderivat, dem im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Kissel von der Philipps-Universität Marburg synthetisierten Trimethylchitosan, sind hier nicht aufgeführt. Sie wurden bereits publiziert (Mao et al., 2007).

7.1.1 Chitosan

Die zunehmende Anzahl von Publikationen über Chitosan bzw. dessen Derivate zeigt die zunehmende Bedeutung dieses Polysaccharides. Im pharmazeutischen Bereich wird die Anwendung unterstützt durch die relativ neue Monographie seines Hydrochlorids in der Ph. Eur. bzw. in der BP (Ph. Eur. 6.0, 2008; BP, 2008). Eine Vielzahl von Zusammenfassungen in Artikeln und Büchern beschreibt die Struktur, Herstellung und Anwendung von Chitosanen (Holpert, 1999; Peter, 2005; Illum, 1998; Felt et al., 1998).

Bei Chitosan handelt es sich um ein lineares Polymer, seine Struktur ist in Abbildung 7.1-a gegeben.



Abbildung 7.1-a: Struktur von Chitosan, Polymer aus Monomeren mit R=H (Glucosamin) und in geringen Anteilen R=Ac (N-Acetylglucosamin)

Es ist ein natürliches Polyaminosaccharid, bestehend aus $\beta(1\rightarrow 4)$ -glycosidisch verknüpften Monomeren aus N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Glucosamin (GlcN). Das Verhältnis beider Monomere zueinander beschreibt der Deacetylierungsgrad D_{deac} oder der F_A-Wert als molarer Anteil der restlichen GlcNAc-Einheiten (Roberts, 1997). Ideales Chitin hätte einen F_A von 1.0, natürliches Chitin hat aber meist nur einen $F_A > 0.9$. Ideales Chitosan wiese einen Wert von 0.0 auf, während die Hersteller meist Chitosane anbieten mit $F_A \le 0.2$. Im Gegensatz zu Chitin ist Chitosan durch seinen pKa-Wert zwischen 6.2 und 6.4 im Sauren löslich. Die Herstellung von Chitosan ist gut beschrieben (No und Meyers, 1997). Es kann aus unterschiedlichen Chitin enthaltenden Materialien gewonnen werden. Meist werden nicht verwendete Fraktionen der Fischindustrie genutzt, d.h. Exoskelette von Krabben und Shrimps. Diese werden deprotoniert, demineralisiert, entfärbt und deacetyliert. Wie aus dem zugehörigen Kommentar der Monographie im Ph. Eur. hervorgeht, sind die wichtigsten resultierenden Qualitätsparameter der Deacetylierungsgrad, die Molmasse sowie der Grad an Verunreinigungen speziell von Proteinen und Schwermetallen (Ph. Eur. 6.0, 2008). Diese Parameter hängen stark vom verwendeten Rohmaterial sowie von den Prozeßparametern ab. Weiterhin führt eine stärkere Deacetylierung ebenfalls zu einer verstärkten Depolymerisierung, beide Werte beeinflussen sich gegenseitig. Daher ist die Herstellung von Produkten gleicher Qualität von Charge zu Charge eine große Herausforderung.

Aufgrund des Einflusses auf wichtige Produkteigenschaften sind Typen bzw. Chargen konstanter Qualität Voraussetzung. Die Molmasse hat beispielsweise einen Effekt auf die Viskosität wäßriger Lösungen. Beim Einsatz von Chitosanen als Stabilisator bzw. als Verdickungsmittel oder in Hydrogelen ist dies von Belang. Hierfür wird es häufig verwendet, da Chitosan auch das Bakterienwachstum limitiert. Dieser Effekt ist aber ebenfalls molmassenabhängig (Zivanovic et al., 2004).

Chitosan wird in der Pharmazie hinsichtlich einer Eignung als Hilfsstoff bei der Tablettierung und Pelletierung oder in Arzneiträgersystemen aus Nano- und Mikropartikeln erforscht (Kato et al., 2003; Jess und Steckel, 2007; Hoepfner et al., 2002). Es ist mukoadhäsiv, kommt somit in Wundauflagen und transmukosalen Arzneiträgersystemen zum Einsatz. Ein anderes Einsatzgebiet ist die Emulgierung von Fetten. Weiterhin kann Chitosan als Polykation mit negativ geladenen Gewebeoberflächen und Makromolekülen interagieren. Bedeutung erlangte es hierbei jüngst durch die Komplexierung von DNA (Mansouri et al., 2004). Der Einfluß der Molmasse wurde hier anhand von unterschiedlichen Blutplasmaspiegeln von DNA-Vektoren nachgewiesen (Richardson et al., 1999).

Chitosan dient weiterhin als Edukt zur Herstellung seiner chemisch modifizierten Derivate (Peter, 2005; Mao et al., 2007). Die Molmasse des Ausgangsmaterials ist für das resultierende Produkt von außerordentlicher Bedeutung. Ein Beispiel der molmassenabhängigen Eigenschaft eines Chitosanderivates mit Thiolgruppen wurde bereits für das mukoadhäsive Potential von oralen Arzneiträgersystemen gegeben (Roldo et al., 2004).

7.1.2 Besonderheiten der Molmassencharakterisierung von Chitosan

In den Datenblättern kommerzieller Produkte ist meist nur die Viskosität einer Standardlösung angegeben. Prinzipiell können Viskösitätswerte bei unterschiedlichen Konzentrationen nach einer Kalibrierung auch der Errechnung einer ungefähren mittleren Molmasse dienen. Es handelt sich jedoch bei diesem Verfahren nicht um eine absolute Methode. Diese ist zudem ungeeignet, die Polydispersität der Proben zu beschrieben. Daher sind derartige Angaben unzureichend und andere Bestimmungsverfahren vorzuziehen.

Eine andere Möglichkeit stellt die Massenspektrometrie dar. Die Vermessung von Chitosan ist aber sehr problematisch, bedingt durch seine polykationische Struktur und seine extrem breite Molmassenverteilung (Krohn, 2003). Auch entsprechende Messungen an unserem Institut konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Massenspektrometrie fand daher bislang nur Anwendung bei niedermolekularen degradierten Chitosanfragmenten (Bahrke et al., 2002; Krohn, 2003).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von statischen Lichtstreudetektoren als Küvettensystem dar. Die in geringen Mengen vorhandenen Chitosanaggregate beeinträchtigen jedoch das Streulichtsignal erheblich und führen zu nicht reproduzierbaren Werten (Anthonsen et al., 1994).

Eine weitere mögliche Methode ist die GPC. Speziell für Chitosane ist aber bekannt, daß selbst bei Nutzung großporiger Gele sehr hochmolekulare Probenanteile nicht aufgetrennt werden können und Aggregate vor einer Bestimmung abgetrennt werden müssen. Einige Säulen zeigen auch eine starke Probenadsorption. Weiterhin existieren bislang keine Chitosanstandards und eine relative Kalibrierung mit Dextranen kann zu einer Überschätzung der Molmassen führen. Eine GPC/MALS-Kombination (Beri et al., 1993; Ottoy et al., 1996) ist hier vorteilhafter, löst aber nicht alle mit der GPC verbundenen Probleme (Varum and Smidsrod, 2005).

Die Fluß-FFF/MALS als Alternative zur GPC/MALS in der Polysaccharidcharakterisierung und deren Vorteile wurden bereits in Kapitel 2.1 beschrieben. Spezielle Schwierigkeiten wie die hohen mittleren Molmassen (Beri et al., 1993) und hohen Polydispersitäten (Ottoy et al., 1996) von Chitosan sollten durch die Fluß-FFF besser bewältigt werden. Auch ist eine Vorfiltration der Proben nicht nötig, um eventuelle Aggregate abzutrennen. Überraschenderweise findet sich bislang nur eine weitere Literaturquelle (Johann, 2004), die ohne detaillierte Beschreibung der Trennung oder Analyse die aF-FFF-Charakterisierung von Chitosanen wiedergibt.

Chitosan kann hierbei als Beispiel für viele andere polydisperse Polysaccharide gelten. Für diese finden sich analoge Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Molmasse, sie sind aber häufig schlechter dokumentiert.

7.2 Materialien und Methoden

Tabelle 7.2-a: Verwendete Chitosane von Primex Ingredients in Island, ^{*}Herstellerwert für 1% in 1%iger Essigsäure, ⁺(m/m) bestimmt mittels Thermogravimetrie (TG 209, Netzsch Gerätebau GmbH, Deutschland)

Kurzbezeichnung	А	В	С	D1	D2	D3
Name	Chitosan	Chitosan	Chitosan	Chitoclear	Chitoclear	Chitoclear
	FG 80	FG 85	FG 90	FG 95	FG 95	FG 95
Charge	TM661	TM611	TD132	TM1885	TM 1360	TM 1369
Viskosität [cP] [*]	36	10	59	78	16	51
Wassergehalt [%] ⁺	12.6	12.0	11.5	11.3	13.3	9.3

Die verwendeten Proben unterschiedlichen Typs und unterschiedlicher Charge sind in Tabelle 7.2-a gegeben. Als Lösungsmittel wurde Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 4.2 bestehend aus 4.57g/l Essigsäure, 1.96g/l Natriumacetat und 0.2g/l Natriumazid zur Konservierung genutzt. Die aF-FFF-Apparatur ist in Abbildung 2.1-d gegeben. Nach zahlreichen Vortests zur Optimierung der Trennung wurde folgende Methode entwickelt: Der Detektorvolumenstrom betrug konstant 1ml/min. 100µl einer jeweiligen 2mg/ml konzentrierten Chitosanlösung wurden für 2min mit 0.2ml/min injiziert und eine weitere Minute nachfokussiert. Danach begann die Trennung der Proben mit einem programmierten Querflußgradienten aufgrund deren hohen Polydispersität. Beginnend mit 2ml/min für 2min, wurde der Querflußvolumenstrom dann innerhalb von 5min auf 1ml/min und nachfolgend innerhalb von 17min auf 0ml/min vermindert. Ein Kanalspacer der Höhe 350µm und eine Membran aus regenerierter Cellulose mit einem cut off von 10kDa (Nadir C010F, Microdyn-Nadir GmbH) kamen zum Einsatz. Mit Hilfe der Astra 4.90-Software (Wyatt Technology Corporation) wurden Molmassen- und Radienwerte basierend auf der Zimm-Gleichung mit einem Brechnungsindexinkrement von 0.181ml/g (Beri et al., 1993) und einer Detektorfitanpassung von 1 berechnet. Die gegebenen Fehlerabweichungen stellen die vom Programm errechneten Standardabweichungen der Probengesamtheit einer Messung dar. Die Flory-Exponten wurden auf Basis der Werte zwischen 50 und 300kDa errechnet.

Die intrinsischen Viskositäten wurden für Konzentrationen von 0.05% bis 0.3% (m/V) bei 25°C mit Hilfe von Ubbelohde-Viskosimetern (Schott, Typ 0a und I) bestimmt. Die Auslaßzeiten wurden der Hagenbach-Korrektur unterzogen. Die Flüssigkeitsdichten wurden mit einer Mohr-Westphal-Waage bestimmt (Johannes Hammer, Deutschland).

Zu Aufnahme von NMR-Spektren wurden die Chitosane zu je 10mg/ml in 2% (m/V) DCl (99.5%, Sigma-Aldrich GmbH, Charge 05404ME) in D₂O (99.98%, Chemotrade Leipzig, Charge 117A62) hinsichtlich 1H NMR mit 500MHz mit Hilfe eines Varian Inova 500 (Varian Inc., USA) bei 27°C vermessen. Die Konzentration der 13C NMR-Proben betrug 30mg/ml und eine Vermessung erfolgte bei 125MHz. Alle weiteren Parameter wurden analog (Fernandez-Megia et al., 2005) genutzt, daher war eine starke Erwärmung der Proben nicht nötig. Die Deacetylierungsbestimmung wurde zuerst erfolgreich an einem Chitosan mit vorgegebenem 1H NMR-Referenzwert gestestet.

Weitere Auswertmethoden finden sich eingebettet im Text.

7.3 <u>Resultate und Diskussion</u>

7.3.1 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR

Das Ziel der NMR-Charakterisierung war die Erkennung eventueller Verunreinigungen und eine zuverlässige Bestimmung von D_{deac} . Die 1H NMR gilt unter allen Möglichkeiten der Deacetylierungsquantifizierung als eine der genauesten Methoden (Krohn, 2003) und kann daher als Referenz angesehen werden.

Die entsprechenden Spektren sind in **Abbildung 7.3-a** bzw. **Abbildung 7.3-b** gegeben. Die Zuordnung der einzelnen Peaks erfolgte nach (Rinaudo et al., 1992) und (Fernandez-Megia et al., 2005). Eindeutig erkennbar waren H1, die kovalent gebundenen Acetylgruppen N-Ac und freie Essigsäure AcOH sowie H2 des deacetylierten Monomers (GlcN). Eine Differenzierung der anderen Atome war aufgrund der Signalüberlappungen nicht möglich.


Abbildung 7.3-a: 1H NMR-Spektren der Chitosane von Primex Ingredients, D3 mit Signalzuordnung (N-Ac gebundene Acetylgruppen, Ac-OH freie Essigsäure)

Die Bestimmung des Deacetylierungsgrades D_{deac} ist theoretisch mit verschiedenen Gleichungen möglich (Lavertu et al., 2003). Aufgrund der Störung durch den Restwasserpeak kam aber nur die Bestimmung nach Formel 7.3a in Frage (Fernandez-Megia et al., 2005; Hirai et al., 1991):

$$D_{deac}[\%] = \left(1 - \left(\frac{1}{3}I_{CH3} \div \frac{1}{6}I_{H2-H6}\right)\right) \cdot 100$$
(7.3a)

Hierbei entspricht CH₃ etwa einer chemischen Verschiebung 1.7-2.4ppm und H2 bis H6 etwa 2.7-4.4ppm. Der CH₃-Bereich beinhaltet neben den N-Acetylgruppen vorteilhafterweise auch die im Sauren eventuell abgespaltene Essigsäure. Folgende Werte wurden erhalten (**Tabelle 7.3-a**).



Abbildung 7.3-b: 1H NMR-Spektren der Chitosane von Medical Chitosan

Die ermittelten Werte der Chitosane von Primex Ingredients stimmten mit den Herstellerangaben teilweise überhaupt nicht überein, es ließ sich kein Zusammenhang erkennen. Zum Vergleich wurden Deacetylierungsgrade von Chitosanen einer weiteren Firma, Medical Chitosan, bestimmt (Tabelle 7.3-a). Deren ermittelte Werte differierten nur geringfügig von den Herstellerangaben. Da die 1H NMR als gegenüber anderen Methoden relativ genau angesehen wird, wurden weiterhin die bestimmten Werte genutzt.

Chitosan	Hersteller	D _{deac} [%], 1H NMR	D _{deac} [%]*
А	Primex Ingredients	85,4	81
В	Primex Ingredients	89,6	88
С	Primex Ingredients	94,6	91
D1	Primex Ingredients	96,8	99
D2	Primex Ingredients	85,3	96
D3	Primex Ingredients	83,2	95
Chitosan 85/10/A1	Medical Chitosan	85,8	85
Chitosan 85/15/A1	Medical Chitosan	84,0	85
Chitosan 90/100/A1	Medical Chitosan	91,6	90
Chitosan 90/1000/A1	Medical Chitosan	91,5	90

Tabelle 7.3-a: Deacetylierungsgrade der Chitosane von Primex Ingredients (Island) und Heppe Medical

 Chitosan GmbH (Deutschland), Herstellerangaben und Bestimmung anhand 1H NMR nach (Hirai et al., 1991)

Zusätzlich wurden beispielhaft 13C NMR-Spektren aufgenommen. Diese sind in **Abbildung 7.3-c** gegeben. Die Auswertung und Zuordnung der jeweiligen Maxima erfolgte nach (Rinaudo et al., 1992). Wie aus **Tabelle 7.3-b** ersichtlich ist, wurden die Signale aller sechs C-Atome aufgefunden. Auffällig war lediglich die vermutlich meßtechnisch bedingte

Tabelle 7.3-b: 13C NMR chemische Verschiebungen von Chitosan B, D1, D3 sowie Literaturwerte für $D_{deac}=12.5\%^*$ bzw. $2\%^+$ (Rinaudo et al.. 1992)

C-Atom	Lit.*	Lit. ⁺	В	D1	D3
C1	102.4	100.8	97.2	97.3	97.4
C2	58.4	58.2	55.7	55.7	55.9
C3	74.4	73.1	69.8	69.8	70.1
C4	80.0	79.5	76.2	76.2	76.6
C5	77.0	76.9	74.6	74.6	74.8
C6	62.5	62.5	59.9	59.9	60.2

Differenz von etwa 2-3ppm im Vergleich zu den Referenzwerten. Nachweisbare Verunreinigungen fanden sich nicht.



Abbildung 7.3-c: 13C NMR-Spektren der Chitosane B, D1 und D3



7.3.2 Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI

Abbildung 7.3-d: Elugramme der Chitosane, Peaks zeigen die Konzentration und Punkte die zugehörige Molmasse

Die Elugramme aller Chitosane sind in **Abbildung 7.3-d** dargestellt. Die zugehörigen Molmassen finden sich in **Abbildung 7.3-e** und **Abbildung 7.3-f**. Je nach Chitosantyp wurden unterschiedliche Elutionsprofile erhalten. Die zugehörigen M_N-Werte lagen in einem weiten Bereich von etwa 40 bis 100kDa, wobei aufgrund der stark polydispersen Proben

jeweils viel höhere M_W-Werte erhalten wurden. Die niedrigsten Molmassenwerte fanden sich jeweils für B und D2. Diese eluierten auch hauptsächlich bei relativ geringen Zeiten. Bei C hingegen zeigte sich ein Maximum seines breiten Elutionspeaks bei höheren Zeiten, es eluierte also stark verzögert aus dem Kanal. In Analogie hierzu zeigt C die höchsten M_N-Werte. Für alle drei Chargen gleichen Types, also von D1, D2 und D3, waren gleiche oder zumindest ähnliche Trennungen zu erwarten. Deren Elugramme unterschieden sich jedoch ebenfalls beträchtlich. Alle drei Chargen zeigten auch nicht dieselben Mittelwerte der Molmassen.





Abbildung 7.3-e: Anzahlgemittelte Molmassen (M_N) der Chitosane

Abbildung 7.3-f: Gewichtsgemittelte Molmassen (M_w) der Chitosane, Werte von D3 betrugen $1.3\pm0.2\cdot10^6$ Da und $1.4\pm0.3\cdot10^6$ Da

Alle Chitosane zeigten im Konzentrationsverlauf in Abbildung 7.3-d nur ein Hauptmaximum, mit der Ausnahme von D3. Dieses wies ein weiteres lokales Maximum bei etwa 25min auf. Weiterhin wurden für D3 die höchsten M_W -Werte insgesamt erhalten, die fast eine Zehnerpotenz über den M_W der anderen Chitosane lagen.



Abbildung 7.3-g: Differentielle Molmassenverteilungen der Chitosane mit jeweiliger Anpassung einer monomodalen logarithmierten Normalverteilung (nur D3 trimodal), R²=0.994 (A), 0.995 (B), 0.994 (C), 0.983 (D1), 0.997 (D2), 0.995 (D3 trimodal)

Dies ließ sich durch die bimodale Verteilung von D3 erklären, wie der Vergleich der differentiellen Darstellungen der Molmassen in **Abbildung 7.3-g** verdeutlicht. Es zeigten zwar alle Chitosane Molmassen bis etwa 10⁶Da, doch war der Anteil zwischen 10⁶ und 10⁷Da bei D3 weitaus stärker ausgeprägt. Dieser Anteil hoher Molmassen wurde bei der M_W-Bestimmung sehr stark gewichtet und führte damit zu diesen extrem hohen Werten. Während weiterhin alle anderen Chitosane an monomodale logarithmische Normalverteilungen angepaßt werden konnten, zeigte D3 einen multimodalen Verlauf mit zwei Maxima. Daher resultierte beim Versuch einer monomodalen Anpassung ein geringes Bestimmtheitsmaß R² von 0.906, was auf eine vollständig andere Verteilung hindeutet.

Diese breite Molmassenverteilung von D3 äußerte sich auch in extrem hohen zweistelligen PDI-Werten in Abbildung 7.3-h. anderen Hingegen zeigten die Chitosane Werte zwischen etwa 1.8 und 2.8. Diese deuteten ebenfalls auf eine relativ breite Verteilung der Molmassen hin. ähnelten aber anderen bislang bekannten Literaturwerten (Varum et al., 2005). Da es



Abbildung 7.3-h: Polydispersitäten (PDI= M_W/M_N) der Chitosane, Werte von D3 betrugen 15±3 und 17±3

sich bei Chitosan um ein Produkt aus natürlichen Rohstoffen handelt, sind ohne eine Nachfraktionierung Werte unterhalb etwa 2.0 schwer zu erreichen. Werte oberhalb etwa 3.0 sollten aber nicht erhalten werden, da speziell bei pharmazeutisch eingesetzten Produkten enge Molmassenverteilungen erwünscht sind.

Chitosan	А	В	С	D1	D2	$D3^*$
r _g [nm]	50,2±2,0	29,5±6,8	61,8±1,9	54,7±1,6	34,3±2,7	99,4±8,0
	52,9±2,6	23,8±5,5	60,2±2,4	49,5±2,0	34,5±1,7	99,1±7,9
WR [%]	89,5	85,1	95,9	94,1	87,9	107,9
	94,8	82,0	91,2	90,3	83,1	107,3
[η]	76±1cl/g	37±1cl/g	93±6cl/g	86±1cl/g	50±1cl/g	+

Tabelle 7.3-c: Gyrationsradien r_g , Gesamtwiederfindungsraten WR und intrinsische Viskositäten [η] der Chitosane (^{*}Datenauswertung aufgrund des bimodalen Elugramms erschwert, ⁺nicht bestimmt)

Tabelle 7.3-c zeigt die Gyrationsradien und Wiederfindungsraten der aufgetrennten Chitosane. Erwartungsgemäß fanden sich mit höherer Molmasse ebenfalls höhere Gyrationsradien. Die hohen Wiederfindungsraten zeigten, daß keine relevante Adsorption auftrat und nur ein geringer Teil der Proben den Kanal durch die Membranporen verließ.





Abbildung 7.3-i: Beidseitig logarithmische Darstellung der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ und gewichtsgemittelten Molmasse M_w der jeweiligen Chitosane (D3 ausgeschlossen)

Abbildung 7.3-j: Beidseitig logarithmische Darstellung der Gyrationsradien und Molmassen von Chitosan C, ausgewählte Linearisierungregion dunkel dargestellt

Weiterhin war die Konformation der gelösten Moleküle von Interesse. Die Werte der intrinsischen Viskosität sind in **Tabelle 7.3-c** zu finden. Sie ähnelten denen anderer Autoren (Anthonsen et al., 1993). Die $[\eta]$ -Werte in Relation zu M_W sind in **Abbildung 7.3-i** logarithmisch dargestellt. Daraus wurde folgende MHKS-Gleichung errechnet:

 $[\eta] = 0.039 \cdot M_w^{0.81} \qquad R^2 = 0.986 \qquad (7.3a)$

Der MHKS-Exponent $\alpha = 0.81$ entsprach weder dem Extrem einer starren linearen Struktur noch einem kompakten Theta-Knäuel, sondern eher einem vom Lösungsmittel durchspülten Zufallsknäuel (Einteilung siehe **Tabelle 2.1-a**). Der verwendete Acetatpuffer stellte demnach ein relativ gutes Lösungsmittel dar. Ein Vergleich zu Literaturangaben ist hierbei schwierig, wie bereits beschrieben (Varum et al., 2005). Der errechnete Exponent lag jedenfalls nicht außerhalb des Bereiches der anderen zu findenden Werte (Anthonsen et al., 1993; Ottoy et al., 1996; Fee et al., 2003; Lamarque et al., 2005; Berth et al., 2002).

Abbildung 7.3-j zeigt ein Beispiel für die Molmasse und den Gyrationsradius in doppeltlogarithmischer Darstellung. Aus dem Anstieg konnte aufgrund der Polydispersität der Proben der Flory-Exponent β bestimmt werden. Für einen Vergleich wurden die β -Einzelwerte in theoretische α -Werte transformiert (siehe Gleichung 2.1r). Es ergab sich ein theoretischer Wert von $\alpha = 0.75\pm0.30$. Dieser lag nur knapp unter dem anhand der Viskositätsdaten erhaltenen α von 0.81. Eine ähnliche Differenz zwischen Werten der Lichtstreu- und Viskositätsmessungen findet sich bei (Berth et al., 2002) bzw. (Berth und Dautzenberg, 2002). Dort ist eine flexible wurmähnliche Struktur von Chitosan in Lösung beschrieben. Die Diskrepanz wird mit einem Drainageeffekt der Kettenkonformation erklärt. Weiterhin wurden je nach Chitosantyp unterschiedliche β -Werte und damit unterschiedliche Konformationen erhalten. Diese Einzelwerte konnten nicht mit dem jeweiligen Deacetylierungsgrad korreliert werden, wohl aber mit der mittleren Molmasse (**Abbildung 7.3-k**). Für höhere mittlere Molmassen ergab sich demnach scheinbar eine offenere Kettenkonformation. Dieser Effekt wurde von anderen Autoren bislang nicht beschrieben, der Grund hierfür ist daher nicht sicher bekannt.



Abbildung 7.3-k: Darstellung der mittleren anzahl- (M_N) und gewichtsgemittelten Molmassen (M_W) und fraktalen Dimensionen der Massenfraktale D_m der jeweiligen Chitosane (D3 ausgeschlossen)

Zu beachten ist hierbei aber, daß fast alle anderen Autoren zur Ermittlung der Molekülstruktur auf mehrere Chitosane unterschiedlicher Molmassen angewiesen waren. So wurden z.B. mehrere Proben von unbehandeltem Material (Cölfen et al., 2001), degradiertem Material (Anthonsen et al., 1994) oder reacetyliertem Material (Lamarque et al., 2005) genutzt. Die von uns verwendete Methode erlaubte aber eine Bestimmung von Strukturwerten einer einzelnen Probe, wie nur in wenigen anderen Studien praktiziert (Beri et al., 1993). Zu vermuten ist daher, daß die früher gefundenen Werte meist nur Mittelwerte darstellten.

7.4 Zusammenfassung

Chitosan ist ein Polysaccharid mit zunehmender Bedeutung hinsichtlich der pharmazeutischen Anwendung. Aufgrund der starken Abhängigkeit von den verwendeten natürlichen Ausgangsmaterialien bei der Herstellung ist eine genaue Charakterisierung von größter Bedeutung.

Der Deacetylierungsgrad wurde für jede Substanz mittels 1H NMR bestimmt. Die ermittelten Werte wichen von den Herstellerangaben teilweise beträchtlich ab.

Eine Charakterisierung der Molmassen mit Hilfe von aF-FFF/MALS wurde bei den verwendeten unterschiedlichen Typen und Chargen erfolgreich durchgeführt. Die Variabilität der einzelnen Typen, aber auch der einzelnen Chargen, war sehr hoch. Dies äußerte sich anhand der unterschiedlichen Elutionsprofile, Mittelwerte von M_W, M_N und PDI sowie der Molmassenverteilungen. Die meisten Substanzen zeigten eine monomodale logarithmische Normalverteilung ihrer Molmassen. Nur bei einem Produkt wurde eine ausgeprägte polymodale Verteilung detektiert. Eine Entwicklung von Produkten mit konstanter Qualität ist demnach gerade für den pharmazeutischen Einsatz noch nötig, aber auch ein erklärtes Ziel der Industrie. Vorerst empfiehlt sich eine ständige intensive Prüfung der Qualität.

Weiterhin konnten anhand der Viskositäts- und Lichtstreudaten Erkenntnisse zur Struktur der Chitosanmoleküle in Lösung gewonnen werden. Diese belegten, daß die Chitosane eine nur teilweise vom Lösungsmittel durchspülte Struktur aufwiesen. Die Werte der einzelnen Chitosane unterschieden sich aber stark voneinander. Die gefundenen Unterschiede konnten nicht auf den jeweiligen Deacetylierungsgrad, wohl aber auf die mittlere Molmasse zurückgeführt werden.

8 <u>Charakterisierung von β⁻-bestrahlten Scleroglucanen und</u> <u>Levanen</u>

8.1 <u>Einleitung</u>

Die Bestrahlung von Polysacchariden kann genutzt werden, um Eigenschaften von Substanzen dieser Polymergruppe zu beeinflussen. Hierzu gehören z.B. die Molmasse und die Viskosität in wäßriger Lösung (Ulanski und Rosiak, 1992). Speziell für deren pharmazeutische Anwendung ist dies von Vorteil, da eine gleichbleibende Produktqualität von den Herstellern oft nicht gewährleistet werden kann. Der Grund hierfür ist die starke Abhängigkeit von den meist natürlichen Rohstoffquellen. Eine Bestrahlung kann auch zur Sterilisation von Produkten oder Ausgangsmaterialien genutzt werden. Dies kann z.B. erforderlich sein, wenn die resultierende Arzneiform nicht hitzesterilisiert werden kann. Zur Strahlensterilisation wird meist die laut USP vorgegebene Energiedosis von 25kGy genutzt (USP 31, 2008). Industriell werden meist γ -Strahlung oder beschleunigte Elektronen, also β ⁻ Strahlung, angewendet. Bei beiden Methoden muß aber eine ausreichende Stabilität, d.h. eine genügende Strahlungsresistenz des Gutes und auch der eventuell verwendeten Verpackung, gewährleistet sein. Als Folge der Bestrahlung entstehen zumindest intermediär Radikale, als Folge ist aber auch die Entstehung neuer Verbindungen möglich, z.B. durch Quervernetzungen.

Die Bestrahlung kann unter Luftatmosphäre oder, mit größerem Aufwand, unter Schutzgas erfolgen, da Sauerstoff einen Degradationsprozeß verstärken kann. Eine Übersicht zur Bestrahlung von verschiedenen Polymeren unter unterschiedlichen Bedingungen findet sich z.B. bei (Wündrich, 1989).

Die Literatur hinsichtlich der Bestrahlung von Polysacchariden basiert hauptsächlich auf der Verwendung von γ -Strahlung sowie der Bestrahlung von wäßrigen Lösungen (Ershov, 1998), was auf eine Anwendung im Lebensmittelbereich zurückzuführen ist. Gammastrahlen werden in einigen Ländern verwendet, um z.B. einige Obst- und Gemüsesorten länger haltbar zu machen oder am Auskeimen zu hindern (Wilkinson und Gauld, 1998; Lebensmittelbestrahlungsverordnung, 2000). Die Anwendung dieser Methode ist relativ zeitintensiv, wird aber aufgrund der geringfügigen ionisierenden Wirkung dieser Strahlung vorrangig genutzt. Die geladenen Elektronen der β -Strahlung wirken stärker ionisierend, was den Einsatz bei geernteten Lebensmitteln erschwert. Jedoch zeigt die β -Strahlung Vorteile aufgrund des rascheren Bestrahlungsvorganges und der leichteren Abschirmung der

73

Probenkammer. Hinsichtlich der Bestrahlung von Polysacchariden finden sich aber bislang nur wenige Literaturquellen, unter anderem (Balazs et al., 1959; Charlesby, 1955; Liu und Priou, 2003; Kasaai, 2004; Katayama et al., 2005).

Das Ziel dieser Studie war die Bestrahlung von verschiedenen pharmazeutisch verwendbaren Polysacchariden mit Hilfe von β -Strahlung. Hierfür wurde der Effekt verschiedener Energiedosen auf die Molekülstruktur charakterisiert. ESR wurde genutzt, um die Stabilität der entstandenen Radikale zu erkennen. 1H NMR, 13C NMR und Raman-Spektroskopie dienten der Bestimmung der chemischen Veränderungen. Die mittleren Molmassen und deren Verteilungen wurden mit Hilfe von aF-FFF/MALS/RI oder GPC/MALS/RI charakterisiert. Bei dieser Studie wurden zwei pharmazeutisch interessante aber bislang kaum verwendete Polysaccharide untersucht: Levane und Scleroglucane. Die Daten der Scleroglucane wurden bereits veröffentlicht (Augsten et al. 2008b).

8.1.1 <u>Scleroglucan</u>

Scleroglucan gehört zur Gruppe der Polysaccharide, welche aus $\beta(1\rightarrow 3)$ -verbundenen d-Glucopyranoseeinheiten bestehen. Die Produktion kann durch Bakterien, Algen und Pilze erfolgen. Die Eigenschaften sowie die mannigfaltigen Anwendungen dieser Substanzgruppe werden beschrieben durch (Lee, 2005). Scleroglucan wird von Pilzen hauptsächlich der Gattung Sclerotium produziert, es ist kommerziell erhältlich.



Abbildung 8.1-a: Chemische Struktur von Scleroglucan, bestehend aus $\beta(1\rightarrow 3)$ -verbundenen d-Glucopyranoseeinheiten (A-C) und $\beta(1\rightarrow 6)$ -Monomeren (D) etwa an jeder dritten Hauptketteneinheit

Wie in Abbildung 8.1-a gezeigt, sind die $\beta(1\rightarrow 3)$ -Ketten an etwa jeder dritten Einheit mit einem weiteren Glucopyranose-Monomer $\beta(1\rightarrow 6)$ -verknüpft (Pretus et al., 1991). Für das Molekül in wäßriger Lösung wird hauptsächlich eine extrem starr aufgebaute Tripelhelix beschrieben, jedoch zeigt sich bei höheren Molmassen ein etwas flexibleres Verhalten (Yanaki et al., 1980). Ein Übergang zu Einzelketten geschieht in wäßriger Lösung erst bei sehr hohen pH-Werten. Dieser Vorgang wird auch als "helix melting" beschrieben. Daher differieren die detektierten Molmassen unter- und oberhalb dieses spezifischen pH-Wertes um den Faktor drei (Gawronski et al., 1999). Weiterhin wurden in jüngster Zeit unter speziellen Bedingungen auch zyklische Molekülformen beschrieben (Falch et al., 1999; Sletmoen et al., 2006).

Die Ausbildung von Tripelhelices ist der Grund für die außergewöhnlich hohe Viskosität in wäßriger Lösung und die außerordentliche Resistenz dieses Polysaccharids gegenüber Hydrolyse und Temperatur- oder Elektrolytänderungen. Daher findet Scleroglucan z.B. Anwendung in der Ölindustrie zum Einschluß von Öl in Gelen, zur Stabilisierung in Wasserfarben oder Tinten oder in adhäsiven Formulierungen (Pirri et al., 1992; Halleck, 1969). Im kosmetischen Bereich findet es sich in Haarformgebern, Lotionen oder Cremes (Halleck, 1972). In Japan wird es auch zunehmend verschiedenen Lebensmitteln zugegeben, z.B. zur Qualitätsverbesserung von tiefgefrorenen Produkten (San-Ei Chem. Ind., 1982). Im pharmazeutischen Bereich findet Scleroglucan Anwendung als stabilisierender Hilfsstoff und in Arzneiformen mit der Zielsetzung einer modifizierten Freisetzung (Coviello et al., 2005). Auch der Einsatz als Filmüberzug von Tabletten und Viskositätserhöher in flüssigen Augenarzneien ist bekannt (Lachman und Sheth, 1968; Sheth und Lachman, 1967). Weiterhin wird die Anwendbarkeit als physikalisches Abführmittel erwähnt (Nguyen Cong Duc, 1982).

Aufgrund der speziellen Form der Moleküle werden $\beta(1\rightarrow 3)$ -Glucanen potentielle Effekte in der Tumorrückbildung und in der Behandlung von HIV zugeschrieben (Stokke et al., 1993; Jamas et al., 1998). Speziell für Scleroglucan finden sich ähnliche Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Immunostimulation und antimikrobiellen oder antiviralen Aktivität (Pretus et al., 1991; Mastromarino et al., 1997).

Das vorhandene Interesse am pharmazeutischen Einsatz von Scleroglucan wird auch anhand der Erwähnung in aktuellen Patenten zur Einstellung des Feuchtigkeitsgehalts der Haut (Farwick et al., 2006) oder transmukosalen Applikation von Arzneistoffen (Nystroem et al., 2006) deutlich.

Ein wichtiger Parameter, der viele Eigenschaften von Scleroglucan beschreibt, ist die mittlere Molmasse bzw. deren Verteilung. Eine korrekte Charakterisierung ist insbesondere bei einem pharmazeutischen Einsatz außerordentlich wichtig. Die Molmasse kann Einfluß auf die Viskosität haben. Dies kann sich z.B. bei Hydrogelen mit modifizierter Freisetzung oder aber festen Matrixsystemen, die bei der Arzneistofffreisetzung eine Quellung erfordern, bemerkbar machen (Coviello et al., 2005). Für Scleroglucan wurde weiterhin eine molmassenabhängige Molekülform beschrieben (Yanaki et al., 1980). Dies kann Einfluß auf den pharmakologischen Effekt von $\beta(1\rightarrow 3)$ -Glucanen haben. So wurden bereits Veränderungen in der antitumoralen Aktivität in Mäusen (Yanaki et al., 1983) oder einem immunostimulatorischen Effekt (Stokke et al., 1993) aufgezeigt. Da für Scleroglucan Molmassen im MDa-Bereich beschrieben sind (Pretus et al., 1991), erscheint die aF-FFF als besonders geeignet (Kapitel 2.1). Jedoch finden sich bislang keine Literaturquellen, die eine β -Bestrahlung oder eine Charakterisierung von Scleroglucanen mittels aF-FFF beschreiben.

8.1.2 Levan

Levan gehört zu den Fructanen, die $\beta(2\rightarrow 6)$ - oder $\beta(2\rightarrow 1)$ -verknüpfte Homopolysaccharide aus D-Fructofuranoseeinheiten darstellen. Das bekanntere Fructan Inulin besteht hauptsächlich aus $\beta(2\rightarrow 1)$ -verknüpften Ketten. Levan hingegen beschreibt hauptsächlich mikrobiell gewonnene $\beta(2\rightarrow 6)$ -Fructane. Es sind aber auch $\beta(2\rightarrow 1)$ -Verzweigungen und neben Fructose- auch terminale Glucoseeinheiten vorhanden. Die vereinfachte Struktur ist in **Abbildung 8.1-b** dargestellt.



Abbildung 8.1-b: Chemische Struktur von Levan, bestehend aus $\beta(2\rightarrow 6)$ -verbundenen d-Fructopyranoseeinheiten (teilweise sind zusätzliche $\beta(2\rightarrow 1)$ -Querverzweigungen sowie terminale d-Glucopyranoseeinheiten vorhanden)

Eine detaillierte Beschreibung von Levan inklusive Synthese, Abbau und Verwendung findet sich bei (Rhee et al., 2005). Levane hoher Molmassen bis zu einigen MDa werden z.B. von Bakterien wie Bacillus subtilis, Aerobacter levanicum oder Pseudomonas-Arten produziert. Daneben finden sich Levane auch in Pflanzen, diese weisen aber nur relativ geringe Molmassen auf. Gegenüber anderen Polysacchariden war das Interesse an dieser Substanz bislang aber relativ gering. Dies geht auf die erst jetzt für die Massenproduktion zur Verfügung stehenden Bakterienstämme (Song et al., 1996) und den ersten und bislang einzigen kommerziellen Hersteller weltweit zurück (Realbiotech Co. Ltd., Südkorea).

Pflanzen bilden Levane als Speicherdepot von Kohlenhydraten sowie zum Schutz gegen extreme Temperaturschwankungen. Bakterien synthetisieren diese Substanzen jedoch als Abwehr gegenüber extrazellulären Toxinen. Levane können z.B. ungewöhnlich stark mit den Lipiden der Lipidmembranen interagieren, so daß Proteinen kaum Angriffsfläche geboten wird (Vereyken et al., 2001).

Die Levanmoleküle haben ungewöhnlicherweise einen sphäroidalen Aufbau (Newbrun et al., 1971), sind aber im Gegensatz zu den Inulinen relativ gut wasserlöslich. Vermutlich aufgrund ihres Aufbaus weisen sie eine für ihre Molmasse relativ niedrige dynamische Viskosität auf (Kasapis et al., 1994). Sie können als Feuchthaltemittel in Kosmetika, Hilfsstoff in diätetischen Lebensmitteln oder in geringen Anteilen als Austauschstoff in Futter- und Düngemitteln angewendet werden. Der Einsatz in prebiotischen Lebensmitteln wird dadurch begünstigt, daß ein Abbau durch z.B. Bifidobakterien und Lactobazillen erfolgt, nicht aber durch Staphylococcus aureus oder Escherichia coli (Kang et al., 2000).

Hinsichtlich der pharmazeutischen Anwendung finden sich nur wenige Referenzen. So wurden Levane niedriger Molmasse als Trockenbindemittel in Tabletten eingesetzt, hohe Molmassen führten zu einer retardierten Freisetzung und sind damit als Arzneiformen mit kontrollierter Freigabe von Interesse (Guo et al., 1998). Levane wurden auch als Ersatz für Plasmaexpander vorgeschlagen (Imam und Abd-Allah, 1974). Desweiteren wurden antitumorale und antibakterielle Eigenschaften aufgezeigt (Calazans et al., 2000; Vina et al., 1998), vermutlich aufgrund der Membraninteraktion von Levanen. Es finden sich auch Daten zur antiviralen Aktivität gegenüber AIDS (Clarke et al., 1997).

Die Molmasse bzw. die Molmassenverteilung der Levane kann nicht nur Einfluß auf deren Viskosität, sondern auch auf pharmakologisch relevante Effekte wie z.B. die antitumorale Aktivität haben (Calazans et al., 2000). Bislang wurde z.B. die GPC/RI zur Bestimmung dieser wichtigen Parameter genutzt (Jang et al., 2001; Shih et al., 2005). Da für mikrobielle Levane Molmassen von etwa $2 \cdot 10^6$ bis 10^8 Da bekannt sind (Keith et al., 1991), erscheint die aF-FFF zur Auftrennung als besonders geeignet. Jedoch finden sich bislang keine Literaturquellen, die eine β -Bestrahlung oder eine Charakterisierung von Levan mit Hilfe der aF-FFF beschreiben.

8.2 Materialien und Methoden

8.2.1 Materialien

Eingesetzt wurden die in **Tabelle 8.2-a** gegebenen Polysaccharide. Scleroglucan CS11 wurde vom Hersteller vom Mycelium befreit geliefert, während CS6 noch Reste von Mycelium enthielt. Die beiden Levane unterschieden sich in der vom Hersteller bestimmten Viskosität in wäßriger Lösung.

Tabelle 8.2-a: Verwendete Polysaccharide mit jeweiligen Kürzeln (^amyceliumhaltig, ^bmyceliumbefreit)

Kürzel	Bezeichnung	Hersteller	Charge
CS6	Scleroglucan Actigum CS6 ^a	Degussa AG, Deutschland	L 13299
CS11	Scleroglucan Actigum CS11 GR ^b	Degussa AG, Deutschland	20009584
Levan 050701	Levan 050701, high viscosity	Realbiotech Co. Ltd, Korea	RLP050701
Levan 050801	Levan 050801, low viscosity	Realbiotech Co. Ltd, Korea	RLP050801

8.2.2 Durchführung der β-Bestrahlung

Das jeweils abgewogene Pulver wurde in 10ml-Glasfläschchen luftdicht verschlossen. Die festen Proben wurden mit Energiedosen von 5, 11, 24, 51 und 102kGy bei Raumtemperatur in der im Gefäß enthaltenen Luft β -bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte durch Dr. W. Knolle am Leibnitz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. Leipzig an einem 10MeV linearen Beschleuniger ELEKTRONIKA (TORIY, Russische Förderation). Der Beschleuniger arbeitete im Pulsbetrieb mit einer Wiederholrate von 50Hz mit 4µs-Pulslänge unter Verwendung eines Scanners (Scannerweite bis zu 40cm, Scannerfrequenz 1Hz) und eines bewegbaren Tisches zur Probenbestrahlung. Die Dosis wurde mit einem Graphit-Kalorimeter bestimmt, der typische Fehler der Dosisbestimmung betrug etwa 5%. Es wurden keine weiteren Korrekturen hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung der Polysaccharide vorgenommen.

8.2.3 Radikaldetektion mittels ESR

Das unbehandelte und mit 102kGy bestrahlte Pulver wurden mittels ESR unter Verwendung eines Miniscope MS 200-10 (Magnettech GmbH, Deutschland) über die Lagerungsdauer von maximal 88 Tagen hinweg charakterisiert. Die Proben wurden mit einer Leistung von 5mW in einem Feld von 336mT und einer Detektionsbreite von 10mT bei einer Modulation von 0.1mT vermessen. Sofern nicht anders beschrieben, wurden weitere Charakterisierungsmethoden erst angewandt, sobald kein ESR-Signal mehr detektiert wurde.

8.2.4 <u>Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR</u>

Für die Scleroglucane wurde DMSO-d6 99.8% (Chemotrade GmbH, Deutschland, PS 06185) als Lösungsmittel genutzt. Während der Messung erfolgte ein Erhitzen auf 80°C, um die Tripelhelices aufzulösen und Spektren ausreichender Qualität zu erhalten, analog (Falch et al., 1999; Nardin and Vincendon, 1989). Lösungen der Konzentration von 10mg/ml (1H NMR) bzw. 30mg/ml (13C NMR) wurden eingesetzt.

Die Levane wurden in D₂O 99.8% (Chemotrade Leipzig, Deutschland, Charge 116A87) mit Konzentration von 10mg/ml (1H NMR) bzw. 30mg/ml (13C NMR) bei 27°C vermessen.

Bei einigen Proben erforderte das Einfüllen in die NMR-Röhrchen eine kurzzeitige Erwärmung auf 60-80°C. Die Messungen wurden durchgeführt an einem Varian Inova 500 (Varian Inc., USA) mit 500MHz für 1H NMR und 125MHz für 13C NMR. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von MestRe-C 2.3 (Universidade de Santiago de Compostela, Spanien).

8.2.5 Charakterisierung mittels Raman-Spektroskopie

Die unbehandelten und bestrahlten Pulver wurden mit Hilfe einer FT-Apparatur RFS 100/S (Bruker Optik GmbH, Deutschland) vermessen. Der Nd:YAG-Laser hatte eine Wellenlänge von 1064nm und eine Leistung von 340mW. Die Proben wurden zwischen Wellenzahlen von 10 und 3500cm⁻¹ mit einer Auflösung von 4 mit 200 Durchgängen vermessen. Die Normalisierung der Spektren erfolgte anhand des jeweiligen Maximums bei etwa 2800-3000cm⁻¹.

8.2.6 <u>Herstellung von wäßrigen Lösungen der Polysaccharide</u>

Eine Voraussetzung bei den verwendeten Molmassenbestimmungsverfahren war das Vorliegen von wäßrigen Lösungen. Levan 050801 war in 0.1M NaCl löslich, sowohl in bestrahlter als auch unbestrahlter Form. Das Auflösen konnte jedoch beschleunigt werden durch ein Erwärmen für eine Stunde auf 60°C unter ständiger Bewegung (Echotherm SC20, Torrey Pines Scientific, Inc., USA). Das Levan 050701 mit der höheren Viskosität hingegen konnte zwar in unbestrahlter Form kolloidal unter intensivem Tyndall-Effekt bis mindestens 5mg/ml gelöst werden, zeigte aber in bestrahlter Form bereits bei 2mg/ml ein Ausfallen und Sedimentieren von kleinen, durchsichtigen, scheinbar gelartigen Klümpchen, die sich auch durch ein nachfolgendes Autoklavieren nicht auflösen ließen. Charakterisiert wurden demnach das bestrahlte und unbehandelte Levan 050801 und nur das unbehandelte Levan 050701.

Zur Herstellung von wasserlöslichem Scleroglucan war eine komplexere Prozedur notwendig. Die Scleroglucane wurden bei Raumtemperatur unter Rühren in 0.4M NaOH eingebracht und weitere 60min gerührt. Es folgte eine Neutralisation mit HCl (Cyberscan pH11, Eutech Instruments Europe, Niederlande, Glaselektrode), wobei nach der weiteren Verdünnung mit Wasser und Zugabe von Natriumazid eine Lösung in 0.12M NaCl und 0.2g/l NaN₃ entstand. Die 4mg/ml enthaltende Scleroglucanlösung wurde, wenn nötig, mit selbigem Hintergrundmedium weiter verdünnt. Die Proben von CS6 wurden zur Entfernung des nichtlöslichen Myceliumanteils zusätzlich für 10min bei 4000U/min zentrifugiert (Heraeus Laborfuge 300, Festwinkelrotor, Deutschland). Der Überstand wurde für weitere Bestimmungen genutzt.

Die hergestellten Lösungen der Polysaccharide dienten der Bestimmung der Viskosität sowie der Molmasse.

8.2.7 Viskosimetrie

Nur von den Lösungen der Scleroglucane wurden die dynamischen Viskositäten bestimmt. Es wurde jeweils eine Konzentration von 1mg/ml in 0.12M NaCl mit 0.2g/l Natriumazid mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters (Schott Typ 0a, Deutschland) bei einer Temperatur von 25°C vermessen. Die ermittelten Auslaufzeiten wurden der Hagenbach-Korrektur unterzogen. Die Flüssigkeitsdichten wurden mit Hilfe einer Mohr-Westphalschen Waage bestimmt (Johannes Hammer, Deutschland). Jede Messung wurde dreifach ausgeführt.

8.2.8 Molmassencharakterisierung mittels GPC- und aF-FFF/MALS/RI

Tabelle 8.2-b: Verwendete	e Steuerungsprogramme	der Eclipse F:	w=Kanalhöhe,	V _{Inj} =
Injektionsvolumenstrom,	V _{Probe} =Probenvolumen,	V _C =Querflußvo	olumenstrom,	$V_F =$
Fokussiervolumenstrom				

Methode	Scleroglucane		Levan 050801		Levan 050701		
w [µm]	190			350		350	
Membrantyp	Nac	dir P010F	Nac	dir C005F	Nad	Nadir C005F	
V _{Inj} [ml/min]		0.2		0.2		0.2	
V _{Probe} [µl]		100		100		100	
	min	Vorgang	min	Vorgang	min	Vorgang	
Reinigen	2	$V_{C}=0-2$	2	$V_{C}=0-1$	2	$V_{C}=0.2$	
Fokus	1	$V_F=2$	1	$V_{F}=1$	1	$V_F = 2$	
Fokus+Injektion	2	$V_F=2$	2	$V_{F}=1$	2	$V_F = 2$	
Fokus	1	$V_F=2$	1	$V_{F}=1$	1	$V_F = 2$	
Elution	20	$V_C=2\rightarrow 0$	20	$V_C=1\rightarrow 0$	35	$V_{C}=0.2$	
Elution	10	$V_{C}=0$	10	$V_{C}=0$	5	$V_{C}=0$	
Elution+Injektion	10	$V_{C}=0$	10	$V_{C}=0$	5	$V_{C}=0$	

Die GPC- und aF-FFF/MALS/RI-Messungen wurden mit einem konstanten Detektorflußvolumenstrom von 1ml/min durchgeführt. In der GPC/MALS/RI wurden je 100µl einer Lösung von 0.4mg/ml mit 0.2ml/min in eine GPC-Säule HEMA 40 50·8.0 (MZ-Analysentechnik, Deutschland) injiziert. Die bei der aF-FFF/MALS/RI verwendeten Parameter sind in **Tabelle 8.2-b** zu sehen (Apparatur in **Abbildung 2.1-d**). Für die Scleroglucane wurde eine Lösung der Konzentration von 1mg/ml injiziert. Die Membran bestand aus Polyethersulfon mit einem cut off von 10kDa (Nadir P010F, Microdyn-Nadir GmbH, Deutschland). Die Molmassen wurden nach Debye mit einer Detektorfitanpassung von 2 errechnet. Die erhaltenen Mittelwerte errechneten sich aus mindestens drei Einzelmessungen. Die Levane wurden in einer Konzentration von 2mg/ml injiziert. Die Membran bestand aus regenerierter Cellulose mit einem cut off von 5kDa (Nadir C005F, Microdyn-Nadir GmbH, Deutschland). Die Molmassen des Levans 050801 wurden nach Zimm ausgewertet, die Molmassen von Levan 050701 und die Gyrationsradien aufgrund der extremen Winkelabhängigkeit der Streuung dieser großen Moleküle jedoch nach Berry. Die erhaltenen Mittelwerte errechneten sich aus mindestens drei Einzelmessungen.

Die Brechungsindexinkremente wurden anhand der direkten Injektion von Lösungen einer Konzentration von 4mg/ml mit einem Injektionsvolumenstrom $V_{inj}=0.2ml/min$ in den kalibrierten RI-Detektor mit einem Detektorvolumenstrom $V_D=1ml/min$ bestimmt. Mindestens sechs Einzelmessungen wurden unter

Tabelle 8.2-c: Wassergehalt der untersuchten Polysaccharide anhand von Thermogravimetrie (m/m)

Kürzel	Wassergehalt [%]
CS6	9.6
CS11	10.3
Levan 050701	7.7
Levan 050801	6.5

Berücksichtigung des Wasseranteils durchgeführt. Der Wassergehalt in **Tabelle 8.2-c** wurde mittels Thermogravimetrie (TG 209, Netzsch Gerätebau GmbH, Deutschland) bestimmt. Für CS11 wurde ein Brechungsindexinkrement von 0,146±0,001ml/g erhalten, welches bekannten Literaturwerten wie 0.145ml/g (Pretus et al., 1991) in 0.5M Natriumnitrat und 0.144ml/g (Stokke et al., 1993) in 0.01M NaOH ähnelt. Für Levan 050801 resultierte ein Wert von 0.143±0.001ml/g, welcher dem Literaturwert von 0.142ml/g in destilliertem Wasser vergleichbar ist (Stivala et al., 1975). Der Anteil an ungelöstem Mycelium von CS6 wurde nach selbigem Verfahren anhand der Relation zur Gesamtwiederfindungsrate von CS11 bestimmt. Hierzu wurden Lösungen des Überstandes von CS6 direkt in den RI-Detektor injiziert. Die Messung wurde dreifach durchgeführt.

Zur Auswertung wurde die Software Astra 4.90, Corona 1.4 (Wyatt Technology Europe, Deutschland) sowie Origin 6.1 genutzt (OriginLab Corporation, USA).

8.3 Ergebnisse und Diskussion

8.3.1 Radikaldetektion mittels ESR

Die direkt nach der Bestrahlung und im Verlauf der Lagerung aufgenommenen ESR-Spektren sind in Abbildung 8.3-a gegeben.



Abbildung 8.3-a: ESR-Spektren der mit 102kGy bestrahlten Polysaccharide nach 0, 7, 23, 50 und 88d nach der β -Bestrahlung, erste Ableitung der Intensität (I'_{ESR}) und magnetische Flußdichte (B)

Für alle Polysaccharide resultierten direkt nach der Bestrahlung relative breite Signale von etwa 1.1-2.2mT Peak-zu-Peak-Weite. Auffallend intensive Signale wurden von beiden Levanen erhalten. Wie bei beiden Levanen deutlich erkennbar ist, handelt

Fabelle	8.3-a: Relati	ive Intensitäten d	ler ESR-Sj	pektr	en der mit
102kGy	bestrahlten	Polysaccharide	während	der	Lagerung
von 0, 7	, 23, 50 und	88d nach der β ⁻ -I	Bestrahlun	g	

Polysaccharid	0d	7d	23d	50d	88d
Levan 050701	7	4	1	1	1
Levan 050801	24	14	7	5	5
CS11	1	0	0	0	0
CS6	2	0	0	0	0

es sich um Überlagerungsspektren mehrerer Radikalspezies. Wie aus **Tabelle 8.3-a** erkennbar ist, nahmen die ESR-Intensitäten bei allen Polysacchariden mit zunehmender Lagerdauer ab. Während die Scleroglucane bereits nach 7d bzw. 23d keine quantifizierbaren Spektren mehr zeigten, waren bei beiden Levanen auch nach 88d noch Signalintensitäten nachweisbar. Dies deutete auf langlebige Radikale hin. Nach dieser Zeit wurden die Aufbewahrung der Levane beendet und die weiteren Charakterisierungen durchgeführt. Im Vergleich zur Literatur finden sich β - und γ -bestrahlte Polysaccharide, deren Radikale abhängig vom Typ hauptsächlich kurzlebiger Natur sind (Dilli and Garnett, 1963; Esteves et al., 1999; Stachowicz et al., 1992). Die unbestrahlten Polysaccharide zeigten keine detektierbaren Spektren.

8.3.2 Chemische Charakterisierung mittels 1H und 13C NMR

8.3.2.1 Scleroglucane

Die 1H NMR-Spektren beider Scleroglucane vor und nach der Bestrahlung sind in Abbildung 8.3-b gezeigt.



Abbildung 8.3-b: 1H NMR-Spektren von unbehandeltem und mit 102kGy bestrahltem CS11 und CS6 mit Signalzuordnung

Die angegebene Auswertung orientiert sich an Spektren in selbigem Lösungsmittel und gleicher Temperatur (Nardin and Vincendon, 1989), da sich in der Literatur auch andere Signalzuweisungen finden, wie z.B. nach (Vlachou et al., 2001). Das Spektrum des bestrahlten Scleroglucans entsprach dem der Referenz. Bei hohen chemischen Verschiebungen zeigten sich eindeutig die H-Atome 1A, B, C und D. Zusätzlich fanden sich in diesem Bereich die Signale der 12 OH-Gruppen. Diese zeigten sich aber nicht im Spektrum des unbehandelten Materials, hier war statt dessen nur eine breite Erhöhung der Basislinie zwischen etwa 4 und 5ppm zu erkennen. Derselbe Effekt zeigte sich für die OH-Gruppen des Wassers bei etwa 3.05ppm. Wie bereits für andere Kohlenhydratlösungen beschrieben

(Martin et al., 1999), war diese auffällige Signalverbreiterung zurückzuführen auf den Übergang zwischen schnellen und langsamen Austauschvorgängen der Hydroxylgruppen mit Wassermolekülen. Diese Spektrenveränderung ging demnach nicht auf eine Änderung der chemischen Grundstruktur zurück.

Durch die Signalverbreiterung war eine genaue Quantifizierung des Anteils der $\beta(1\rightarrow 6)$ verknüpften Glucopyranoseeinheiten nicht möglich. Jedoch machten in beiden Spektren die Signale 1C und 1D zusammen etwa 0.5% der gesamten Spektrenintensität zwischen 4 und 5ppm inklusive der OH- und 1A,B-Signale aus. Daher ist davon auszugehen, daß sich der Anteil an $\beta(1\rightarrow 6)$ -Verknüpfungen bedingt durch die Bestrahlung nicht wesentlich veränderte.

Jegliche Signale unterhalb etwa 3.8ppm waren auch in den Referenzspektren von (Nardin and Vincendon, 1989) zu finden, konnten aber aufgrund der Überlappungen nicht eindeutig zugewiesen werden. Daher ermöglicht die Kennzeichnung mit griechischen Buchstaben einen einfachen Spektrenvergleich. Alle Signale des Scleroglucans ließen sich vor und nach der Bestrahlung detektieren, sofern sie nicht vom Wassersignal überdeckt wurden.



Abbildung 8.3-c: 13C NMR-Spektren von unbehandeltem und mit 102kGy bestrahltem CS11 und CS6, teilweise mit Signalzuordnung

Im Gegensatz zu CS11 war CS6 aufgrund seines Myceliumanteils nicht komplett in DMSO löslich. Daher wurde eine weitaus geringere Auflösung der Spektren (siehe Abbildung 8.3-b) erreicht. Jedoch konnten alle Signale auch dort zumindest schwach

detektiert werden. Die Signalverbreiterung wurde in Folge der Bestrahlung nicht vollständig verhindert. Weitere auf gelöste Myceliumkomponeten hinweisende Signale fanden sich nicht.

In **Abbildung 8.3-c** finden sich 13C NMR-Spektren des Scleroglucans CS11. Die bestrahlte Probe zeigte ein Spektrum höherer Qualität. Ein analoger Effekt wurde von anderen Autoren beschrieben, die Scleroglucan aggressiv behandelt hatten (Pretus et al., 1991). Begründen läßt sich dies durch eine Viskositätsänderung der NMR-Lösung, bedingt durch eine Degradation der Polymerketten.

Das Spektrum des bestrahlten CS11 entsprach dem der Referenz von (Vlachou et al., 2001). Alle beschriebenen Signale der Hauptkette (A,B,C) und der $\beta(1\rightarrow 6)$ -Verknüpfungen (D) konnten wiedergefunden werden, die wichtigsten chemischen Verschiebungen finden sich in **Tabelle 8.3-b**. Weitere Signale wurden nicht detektiert, die auf Änderungen der chemischen Grundstruktur wie z.B. weitere Quervernetzungen rückschließen lassen.

Die Spektren von CS6 (**Abbildung 8.3-c**) zeigten keine zusätzlichen nachweisbaren Signale. Das Mycelium wurde demnach trotz Erhitzens vermutlich nicht in Lösung überführt und präzipitierte vollständig.

Tabelle 8.3-b: 13C NMR - Signalzuordnung der bestrahlten und unbehandelten Scleroglucane im Vergleich zu Literaturwerten* von (Pretus et al., 1991), alle in DMSO-d6 (~ Signalqualität nicht ausreichend)

C-Atom	Lit.*	CS 11, 0kGy	CS 11, 102kGy	CS 6, 0kGy	CS 6, 102kGy
1ABCD	103.0	102.6	102.8	102.7	102.8
2ABC	72.5	72.3	72.3	72.4	72.3
3ABC	86.3	(86.2)~	86.1	(86.3)~	86.3
4ABC,6C	68.5	68.4	68.2	68.2	68.2
3D+5ABD	76.2	76.2	76.1	76.2	76.1
6ABD	60.9	60.9	60.9	60.7	60.7

8.3.2.2 Levane

Levane enthalten hauptsächlich $\beta(2\rightarrow 6)$ -glykosidische Verknüpfungen, aber auch $\beta(2\rightarrow 1)$ - Verknüpfungen sind bekannt. Wie bereits bei (Kojima et al., 1993) zu finden ist, lassen sich anhand von 1H NMR-Spektren beide Verknüpfungen erkennen. Diese Verknüpfungen sind den Signalen höchster chemischer Verschiebung zuzuordnen. Anhand der Spektren in **Abbildung 8.3-d** ist daher davon auszugehen, daß beide genutzte Levane in geringer Anzahl zusätzliche $\beta(2\rightarrow 1)$ -Verknüpfungen aufwiesen. Eine Zuordnung der anderen Signale war zusätzlich mit Hilfe von (McIntyre et al., 1991) möglich. Nur die Feinaufspaltung der Signale war aufgrund der Viskosität der jeweiligen Lösung bei beiden Levanen unterschiedlich.



Abbildung 8.3-d: 1H NMR-Spektren der unbehandelten und mit 102kGy bestrahlten Levane



Abbildung 8.3-e: 13C NMR-Spektren der unbehandelten und mit 102kGy bestrahlten Levane

Die 13C NMR-Spektren der Levane vor und nach der Bestrahlung finden sich in **Abbildung 8.3-e**. Abgesehen von viskositätsbedingt abweichenden Signalqualitäten ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Typen.

Die zugehörigen chemischen Verschiebungen in **Tabelle 8.3-c** entsprechen den Werten in der Literatur für andere $\beta(2\rightarrow 6)$ -Levane. Neben den intensiven Hauptsignalen wurden vor sowie nach der Bestrahlung kaum noch nachweisbare zusätzliche Nebensignale gefunden. Diese sind allgemein für Levane bereits bekannt. Sie werden entweder dem geringen Anteil $\beta(2\rightarrow 1)$ -Verknüpfungen oder den terminalen Fructosemolekülen zugesprochen (McIntyre et al., 1991). Damit wurden bedingt durch die Bestrahlung keine Unterschiede in den 13C NMR-Spektren, wie z.B. neue Signale, festgestellt, die auf Quervernetzungen hinweisen.

Tabelle 8.3-c: 13C NMR - Signalzuordnung der bestrahlten und unbehandelten Levane im Vergleich zuLiteraturwerten von *(van Hijum et al., 2001) oder ⁺(Shih et al., 2005)

C-Atom	Lit.1*	$Lit.2^+$	Levan 050701,	Levan 050701,	Levan 050801,	Levan 050801,
			0kGy	102kGy	0kGy	102kGy
C1	59.6	60.7	59.9	59.9	59.9	59.9
C2	104.0	104.2	104.1	104.1	104.1	104.1
C3	76.0	77.0	76.3	76.3	76.3	76.2
C4	74.9	75.7	75.2	75.1	75.1	75.1
C5	80.0	80.5	80.2	80.2	80.2	80.2
C6	63.2	63.6	63.3	63.3	63.3	63.3

8.3.3 Charakterisierung mittels Raman-Spektroskopie

Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie bietet die Raman-Spektroskopie den Vorteil einer Charakterisierung der Pulver, die Notwendigkeit der Herstellung einer Lösung entfiel damit. Im Bereich der Polysaccharide ist die Anzahl verfügbarer Literaturquellen begrenzt, Übersichten hierzu finden sich z.B. bei (Vasko et al., 1971; Workman, 2001b).

Die Spektren der jeweiligen Polysaccharide finden sich in Abbildung 8.3-f und Abbildung 8.3-g. Für Scleroglucan und Levan fanden sich keine entsprechenden Literaturquellen als Referenz. Generell lassen sich aber für Saccharide z.B. nach (Dauchez et al., 1994; Kizil und Irudayarai, 2007) folgende wichtige Spektrenbereiche einteilen:

Zwischen 200 und 600cm⁻¹ oder teilweise auch 700cm⁻¹ zeigen sich für jedes Kohlenhydrat charakteristische Gerüstschwingungen, wobei besonders die schweren Atome Einfluß haben (Fechner, 2005; Sekkal und Legrand, 1993). Daher spielen die relative Zuordnung der Hydroxylgruppen sowie Bindungen C-O-C oder C-O eine große Rolle.

Bei 600 bis 800cm⁻¹ zeigen sich Signale geringerer Intensität, die meist auf die kristalline Struktur des Moleküls zurückzuführen sind.

Der gesamte Bereich zwischen 800 und 1500cm⁻¹ wird auch als Fingerprint-Bereich des Saccharides bezeichnet.

800-950cm⁻¹ beschreibt die "anomerische Region", die Art der glykosidischen Bindung hat starken Einfluß. Bei anderen Polysacchariden fanden sich z.B. Maxima bei 900cm⁻¹ für $\beta(1\rightarrow 4)$ - oder 940cm⁻¹ für $\alpha(1\rightarrow 4)$ -Verknüpfungen (Sekkal et al., 1995).

950-1200cm⁻¹ beinhaltet Valenzschwingungen von C-C und C-O sowie C-C-H und H-C-O. Aber auch Hydroxylgruppen haben hier z.T. deutliche Signale, z.B. C-O-H-Schwingungen finden sich bei etwa 1087cm⁻¹.

 $1200-1500 cm^{-1}$ zeigt Schwingungen von H-C-H, C-O-H sowie H-C-O und C-C-H. Bekannte Wellenzahlen sind z.B. 1260-1280 cm⁻¹ für CH₂OH-Gruppen, 1339 bzw. 1382 cm⁻¹ für C-O-H oder CH₂ bzw. CH₂ oder CH und 1460 cm⁻¹ für CH₂-Gruppen.

2850-3000cm⁻¹ zeigt die Schwingungen der C-H-Valenzen (Workman, 2001a). Dieser Bereich zeigt meist zwei unterschiedliche Maxima unter- bzw. oberhalb 2930cm⁻¹.



Abbildung 8.3-f: Ramanspektren von bestrahltem und unbehandeltem Scleroglucan CS6 und Levan 050801



Abbildung 8.3-g: Ramanspektren von bestrahltem und unbehandeltem Scleroglucan CS11 und Levan 050701

8.3.3.1 Scleroglucane

Die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund fehlender Referenzen mit Literaturquellen anderer Polysaccharide sowie $\beta(1\rightarrow3)$ -verknüpfter Oligosaccharide (Dauchez et al., 1994). Im Bereich der individuellen Grundgerüstschwingungen zeigte Scleroglucan neben kleinen weiteren Signalen eine intensive Bande bei etwa 425cm⁻¹. Im Bereich der anomerischen Region zeigte sich ein charakteristisches Signal bei etwa 890cm⁻¹. Dies ist vermutlich auf die $\beta(1\rightarrow3)$ -Verknüpfungen des Scleroglucans zurückzuführen. Die Signalschulter zu höheren Wellenzahlen läßt sich mit dem geringeren Anteil von $\beta(1\rightarrow6)$ -Bindungen erklären. Aufgrund der fehlenden speziellen Literatur ist diese Zuordnung aber nicht gesichert. Das mittlere Profil der Spektren zwischen 950 und 1500cm⁻¹ ähnelte denen anderer Polysaccharide wie Dextrin oder Stärke (Hendra und Agbenyega, 1993). Es fanden sich Maxima bei 1115, 1375 und 1460cm⁻¹. Der wenig charakteristische Bereich der C-H-Valenzschwingungen zeigte ein relativ symmetrisches globales Maximum bei 2905cm⁻¹.

Die Bestrahlung des Materials führte zu keinen offensichtlichen Veränderungen der Spektren oder die Veränderungen waren zu gering, um sicher detektiert zu werden.

8.3.3.2 Levane

Für beide Fructane zeigten die Spektren erhebliche Unterschiede im Vergleich zu den anderen aus Glucopyranose(derivate)n bestehenden Polysacchariden. Zu Levanen finden sich nur IR-Spektren (Grube et al., 2002), jedoch bislang keine Raman-Spektren als Referenz. Daher erfolgte die Zuordnung anhand von Fructose, zu finden z.B. bei (Barrett, 1981). Unterhalb 600cm⁻¹ zeigten sich neben den beiden charakteristischen Maxima bei 230 und 530cm⁻¹ nur Signale geringfügiger Intensität. Ein weiteres intensives Maximum war bei 625cm⁻¹ zu erkennen, wo bei anderen Sacchariden zwischen 600 und 800cm⁻¹ meist nur schwache Signale vorhanden sind (Dauchez et al., 1994). Das intensive Maximum bei 815cm⁻¹ war entweder auf die $\beta(2\rightarrow 6)$ -Bindung oder auf C-C-Vibrationen zurückzuführen. Das Maximum bei 1065cm⁻¹ ging, wie bei Fructose und anderen Sacchariden (Kacurakova und Mathlouthi, 1996), vermutlich auf Schwingungen der OH-Gruppe zurück. Weitere charakteristische Signale zeigten sich bei 1265, 1345 und 1460cm⁻¹. Das letztere ist vermutlich auf eine winkelabhängige Deformation der CH₂-Gruppe zurückzuführen. Der Bereich der C-H-Valenzschwingungen wies ein globales Maximum bei 2935cm⁻¹ und eine Schulter bei niedrigeren Wellenzahlen auf.

Die Bestrahlung führte zu keinen nachweisbaren Veränderungen der Spektren.

8.3.3.3 Zusammenfassung

Die Bestrahlung hatte insgesamt nur einen geringen bzw. nicht nachweisbaren Effekt auf die Raman-Spektren und damit auf die Schwingungen der Moleküle der untersuchten Polysaccharide. Jedoch muß hierzu einschränkend erwähnt werden, daß sich Raman-Spektren mit Hilfe der hier nicht durchgeführten 2D-FT eventuell noch exakter auswerten ließen. Diese Methode wurde z.B. bei der Bestrahlung von Fructose verwendet (Kizil und Irudayaraj, 2007).

8.3.4 Charakterisierung der Scleroglucane hinsichtlich Viskosität und Molmasse

8.3.4.1 Herstellung von wäßrigen Lösungen

Trotz intensiven Erhitzens durch Autoklavieren bei 121°C für 15min konnten die Scleroglucane nicht in Lösung gebracht werden. Dies ist begründet durch die Molekülkonformation der starren Tripelhelix und der damit verbundenen Einteilung von Scleroglucan nur in die mittlere Polysaccharid-Löslichkeitsklasse (Maache-Rezzoug et al., 2001). Jedoch erlaubt eine alkalische Behandlung den Übergang der Tripelhelix zur Einzelkette. Dieser Bereich wurde von anderen Autoren zwischen 0.2 und 0.3M NaOH (Pretus et al., 1991) oder 0.01M und 0.1M NaOH (Bluhm et al., 1982) angegeben. Andere Autoren beschrieben die Notwendigkeit von 0.43M NaOH oder 0.4MNaOH und 0.15M NaCl (Gawronski et al., 1999), um die Helix aufzulösen, wobei nach der Behandlung noch Molmassen von 0.85MDa detektiert wurden. Sogar nach einer dreistündigen Behandlung in 10g/l NaOH bei 100°C konnte nachfolgend noch Scleroglucan mit 1.56MDa detektiert werden (Pretus et al., 1991). Dies verdeutlicht die außerordentliche Stabilität gegenüber hohen pH-Werten und Hitze.

Trotzdem sollte versucht werden, möglichst milde Bedingungen zur Herstellung der Lösungen zu verwenden, um eine eventuelle Degradation zu minimieren. Nach einer Reihe Vortests wurden die Proben letztendlich mit 0.4M NaOH für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt, geringere pH-Werte führten zum Verbleib von Partikeln oder der Ausbildung von Gelen. Höhere Temperaturen der alkalischen Lösung führten zu einer Dunkelfärbung, die auf einen Abbau hindeutete.

Aufgrund des zusätzlichen Myceliumanteils präzipitierte ein Teil von CS6. Bekannt ist, daß das Mycelium der Gattung Sclerotium hauptsächlich aus löslichen und unlöslichen Kohlenhydraten, Proteinen, Lipiden oder Fettsäuren, Ergosterol, Ribonuklein- und Desoxyribonukleinsäure und Oxalsäure besteht (Punja, 1985; Gottlieb und van Etten, 1966). Der gelöste Anteil von CS6 betrug 83.9±0.8%. Daher bestanden etwa 16% der Pulvers aus ungelöstem Mycelium. Dieser relativ geringe Anteil kann anhand einer Vorreinigung seitens des Herstellers erklärt werden.

8.3.4.2 Viskosimetrie

Wie in **Tabelle 8.3-d** ersichtlich, wurden selbst für die verwendeten stark verdünnten Lösungen der Konzentration von 1mg/ml Viskositätskoeffizienten gefunden, die dem 1.9-2.6fachen Wert des reinen

Tabelle 8.3-d: Viskositätskoeffizienten (ŋ) der dynamischen Viskositäten
beider Scleroglucane in Abhängigkeit von der Energiedosis (ED)

ED [kGy]	η CS11 [cP]	η CS6 [cP]
0	1.705 ± 0.005	2.350 ± 0.008
5	1.375 ± 0.004	1.560 ± 0.003
11	1.359 ± 0.006	1.526 ± 0.008
24	1.245 ± 0.002	1.200 ± 0.003
51	1.113 ± 0.003	1.084 ± 0.003
102	0.988 ± 0.006	1.015 ± 0.002

Wassers entsprachen. Diese relativ hohen Viskositätswerte können anhand der offenen Molekülstruktur der Scleroglucane erklärt werden, welche relativ unabhängig vom verwendeten Lösungsmitteltyp ist (Sletmoen et al., 2006). Unbestrahltes Scleroglucan CS6 zeigte höhere Viskositätswerte als CS11, was sich begrenzt auch bei den bestrahlten Proben fortsetzte. Mit höherer Energiedosis wurden aber geringere Werte für beide Substanzen erhalten. Dieser Einfluß der ionisierenden Strahlung wurde schon bei zahlreichen anderen Polysacchariden detektiert, z.B. bei (Balazs et al., 1959). Weiterhin fand sich ein relativ großer Viskositätsunterschied zwischen den unbestrahlten und mit 5kGy bestrahlten Proben. Dies deutete auf einen starken Strahlungseffekt bereits bei geringen Energiedosen hin.

Zur Herstellung der Lösungen war eine kurzzeitige Aufbewahrung in stark alkalischem Medium notwendig. Um einen Hinweis auf den Einfluß dieser Aufbewahrung zu erhalten, wurde unbestrahltes CS11 vor der Neutralisation für 3 Tage in 0.4M NaOH gelöst aufbewahrt. Von dieser Lösung wurde ein Viskositätskoeffizient von 1.676±0.002cP bestimmt, was sich nur geringfügig vom Wert des unbestrahlten und kurzzeitig alkalisierten CS11 in **Tabelle 8.3-d** unterschied. Dies zeigte die außerordentliche Stabilität des Scleroglucanmoleküls gegenüber einer solchen Behandlung.

8.3.4.3 Molmassencharakterisierung mittels GPC/MALS/RI

Bei der Injektion der gelösten unbestrahlten Proben kam es zu einer Gelierung innerhalb des Kanals selbst während einer kurzen Fokussierung. Dies war begründet im Erreichen der kritischen Konzentration, die zur Gelierung notwendig ist (Sletmoen et al., 2006). Zum Erhalt von Mittelwerten der Molmasse für jede Probe wurden daher GPC/MALS/RI-Messungen durchgeführt. Nur die bestrahlten Proben konnten zusätzlich mittels aF-FFF/MALS/RI charakterisiert werden, um detaillierte Informationen hinsichtlich ihrer Molmassenverteilung zu erhalten.

In Abbildung 8.3-h finden sich die M_W-Werte auf Basis der GPC/MALS/RI. Der $4.8 \pm 0.4 \cdot 10^{6} \text{Da}$ Wert von wurde für unbestrahltes Scleroglucan CS11 und $4.6\pm0.2\cdot10^6$ Da für CS6 erhalten. Beide befanden sich Bereich anderer im $8.5 \cdot 10^5 \text{Da}$ Literaturangaben von etwa (Gawronski et al., 1999) und $5.7 \cdot 10^7$ Da (Yanaki et al., 1980). Eine Abnahme der M_W-Werte war mit zunehmender beobachten. Energiedosis zu Diese Degradation der Polymere erklärte auch die



Abbildung 8.3-h: Gewichtsgemittelte Molmassen (M_W) anhand GPC/MALS/RI der unbestrahlten und bestrahlten Scleroglucane in Abhängigkeit von der Energiedosis

Abnahme der Viskositäten in **Tabelle 8.3-d**, die bessere Qualität der 13C NMR-Spektren in **Abbildung 8.3-c** und das Ausbleiben der Gelierung im Kanal der bestrahlten Proben.

Die folgende Formel wurde zur Beschreibung der Abnahme der Molmassen beider Scleroglucane genutzt (Schnabel, 1978):

$$\frac{1}{M_{W}} - \frac{1}{M_{W0}} = \frac{(\frac{G_{(S)}}{2} - 2G_{(X)})ED}{100N_{A}}$$
(8.3a)

 M_{W0} und M_W sind die gewichtsgemittelten Molmassen vor und nach der Bestrahlung mit der Energiedosis ED, wobei N_A die Avogadro-Konstante darstellt. $G_{(S)}$ beschreibt die Anzahl der Hauptkettenspaltungen und $G_{(X)}$ die Anzahl der intermolekularen Quervernetzungen, beide bezogen auf 100eV der vom Polysaccharid absorbierten Energie. Beide Werte können genutzt werden, um die relative Häufigkeit von Spaltungen (S) oder Quervernetzungen (X) zu charakterisieren.

Die Abnahme von M_W beider Scleroglucane mit zunehmender ED zeigte bereits eine hauptsächlich stattfindende Kettenspaltung mit einem Verhältnis von $G_{(S)}>4G_{(X)}$ an. Weiterhin ist bereits bekannt, daß trockene Polysaccharidpulver bedingt durch die relativ schwachen glykosidischen Bindungen zwischen den einzelnen Monomeren hauptsächlich eine Kettenspaltung zeigen (Schnabel, 1978). Daher ist der Anteil von Quervernetzungen bedingt durch die Bestrahlung vernachlässigbar und die Gleichung 8.3a vereinfacht sich zu:

$$\frac{1}{M_W} - \frac{1}{M_{W0}} = \frac{G_{(S)}ED}{200N_A}$$
(8.3b)

In Abbildung 8.3-i ist die zugehörige Grafik für CS11 gegeben. Der Wert der unbestrahlten Probe wurde bei der linearen Anpassung vernachlässigt, analog zur Betrachtung der Bestrahlung andere Polysaccharide (Ulanski and Rosiak, 1992). Dies ist zurückzuführen auf die Annahme der wahrscheinlichsten Molmassenverteilung von $M_W/M_N=2$ der Ausgangssubstanz für die Gleichung 8.3b, dem die untersuchten Ausgangssubstanzen aber vermutlich nicht genau entsprechen. Jedoch wurde theoretisch und experimentell nachgewiesen, daß eine solche Verteilung mit höherer Energiedosis erhalten wird (Schnabel, 1978), was die Anwendung von Gleichung 8.3b im linearen Bereich gestattet. Eine andere Erklärung bietet der Einfluß des im Polymer gelöst vorliegenden Sauerstoffs auf die Kettenspaltung. Dieser Einfluß ist hauptsächlich bei geringen Energiedosen relevant (Wündrich, 1989). Bei höheren Energiedosen ist der Effekt durch die langsame Nachdiffusion von Sauerstoff in das Polymer während der Bestrahlung limitiert. Dies könnte ebenfalls den großen Unterschied zwischen den Viskositätswerten von 0 und 5kGy in **Tabelle 8.3-d** erklären.



Abbildung 8.3-i: Veränderung der gewichtsgemittelten Molmassen (M_W) mit der Energiedosis für Scleroglucan CS11 und CS6 anhand der Werte von GPC/MALS/RI, Linearisierung mit R²=0.992 bei CS11, 0.997 (0-11kGy) oder 0.996 (24-102kGy) bei CS6

Wie in **Tabelle 8.3-e** gegeben, resultierte für CS11 ein $G_{(S)}$ von $0.33\pm0.02(100\text{eV})^{-1}$, was einem Wert von $0.34\pm0.03\cdot10^{-7}$ mol/J entspricht. Dieser Wert war kleiner als Literaturdaten von anderen Polysacchariden wie Cellulose mit $G_{(S)}=3.3-6.8(100\text{eV})^{-1}$ oder Amylose mit 1.3- $2.7(100\text{eV})^{-1}$ (Schnabel, 1978). Damit deutete auf eine relativ hohe Strahlungsresistenz der Scleroglucane hin. Der Graph von CS6 in **Abbildung 8.3-i** zeigte zwei Bereiche unterschiedlichen Anstiegs. Von 0 bis 11kGy resultierte ein $G_{(S)}$ von $0.30\pm0.02(100\text{eV})^{-1}$, was $0.32\pm0.02\cdot10^{-7}$ mol/J entspricht. Bei höherer ED-Werten field der $G_{(S)}$ aber auf nur $0.022\pm0.002(100\text{eV})^{-1}$, was $0.023\pm0.002\cdot10^{-7}$ mol/J entspricht. Eine Abnahme der Anzahl an

Kettenspaltungen bei höherer ED wurde bereits für andere Polysaccharide wie Cellulose (Sekurada et al., 1971) beschrieben. Der Grund hierfür ist nicht sicher bekannt. Eine zu hohe Polydispersität der Ausgangsprobe könnte Einfluß auf die ermittelten Werte bei niedriger ED haben. Dies könnte den Graphen von CS6 erklären. Es würde aber nicht die Unterschiede zwischen CS6 und CS11 begründen, denn deren ähnliche mittlere Molmassen im unbestrahlten Zustand in **Abbildung 8.3-h** deuten nicht auf Unterschiede in deren Molmassenverteilung hin. Der Hauptunterschied zwischen CS11 und CS6 bestand in deren Myceliumanteil, hier ist also vermutlich auch die Ursache zu suchen. Dieser geringe Anteil scheint für den Schutzeffekt hinsichtlich der Molmassen von CS6 verantwortlich zu sein. Dieser Effekt macht sich auch anhand der bei 102kGy resultierenden Molmassen bemerkbar. Während beide unbestrahlte Pulver ähnliche Molmassen aufwiesen, zeigte bei 102kGy CS11 nur 465±4kDa im Gegensatz zu CS6 mit 1771±107kDa. Wahrscheinlich wirkten also die Produkte der Radiolyse von CS6 bzw. dessen Myceliumanteil dem Effekt der Bestrahlung entgegen. Ein Schutzeffekt bei Biopolymeren ist bereits gut bekannt, z.B. aufgrund bestimmter funktioneller Gruppen (Charlesby, 1967).

Tabelle 8.3-e: Halbwertsdosen der gewichtsgemittelten Molmassen (HWD_{Mw}) und Anzahl der Hauptkettenspaltungen $G_{(S)}$ bzw. Quervernetzungen $G_{(X)}$ aus den linearen Anpassungen in **Abbildung 8.3-i** (^aWerte basieren auf Vermutungen)

Parameter	CS11	CS6
HWD_{Mw}	0-5kGy	11-24kGy
G(S), 5-102kGy	$0.33 \pm 0.02 (100 \text{eV})^{-1}$	-
G(S), 0-11kGy	-	$0.30\pm0.02(100 \text{eV})^{-1}$
G(S), 24-102kGy	-	0.022±0.002(100eV) ⁻¹
G _(X)	$\sim 0^{a}$	$\sim 0^{a}$

Ein weiterer einfacher Parameter zur Beschreibung des Einflusses der Bestrahlung ist die Halbwertsdosis HWD (Wündrich, 1989), hier speziell auf M_W bezogen (HWD_{Mw}). Die HWD_{Mw} zeigte Werte zwischen 0 und 5kGy für CS11 oder zwischen 11 und 24kGy für CS6, was ebenfalls auf eine höhere Strahlungsresistenz von CS6 hinwies. Die zugehörigen ED-Werte können in **Abbildung 8.3-i** bei einem Ordinatenwert von $0.21 \cdot 10^{-6}$ mol/g für CS11 oder $0.22 \cdot 10^{-6}$ mol/g für CS6 gefunden werden. Dies verdeutlicht, daß in der jeweiligen Region eine Berechnung der HWD_{Mw}-Werte anhand der angepaßten Geraden nicht möglich war. Der Vergleich der HWD_{Mw}-Werte erfordert eigentlich gleiche Ausgangsmolmassen vor der Bestrahlung. Bei den Werten beider Scleroglucane war dies strenggenommen nicht der Fall $(4.8\pm0.4\cdot10^6$ Da für CS11, $4.6\pm0.2\cdot10^6$ Da für CS6). So unterstützen die HWD_{Mw}-Werte die Erkenntnisse anhand der $G_{(S)}$ -Werte. Sie sollten aber hinsichtlich ihrer Aussagekraft als geringwertiger eingeschätzt werden.

8.3.4.4 Molmassencharakterisierung mittels aF-FFF/MALS/RI

Zu Beginn wurden aF-FFF/MALS/RI-Messungen mit Hilfe von Membranen aus regenerierter Cellulose durchgeführt. Hierbei adsorbierte die Membran die Proben, was sich in einem ausbleibenden RI-Signal und einer gelartigen Oberfläche zeigte. Unter Verwendung von Membranen aus konnte dieses Problem Polyethersulfon umgangen werden. Die Wiederfindungsraten lagen damit zwischen 81 und 95% für CS11, womit nur ein geringer Teil der Probe 10^4Da unterhalb etwa durch die Membranporen verloren ging. Die



Abbildung 8.3-j: Wiederfindungsraten RI beider bestrahlter Scleroglucane

Wiederfindungsraten von CS6 zwischen 67 und 74% waren geringer, was auf den zuvor entfernten Myceliumanteil zurückzuführen war (**Abbildung 8.3-j**).

Die Elugramme von bestrahltem und unbestrahltem CS11 finden sich in Abbildung **8.3-k**. Bei geringer Energiedosis zeigten sich Molmassen in einem Bereich zwischen etwa 10^5 und über 10⁷Da, was auf sehr breit verteilte Proben rückschließen ließ. Für CS11 waren zwei Hauptfraktionen erkennbar. Eine eluierte bis 15min mit Molmassen zwischen etwa 10⁵ und 10^{6} Da. Die zweite Fraktion eluierte nach mehr als 20min mit Molmassen zwischen etwa 10^{7} und 10⁸Da. Mit höherer Energiedosis der Bestrahlung wurde die Fraktion oberhalb 20min zugunsten der Anteile niedriger Molmasse vermindert. Das heißt, die Bestrahlung mit Elektronen führte hauptsächlich zu einer Spaltung der Ketten hoher Molmasse. Durch diesen Effekt kam es zu einer Verringerung der Breite der Molmassenverteilung. Ein ähnlicher Effekt wurde für Polymere hoher Polydispersität beschrieben, wo mit zunehmender Energiedosis ein theoretischer PDI (M_W/M_N) von 2 erhalten wurde (Schnabel, 1978). Dies ist unabhängig von einer breiteren oder schmaleren Molmassenverteilung des Ausgangsmaterials. Dies wurde auch für Polysaccharide wie z.B. Chitosan gefunden (Ulanski et al., 2002).



Abbildung 8.3-k: Elugramme von bestrahltem Scleroglucan CS11 sowie der für 3 Tage in 0.4M NaOH aufbewahrten unbestrahlten Probe, Linien zeigen die Konzentration und Punkte die zugehörigen Molmassen



Abbildung 8.3-1: Elugramme von bestrahltem Scleroglucan CS6, Linien zeigen die Konzentration und Punkte die zugehörigen Molmassen (^{*} aufgrund von Gelierung nicht bestimmbar)

Der Effekt der Bestrahlung bei CS6 war analog dem bei CS11, wie in Abbildung 8.3-I zu erkennen. Nur zeigte sich ein zusätzlicher dritter Peak bei annähernd 14min mit Molmassen von etwa $5 \cdot 10^5$ bis 10^7 Da. Diese Fraktion wurde durch die Bestrahlung ebenfalls zugunsten kleinerer Molmassen verringert, jedoch in geringerem Ausmaß als bei den hochmolekularen Komponenten. So war dieser Peak bis zu 102kGy noch ersichtlich, was eine höhere Strahlungsresistenz dieser mittleren Molmassen andeutete.

Weiterhin wurde das für 3 Tage in 0.4M NaOH aufbewahrte Scleroglucan CS11 charakterisiert. Der anhand GPC/MALS/RI erhaltene M_W betrug 2006±56kDa. Dieser Wert lag zwischen dem des kurzzeitig behandelten CS11 und dem der 5kGy-Bestrahlung. Beim Vergleich der Elugramme in **Abbildung 8.3-k** zeigten sich gegenüber 5kGy ausgeprägtere hohe Molmassenanteile oberhalb 20min. Die Bestrahlung mit 5kGy hatte demnach einen viel stärkeren Effekt auf das Material als die langzeitige Aufbewahrung in alkalischer Lösung.

Für die nicht vermessbaren unbestrahlten Proben läßt sich damit schlußfolgern, daß sie hauptsächlich Anteile sehr hoher Molmassen über 10⁷Da und nur geringe Anteile unter 10⁶Da enthielten. Die Bestrahlung führte mit höheren Energiedosen zu einer Spaltung insbesondere der hohen Molmassen, was zu einem höheren niedermolekularen Anteil unter etwa 10⁶Da führte. Als Resultat zeigte sich damit auch eine starke Abnahme der Breite der Molmassenverteilung.


8.3.5 Molmassencharakterisierung der Levane mittels aF-FFF/MALS/RI

Abbildung 8.3-m: Elugramme von bestrahltem und unbehandeltem Levan 050801, durchgehende Linien zeigen die Konzentration, gestrichelte Linien die Lichtstreuintensität bei 90° und Punkte die zugehörigen Molmassen

Die Elugramme von unbehandeltem und bestrahltem Levan 050801 sind in Abbildung 8.3-m gegeben. Es zeigte sich ein unvorteilhaftes Detektionsverhalten bedingt durch die extrem breite Molmassenverteilung der Substanz. Bei geringen Elutionszeiten war die Intensität des Streulichtsignals der Probe zu gering. Bei hohen Zeiten verhinderte das geringe RI-Signal eine sinnvolle Auswertung. Da nur der mittlere Teil bei der Berechnung der mittleren Molmassen einbezogen werden konnte, werden die nachfolgend wiedergegebenen Mittelwerte als "scheinbar" bezeichnet.

Bedingt durch die vorhandene Doppeldetektion anhand MALS und RI war es möglich, zwei Fraktionen der Probe zu erkennen. Einerseits beweist das intensive RI-Signal unter etwa 15min die Existenz einer großen Anzahl von relativ kleinen Molekülen unterhalb etwa 10⁶Da. Andererseits konnten anhand des intensiven MALS-Signals bei hohen Elutionszeiten in **Abbildung 8.3-m** Molekülgrößen bis über 10⁸Da und im Bereich von etwa 27min sogar über 10⁹Da nachgewiesen werden. Weiterhin zeigen die Wiederfindungsraten von etwa 90% in **Abbildung 8.3-o**, daß etwa 10% der Probe sogar kleiner als etwa 5·10³Da waren und durch die Membranporen verlorengingen.





Abbildung 8.3-n: Scheinbare anzahl- (M_N) und gewichtsgemittelte (M_w) Molmassen von bestrahltem und unbehandeltem Levan 050801

Abbildung 8.3-o: Scheinbare Polydispersitäten (PDI) und RI-Wiederfindungsraten (WR) von bestrahltem und unbehandeltem Levan 050801

Durch die Bestrahlung verringerte sich die Breite der Molmassenverteilung, was sich in der Abnahme des scheinbaren PDI in **Abbildung 8.3-o** zeigte. Es kam hierbei zu einer verstärkten Entstehung von sehr kleinen Molekülen unterhalb etwa 5·10³Da, worauf die Abnahme der Wiederfindungsrate hinwies. Das Streulichtmaximum bei über 25min in **Abbildung 8.3-m** mit großen Molekülen bis über 10⁹Da nahm mit höherer Energiedosis rapide ab. Bedingt durch die Bestrahlung verschwand auch das lokale RI-Maximum der unbestrahlten Probe bei etwa 23min mit Molmassen von etwa 10⁷Da. Demnach waren hauptsächlich lange Molekülketten von der Bestrahlung betroffen.

Der Einfluß der Bestrahlung auf die scheinbaren mittleren Molmassen geht deutlich aus Abbildung 8.3-n hervor. Levan 050801 wies initial noch einen M_W -Wert von $8.3\pm0.3\cdot10^6$ Da

auf. Dies deckt sich mit bekannten Werten anderer Levane (Keith et al., 1991). Die scheinbaren Molmassen verringerten sich durch die Bestrahlung bis zu 102kGy etwa um den Faktor 25 (M_W) bzw. 14 (M_N).

In **Abbildung 8.3-p** ist die Veränderung der Molmassenverteilungen als Summenplot angegeben. Die fehlende Konvergenz der Graphen gegen die Abszisse verdeutlicht, daß die niedermolekularen Bestandeile nicht detektiert werden konnten. Mit höheren Energiedosen der Bestrahlung verschoben sich die Graphen zu geringeren Molmassen.

Unter der Voraussetzung, daß es praktisch nicht zu Quervernetzungen kam, wurde der $G_{(S)}$ -Wert analog den Scleroglucanen in Kapitel 8.3.4.3 auf Basis



Abbildung 8.3-p: Kumulative Verteilung der scheinbaren Molmassen von bestrahltem und unbehandeltem Levan 050801

Scleroglucanen in Kapitel 8.3.4.3 auf Basis der M_W-Werte bestimmt. Die Berechnung auf Basis der M_N-Werte erfolgte nach folgender Gleichung (Schnabel, 1978):

$$\frac{1}{M_N} - \frac{1}{M_{N0}} = \frac{G_{(S)}ED}{100N_A}$$
(8.3c)

Aber eine sinnvolle Linearisierung der Graphen in **Abbildung 8.3-q** war nur auf Basis der M_N -Werte möglich. Von einer Errechnung von $G_{(S)}$ auf Basis der M_W -Werte mußte hingegen abgesehen werden. Dies ließ sich mit den extrem hohen PDI-Werten des Levans begründen (**Abbildung 8.3-o**). Trotz Bestrahlung lagen diese weit über dem bei der Berechnung vorausgesetzten Wert von 2.0. Daher ist bei dem charakterisierten Levan eigentlich von einer Berechnung der $G_{(S)}$ -Werte abzusehen. Der $G_{(S)}$ -Wert auf Basis des M_N ist aber unanfälliger für hohe PDI-Werte, da Moleküle hoher Molmassen nur geringfügig gewichtet werden. Ein Indiz hierfür ist auch der annähernd lineare Verlauf des Graphen in **Abbildung 8.3-q**. Auf Basis aller M_N -Werte ergab sich somit ein $G_{(S)}$ von $1.12\pm0.05(100eV)^{-1}$, was $1.16\pm0.05\cdot10^{-7}$ mol/J entspricht. Dieser Wert ist kleiner als Literaturdaten anderer Polysacchariden wie Cellulose mit $G_{(S)}=3.3-6.8(100eV)^{-1}$ oder Amylose mit $1.3-2.7(100eV)^{-1}$ (Schnabel, 1978). Er ist aber größer als der Wert der Scleroglucane von maximal etwa $0.33(100eV)^{-1}$ in Kapitel 8.3.4.3. Damit ist die Strahlungsresistenz des Levans geringer als die der charakterisierten Scleroglucane einzuschätzen.



Abbildung 8.3-q: Veränderung der anzahl- (M_N) und gewichtsgemittelten (M_W) Molmassen mit der Energiedosis für Levan 050801, Linearisierung M_N mit R²=0.991

Levan 050701 wurde aufgrund seiner außerordentlich großen Probenbestandteile mit einer anderen Methode aufgetrennt und nach Berry ausgewertet. Ein entsprechendes Elugramm findet sich in **Abbildung 8.3-r**.



Abbildung 8.3-r: Elugramm von unbestrahltem Levan 050701, durchgehende Linien zeigen die Konzentration, gestrichelte Linien die Lichtstreuintensität bei 90° und Punkte die zugehörigen Molmassen, Wiederfindungsrate RI 91.4±1.9%

Der Hauptanteil der Probe zeigte Molmassen von knapp 10^9 Da. Der errechnete scheinbare PDI von 1.03 ± 0.01 und die Lichtstreu- und Konzentrationspeaks bei gleichen Zeiten deuteten auf eine beinahe monomodale Probe hin. Der M_w-Wert betrug $8.22\pm0.03\cdot10^8$ Da (!). Dieser extrem hohe Molmassenwert ist selbst für Polysaccharide ungewöhnlich. Nur geringfügig niedrigere Werte finden sich aber auch in anderen Literaturquellen, z.B. (Keith et al., 1991).

Die ebenfalls durchgeführte Bestrahlung von wäßrigen Lösungen beider Levane resultierte praktisch in einer vollständigen Zerstörung der Ketten. Während der Auftrennung passierte der größte Teil der Probe die Poren der Kanalmembran, lag also unterhalb der Ausschlußgrenze von etwa $5 \cdot 10^3$ Da. Von dem geringen kaum quantifizierbaren Rest eluierten Fraktionen von maximal 10^5 Da.

8.4 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war die Charakterisierung des Einflusses der β -Bestrahlung von Scleroglucanen und Levanen.

Anhand der ESR ließen sich für beide Levane selbst nach langer Lagerung noch vorhandene Radikale nachweisen. Die Radikale der Scleroglucane waren hingegen nur wenige Tage lang stabil. Dennoch konnten bei beiden Polysacchariden keine neu entstandenen Verbindungen mit Hilfe von 1H oder 13C NMR oder Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden. Jedoch werden nach (Lim et al., 1998) geringfügige chemische Modifikationen des Polysaccharidgrundgerüstes speziell in Form der Entstehung von Carbonyl- bzw. Carboxylgruppen erwartet. Somit war der Anteil an Nebenprodukten so gering, daß er nicht mit NMR- und Raman-Spektroskopie detektiert werden konnte. Der nicht lösliche Myceliumanteil von CS6 betrug nur 16% und führte weder zu einer nachweisbaren Veränderung der NMR- noch Raman-Spektren.

Die spezielle Tripelhelixstruktur der Scleroglucane erforderte beim Auflösen eine intermediäre moderate Alkalisierung ohne Erhitzen. Hierbei wurde weitestgehend eine Degradation vermieden. Aufgrund der Struktur von Scleroglucan wies die wäßrige Lösung eine außergewöhnlich hohe dynamische Viskosität auf.

Die Molmassen der Polysaccharide wurden anhand aF-FFF/MALS/RI bzw. GPC/MALS/RI charakterisiert. Die Elugramme der Scleroglucane deuteten auf breit verteilte Proben mit Molmassen zwischen etwa 10^5 und über 10^8 Da hin. Die M_W-Werte der unbestrahlten Scleroglucane betrugen $4.8\pm0.4\cdot10^6$ Da für CS11 und $4.6\pm0.2\cdot10^6$ Da für CS6. Unbestrahltes Levan 050801 wies Molmassen von 10^6 Da bis über 10^9 Da mit einer großen Anzahl relativ kleiner Moleküle auf. Es ergab sich ein M_W-Wert von $8.3\pm0.3\cdot10^6$ Da. Levan 050701 konnte nur in unbestrahlter Form in Lösung gebracht und hinsichtlich der Molmasse vermessen werden. Der M_W-Wert der beinahe monomodalen Probe betrug $8.22\pm0.03\cdot10^8$ Da. Dieser extrem hohe Molmassenwert ist selbst für Polysaccharide ungewöhnlich.

Durch die Bestrahlung wurden hauptsächlich die hochmolekularen Anteile der Proben vermindert, was im wesentlichen einen statistischen Effekt der Bestrahlung darstellt. Damit kam es auch zu einer Verringerung der mittleren Molmassen und der Breite der Molmassenverteilungen. Für beide Scleroglucane wurde die Häufigkeit der Hauptkettenspaltungen in Form des $G_{(S)}$ -Wertes von je etwa $0.3(100 \text{eV})^{-1}$ errechnet. Dieser

Wert war kleiner als Literaturdaten anderer Polysaccharide und deutete auf eine relativ hohe Strahlungsresistenz der Scleroglucane hin. Bei CS6 zeigte sich aber eine Abnahme der Anzahl an Kettenspaltungen bei höherer Strahlungsdosis. Vermutlich wirkten die Produkte der Radiolyse von CS6 bzw. dessen Myceliumanteil dem Effekt der Bestrahlung entgegen. Für Levan 050801 wurde ein $G_{(S)}$ von etwa $1.1(100 \text{eV})^{-1}$ errechnet. Dieser Wert war ebenfalls etwas kleiner als Literaturdaten anderer Polysaccharide. Im Vergleich zu beiden Scleroglucanen ist die Strahlungsresistenz des Levans damit aber geringer einzuschätzen.

Die β -Bestrahlung der Polysaccharide führt demnach anhängig von der verwendeten Energiedosis zur Degradation. Das Verfahren kann genutzt werden, um die Molmasse oder die Viskosität in wäßriger Lösung einzustellen. Bei einer Sterilisation ist mit einer Änderung der Produkteigenschaften zu rechnen.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung in Mehrwinkellichtstreudetektion als Verbindung mit relativ neue Methode der pharmazeutischen Analytik zur Größencharakterisierung kolloidaler Systeme angewendet. Durch ihre geringen Abmessungen sind nanoskalige Arzneiformen in der pharmazeutischen Forschung von besonderem Interesse. Die Partikelgröße und Größenverteilung sind Schlüsselparameter für deren Eigenschaften und Ungefährlichkeit. Die durchgeführten Bestimmungen erfolgten im Vergleich zu weiteren bereits etablierten Analysenmethoden. Hierzu gehörten unter anderem TEM, PCS, SAXS oder im Bereich von Makromolekülen auch die GPC und Viskosimetrie. Viele der hier untersuchten Systeme wurden bislang noch nicht mittels aF-FFF/MALS charakterisiert.

Die untersuchten Latices als Modellsysteme sphärischer Partikel zeigten die funktionierende Auftrennung durch die aF-FFF und exzellente Übereinstimmung der anhand MALS ermittelten Größen mit den Herstellervorgaben. Um pharmazeutisch praxisrelevante Nanosuspensionen zu vergleichen, wurden sphärische Partikel aus verschiedenen Typen von PLGA hergestellt. Bei deren Charakterisierung zeigte die aF-FFF/MALS gegenüber der PCS Vorteile in Form der einfachen Bestimmung der maximalen Partikelgröße und der Errechnung von Größenverteilungen sehr hoher Qualität. Die errechneten Größenmittelwerte zeigten speziell bei eng verteilten Proben eine gute Vergleichbarkeit der Werte beider Methoden.

Als weitere anspruchsvolle Proben wurden wäßrige Lösungen neu synthetisierter amphiphiler Triblock-Copolymere charakterisiert. Hierbei lagen zumeist bimodale Verteilungen bedingt durch beide kolloidale Komponenten, die makromolekularen Monomere als auch die daraus aufgebauten Micellen, vor. Mit Hilfe von aF-FFF/MALS/RI konnten beide Fraktionen erfolgreich voneinander getrennt und aus den jeweiligen Molmassen die Anzahl der Moleküle je Micelle errechnet werden.

Die aF-FFF/MALS zeigte damit besondere Vorteile bei der Charakterisierung von polymodalen bzw. polydispersen Proben. Dies ist auf die Separation der Partikel im Kanal vor der nachfolgenden Größenanalyse der einzelnen Fraktionen zurückzuführen. Hierdurch stellt die Methode eine äußerst sinnvolle Ergänzung zu anderen Lichtstreuverfahren wie z.B. der PCS dar.

Weiterhin wurden verschiedene Polysaccharide mittels aF-FFF/MALS/RI erfolgreich charakterisiert. Die untersuchten Chitosane und ĸ-Carrageenane zeigten stark differierende Mittelwerte der Molmassen und Molmassenverteilungen, d.h. starke Typen- bzw. Chargenvariabilitäten. Dies war vermutlich auf die starke Abhängigkeit von den natürlichen Ausgangsstoffen bei der Herstellung zurückzuführen. Dieses Problem ist für viele Polysaccharide bekannt. Mit Hilfe der aF-FFF können aber zukünftig schwankende Chargenqualitäten vor einem Einsatz leicht erkannt oder eine Entwicklung von Produkten konstanter Qualität ermöglicht werden. Bei den untersuchten Hydroxyethylstärken handelte es sich um Polysaccharide relativ hoher Qualität, da sie auch für die parenterale Anwendung zugelassen sind. Sie unterschieden sich in ihrer mittleren Molmasse, um die gewünschten unterschiedlichen Blutverweilzeiten zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, daß mit höherer mittlerer Molmasse auch breitere Molmassenverteilungen d.h. geringere Herstellungsgüten erhalten wurden. Weiterhin wurden neuartige HES-Komplexe erfolgreich charakterisiert.

Der größte Vorteil der aF-FFF/MALS/RI zeigte sich in der detaillierten Darstellung der jeweiligen Molmassenverteilungen. So folgten die meisten Polysaccharide mit Ausnahme der HES annähernd monomodalen logarithmischen Normalverteilungen. Zusätzlich konnten Erkenntnisse zur Struktur der Moleküle in Lösung gewonnen werden. So zeigte sich bei den Chitosanen eine Abhängigkeit der Struktur von der mittleren Molmasse.

Weiterhin wurde eine Studie zur β -Bestrahlung von Levanen und Scleroglucanen durchgeführt. Beide Polysaccharide wurden bislang noch nicht hinsichtlich der Auswirkung der β -Bestrahlung untersucht. Über längere Zeit stabile Radikale zeigten sich nur bei beiden Levanen. Mit Hilfe von 1H NMR, 13C NMR und Raman-Spektroskopie waren bei beiden Polysacchariden keine neu entstandenen Verbindungen nachweisbar. Die ermittelten M_w-Werte lagen jeweils zwischen 10⁶ und 10⁷Da. Nur eines der Levane wies einen extrem hohen M_w-Wert auf (8.22±0.03·10⁸Da). Die Bestrahlung der Polysaccharide führte hauptsächlich zur Degradation der hochmolekularen Anteile. Damit kam es auch zu einer Verringerung der mittleren Molmassen und der Breiten der Molmassenverteilungen. Die Häufigkeiten der Hauptkettenspaltungen konnten errechnet werden und waren kleiner als Literaturdaten anderer Polysaccharide. Insbesondere die Scleroglucane wiesen eine relativ hohe Strahlungsresistenz auf.

Mit Hilfe der verwendeten Methoden konnte somit nachgewiesen werden, daß durch die β -Bestrahlung die Molmasse und die Viskosität in wäßriger Lösung rasch und einfach eingestellt werden kann. Diese Art der Behandlung von Polysacchariden könnte zukünftig

dazu beitragen, eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Bei einer Sterilisation ist mit einer Änderung der Produkteigenschaften zu rechnen.

die aF-FFF Problembereichen Zukünftig wird vermehrt in der Molmassencharakterisierung, wie z.B. bei Polysacchariden, eingesetzt werden. Auch zur aF-FFF-Auftrennung weiterer nanoskaliger Systeme wie Liposomen, Zellorganelle oder Bakterien existieren bislang nur wenige Studien. Bedingt durch die zunehmende Akzeptanz dieser Technik wird sich dies bald ändern. Weiterhin wird sich das Anwendungsgebiet durch den Einsatz organischer Medien erheblich erweitern. Damit stellt die aF-FFF gerade bei extrem hohen Molmassen eine Alternative zur bisher häufig eingesetzten GPC dar. Hier besteht jedoch noch großer Forschungsbedarf, besonders hinsichtlich der lösungsmittelabhängigen Auswahl stabiler Membranen (Wijnhoven et al., 1996).

10 <u>Literatur</u>

10.1 <u>Alphabetischer Index verwendeter Literaturguellen</u>

Agricola, J. G. B., 1556. De re metallica libri XII, Basel.

- Agricola, J. G. B., da Cimrman, J., Chmelik, J., 2005. Fundamental developments in field-flow fractionation. 12th International Symposium on Field-Flow Fractionation, Brno, Tschechische Republik, 28.-30. August.
- Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E., 1993. Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. J. Pharm. Biopharm. **39**(5), 173-191.
- Amado, E., Augsten, C., M\u00e4der, K., Blume, A., Kressler, J., 2006. Amphiphilic water soluble triblock copolymers based on Poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate) and Poly(propylene oxide): synthesis by atom transfer radical polymerization and micellization in aqueous solutions. Macromol. 39, 9486-9496.
- Andersson, M., Wittgren, B., Wahlund, K.-G., 2001. Ultrahigh molar mass component detected in ethylhydroxyethyl cellulose by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to multiangle light scattering. Anal. Chem. **73**, 4852-4861.
- Anthonsen, M. W., Varum, K. M., Hermansson, A. M., Smidsrod, O., Brant, D. A., 1994. Aggregates in acidic solutions of chitosans detected by static laser light scattering. Carbohydr. Polym. 25, 13-23.
- Anthonsen, M. W., Varum, K. M., Smidsrod, O., 1993. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. Carbohydr. Polym. **22**, 193-201.
- Augsten, C., Mäder, K., 2005. Light scattering for the masses: characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. LCGC North America 9, Suppl. 80.
- Augsten, C., Mäder, K., 2006a. Asymmetrische Fluß Feld-Fluß-Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkel-Lichtstreudetektion. Pharm. Ind. **68**(12), 1420-1428.
- Augsten, C., Amado, E., Blume, A., Kressler, J., M\u00e4der, K., 2006b. Posterbeitrag: Characterizing Different Types of Poly (2,3-dihydroxypropyl methacrylate) - block - Polypropylene oxides Using Flow-FFF and MALS. CRS German Chapter Annual Meeting 2006, Jena, Deutschland, 24. Februar.
- Augsten, C., Klein, S., M\u00e4der, K., 2007a. Posterbeitrag: A new fast quality check of pancreatin: Separating via aF-FFF and Characterizing by MALS/RI. CRS German Chapter Annual Meeting 2007, Freiburg, Deutschland, 22.-23. M\u00e4rz.

- Augsten, C., Mäder, K., 2007b. Field-Flow Fractionation with Multiangle Light Scattering: A Viable Method for the Characterization of Different Types of Hydroxyethylstarches. LCGC The Peak 1, 7-12.
- Augsten, C., Mäder, K., 2007c. Hydroxyethylstarches (HES). LCGC North America 2 (Suppl.), 17.
- Augsten, C., M\u00e4der, K., 2008a. Characterizing Molar Mass Distributions and Molecule Structures of Different Chitosans using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation combined with Multi-Angle Light Scattering. Int. J. Pharm. 351, 23-30.
- Augsten, C., Knolle, W., M\u00e4der, K., 2008b. Characterizing the Influence of Electron Irradiation on Scleroglucan. Carbohydr. Polym. 72, 707-718.
- Augsten, C., Kiselev, M. A., Gehrke, R., Hause, G., M\u00e4der, K., 2008c. A Detailed Analysis of Biodegradable Nanospheres by Different Techniques – A Combined Approach to Detect Particle Sizes and Size Distributions. J. Pharm. Biomed. Anal. 47(1), 95-102.
- Awan, M. A., Dimonie, V. L., Ou-Yang, D., El-Aasser, M. S., 1997. Solution properties of diblock copolymers of polystyrene-block-polybutadiene. Langmuir **13**, 140-146.
- Bahrke, S., Einarsson, J. M., Gislason, J., Haebel, S., Letzel, M. C., Peter-Katalinic, J., Peter, M. G., 2002. Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsource decay mass spectrometry. Biomacromol. 3, 696-704.
- Balazs, E. A., Laurent, T. C., Howe, A. F., Varga, L., 1959. Irradiation of mucopolysaccharides with ultraviolet light and electrons. Radiat. Res. **11**, 149-164.
- Barman, B. N., 2000. Latexes and emulsions. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 347-362.
- Barrett, T. W., 1981. Laser raman spectra of mono-, oligo-, and polysaccharides in solution. Spectrochim. Acta **37A**(4), 233-239.
- Beers, M H., Berkow, R., 2000. Das MSD Manual, 6.Auflage, Urban & Fischer, München.
- Bekersky, I., Fielding, R. M., Dressler, D. E., Kline, S., Buell, D. N., Walsh, T. J., 2001. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of 14C after administration of 14C-cholesterol-labeled AmBisome to healthy volunteers. J. Clin. Pharmacol. 41, 963-971.
- Beri, R. G., Walker, J., Reese, E. T., Rollings, J. E., 1993. Characterization of chitosans via coupled sizeexclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. Carbohydr. Res. 238, 11-26.

- Berth, G., Cölfen, H., Dautzenberg, H., 2002. Physicochemical and chemical characterization of chitosan in dilute aqueous solution. Prog. Colloid Polym. Sci. **119**, 50-57.
- Berth, G., Dautzenberg, H., 1998. Solution behavior of some selected polysaccharides studied preferentially by static light scattering. Rec. Res. Dev. Macromol. Res. **3**, 225-248.
- Berth, G., Dautzenberg, H., 2002. The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. Carbohydr. Polym. 47, 39-51.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1995. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. Lancet **346**, 1085-1087.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1999. Measuring agreement in method comparison studies. Stat. Meth. Med. Res. 8, 135-160.
- Blanton, T. N., Barnes, C. L., Lelental, M., 1999. Preparation of silver behenate coatings to provide low- to midangle diffraction calibration, J. Appl. Cryst. **33**, 172-173.
- Bluhm, T. L., Deslandes, Y., Marchessault, R. H., 1982. Solid-state and solution conformation of scleroglucan. Carbohydr. Res. 100, 117-130.
- Boldt, J., 2004. Hydroxyethylstärke (HES). Wiener Klin. Monatszeitschr. 116(5-6), 159-169.
- Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., Kreuter, J., 2004. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. Eur. J. Pharm. Biopharm. 57, 369-375.
- BP, 2008. British Pharmacopoeia 2008, British Pharmacopoeia Commission Office, London.
- Brockhaus, 2005. Brockhaus in einem Band, 11. Auflage, F.A. Brockhaus, Leipzig, p. 614.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., de Franca, F. P., Lopes, C. E., 2000. Molecular weight and antitumour activity of Zymomonas mobilis levans. Int. J. Biol. Macromol. **27**, 245-247.
- Caldwell, K. D, 2000a. Steric field-flow fractionation and the steric transition. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J.C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 79-94.
- Caldwell, K. D, 2000b. Electrical field-flow fractionation. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 295-312.

- Cauchetier, E., Deniau, M., Fessi, H., Astier, A., Paul, M., 2003. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. Int. J. Pharm. **250**, 273-281.
- Chacon, M., Berges, L., Molpeceres, J., Aberturas, M.R., Guzman, M., 1996. Optimized preparation of poly D,L (lactic-glycolic) microspheres and nanoparticles for oral administration. Int. J. Pharm. **141**, 81-91.
- Charlesby, A., 1955. The degradation of cellulose by ionizing radiation. J. Polym. Sci. 15, 263-270.
- Charlesby, A., 1967. Radiation effects in solid polymers. Radiation research: Proceedings of the 3rd International Congress of Radia, International Association for Radiation Research, Amsterdam, Holland, 265-273.
- Chu, B., Liu, T., 2000. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. J. Nanop. Res. 2(1), 29-41.
- Clarke, M. A., Roberts, E. J., Garegg, P. J., 1997. New compounds from microbiological products of sucrose. Carbohydr. Polym. **34**, 425.
- Cölfen, H., Antonietti, M., 2000. Field-flow fractionation techniques for polymer and colloid analysis, Adv. Polym. Sci. **150**, 67-187.
- Cölfen, H., Berth, G., Dautzenberg, H., 2001. Hydrodynamic studies on chitosans in aqueous solution. Carbohydr. Polym. **45**, 373-383.
- Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F., 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. Eur. J. Pharm. Biopharm. **41**(1), 2-13.
- Coviello, T., Palleschi, A., Grassi, M., Matricardi, P., Bocchinfuso, G., Alhaique, F., 2005. Scleroglucan: a versatile polsaccharide for modified drug delivery. Molecules **10**, 6-33.
- Cremer, K., 2005. Colloidal drug carriers: medical need, market situation and business opportunities. Vortrag im Rahmen des APV-Kurses 684 in Berlin: Colloidal drug carriers and their product applications, 24.-25. November.
- Dauchez, M. Derreumaux, P., Lagant, P., Vergoten, G., 1994. Force-field and vibrational spectra of oligosaccharides with different glycosidic linkages – Part I. Trehalose dihydrate, sophorose monohydrate and laminaribiose. Spectrochim. Acta 50A(1), 87-104.
- De Graaf, R. A., Lameers, G., Janssen, L. P. B. M., Beenackers, A. A. C. M., 1995. Quantitative analysis of chemically modified starches by 1H-NMR spectroscopy. Starch/Stärke 47(12), 469-475.
- Delie, F., 1998. Evaluation of nano- and microparticulate uptake by the gastrointestinal tract. Adv. Drug Del. Rev. **34**, 221-233.

- Dilli, S., Garnett, J. L., 1963. Electron spin resonance (E.S.R) investigations of irradiated carbohydrates. Nature **198** (4884), 984-985.
- Dondi, F., Martin, M. 2000. Physicochemical measurements and distributions from field-flow fractionation. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 103-132.
- Dunn, S.E., Coombes, A.G.A., Garnett, M.C., Davis, S.S., Davies, M.C., Illum, L., 1997. In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. J. Contr. Rel. 44, 65-76.
- Ershov, B. G., 1998. Radiation-chemical degradation of cellulose and other polysaccharides. Russ. Chem. Rev. **67**(4), 315-334.
- Esteves, M. P., Andrade, M. E., Empis, J., 1999. Detection of prior irradiation of dried fruits by electron spin resonance (ESR). Radiat. Phys. Chem. 55, 737-742.
- Falch, B. H., Elgsaeter, A., Stokke, B. T., 1999. Exploring the (1→3)-β-D-glucan conformational phase diagrams to optimize the linear to macrocycle conversion of the triple-helical polysaccharide scleroglucan. Biopolymers 50, 496-512.
- Farwick, M., Maczkiewitz, U., Mecking, M., Schick, G., Wollenweber, U., 2006. Depolymerized scleroglucan for regulating and improving the moisture content of the skin. US Pat. 20,060,275,239.
- Fattal, E., Vauthier, C., 2002. Nanoparticles as drug delivery systems. In: J. Swarbrick, J. C. Boylan, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, second edition, Marcel Dekker, New York, pp. 1864-1882.
- Fechner, P., 2005. Raman-Spektroskopie und atmosphärische Rasterelektronenmikroskopie Charakterisierung pharmazeutischer Hilfsstoffe. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Fee, M., Errington, N., Jumel, K., Illum, L., Smith, A., Harding, S. E., 2003. Correlation of SEC/MALS with ultracentrifuge and viscosimetric data for chitosans. Eur. Biophys. J. **32**, 457-464.
- Felt, O., Buri, P., Gurny, R., 1998. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. Drug Dev. Ind. Pharm. **24**(11), 979-993.
- Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., Riguera, R., 2005. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by 1H-NMR. Carbohydr. Polym. **61**, 155-161.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm. 55, R1-R4.

- Florence, A. T., 1997. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. Pharm. Res. **14**(3), 259-266.
- Florence, A. T., Hussain, N., 2001. Trancytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas. Adv. Drug Del. Rev. **50**, S69-S89.
- Fraunhofer, W., Winter, G., 2004a. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceutics and biopharmaceutics. Eur. J. Pharm. Biopharm. **58**, 369-383.
- Fraunhofer, W., Winter, G., Coester, C., 2004b. Asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering for analysis of gelatin nanoparticle drug carrier systems. Anal. Chem. **76**, 1909-1920.
- Furuta, H., Saito, H., Ishizaki, T., 1997. Determination of molar substitution of hydroxyethyl starch by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Iyakuhin Kenkyu **28**(7), 517-522.

Fussnegger, B., 1999. Poloxamers (1), BASF ExAct 3, 5-6.

Fussnegger, B., 2000. Poloxamers (2), BASF ExAct 4, 7-9.

- Ganachaud, F., Katz, J.L., 2005. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. Chem. Phys. Chem. **6**, 209-216.
- Garcia, H., Ghaly, E. S., 2001. Evaluation of bioadhesive glipizide spheres and compacts from spheres prepared by extruder/marumerizer technique. Pharm. Dev. Techn. **6**, 407-417.
- Gates, G., Harmon, J. P., Ors, J., Benz, P., 2003a. Intra and intermolecular relaxations 2,3-dihydroxypropyl methacrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate hydrogels. Polymer **44**(1), 207-214.
- Gates, G., Harmon, J. P., Ors, J., Benz, P., 2003b. 2,3-Dihydroxypropyl methacrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate hydrogels: gel structure and transport properties. Polymer **44**(1), 215-222.
- Gawronski, M., Park, J. T., Magee, A. S., Conrad, H., 1999. Microfibrillar structure of PGG-glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle x-ray scattering. Biopolymers **50**, 569-578.

Giddings, J. C., 1968. Nonequilibrium theory of field-flow fractionation. J. Chem. Phys. 49(1), 81-86.

- Giddings, J. C., 1993. Field-flow fractionation: Analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. Science **260**, 1456-1465.
- Giddings, J. C., 2000. The field-flow fractionation family: underlying principles. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 3-30.

- Gimbert, L. J., Andrew, K. N., Haygarth, P. M., Worsfold, P. J., 2003. Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF). Trends Anal. Chem. **22**(10), 615-633.
- Glatter, O., 1980. Determination of particle-size distribution functions from small-angle scattering data by means of the indirect transformation method. J. Appl. Cryst. **13**, 7-11.
- Glatter, O., Kratky, O., 1982. Small angle x-ray scattering. Academic Press, London.
- Glatter, O., Sieberer, J., Schnablegger, H., 1991. A comparative study on different scattering techniques and data evaluation methods for sizing of colloidal systems using light scattering. Part. Part. Syst. Charact. 8, 274-281.
- Gottlieb, D., van Etten, J. L., 1966. Changes in fungi with age: chemical composition of rhizoctonia solani and sclerotium bataticola. J. Bacteriol. **91**(1), 161-168.
- Grube, M., Bekers, M., Upite, D., Kaminska E., 2002. Infrared spectra of some fructans. Spectroscopy 16, 289-296.
- Guo, J.-H., Skinner, G. W., Harcum, W. W., Barnum, P. E., 1998. Pharmaceutical applications of naturally occuring water-soluble polymers. Pharm. Sci. Technol. Today 1, 254-261.
- Halleck, F. E., 1969. Paint composition containing polysaccharides. US Pat. 3,447,940.
- Halleck, F. E., 1972. Cosmetic compositions employing water-soluble polysaccharides. US Pat. 3,659,025.
- Hansen, M., Klein, T., 2001. Feldflussfraktionierung Das bestgehütete Geheimnis in der Bioanalytik? GIT Labor-Fachz. 5, 506-510.
- Hartmann, U., 2006. Faszination Nanotechnologie, 1.Auflage. Elsevier GmbH, München.
- Hassellöv, M., von der Kammer, F., Beckett, R., 2007. Characterisation of aquatic colloids and macromolecules by field-flow fractionation. Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterisa 5, 223-276.
- Hendra, P. J., Agbenyega, J. K., 1993. The raman spectra of polymers. John Wiley and Sons, New York.
- Hirai, A., Odani, H., Nakajima, A., 1991. Determination of degree of deacetylation of chitosan by 1H NMR spectroscopy. Polym. Bull. **26**, 87-94.
- Hoepfner, E.-M., Reng, A., Schmidt, P. C., 2002. Chitosan. In: H. P. Fiedler, Fiedler Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, 5th edition, E. Cantor Verlag, Aulendorf, pp. 423-427.

Hoffman, A. S., 2002. Hydrogels for biomedical applications. Adv. Drug Del. Rev. 54, 3-12.

- Holpert, C., 1999. Chitosanhydrochlorid. In: F. von Bruchhausen, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 5th edition, Springer-Verlag, Berlin, pp. 241-242.
- Huglin, M. B., 1989. Specific refractive index increments of polymers in dilute solution. In: J. Brandrup, E. H. Immergut, Polymer Handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 463-474.
- Hünerbein, A., Augsten, C., Mäder, K., Neubert, R. H. H., 2006. Posterbeitrag: The adhesion of PLGA Nanoparticles studied with a new Cell surface model based on Quartz crystal microbalance. 20th EUROSENSORS Conference Anniversary, Göteborg, Schweden, 17.-20.September.
- Illum, L., 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm. Res. 15(9), 1326-1331.
- Imam, G. M., Abd-Allah, N. M., 1974. Fructosan, a new soil conditioning polysaccharide isolated from the metabolites of bacillus polymyxa AS-I and its clinical applications. Egypt. J. Bot. 17, 19-26.
- Iwamuro, Y., 1995. Application of hydroxy ethyl starch to paper industry. Kami Parupu Gijutsu Taimusu **38**(7), 23-5.
- Jamas, S., Easson, D. D., Ostroff, G. R., 1998. Underivatized, aqueous soluble β (1-3) glucan, composition and method of making same. US Pat. 5,817,643.
- Jang, K. H., Song, K. B., Kim, C. H., Chung, B. H., Kang, S. A., Chun, U. H., Choue, R. W., Rhee, S. K., 2001. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from zymomonas mobilis. Biotechnol. Lett. 23, 339-344.
- Jess, K., Steckel, H., 2007. The extrusion and spheronization of chitosan. Pharm. Technol. Eur. 19(7), 21-30.
- Johann, C., 2004. Absolute macromolecular characterization with fractionation: a viable alternative to traditional separation methods. Am. Lab. **36**(23), 12-14.
- Kacurakova, M., Mathlouthi, M., 1996. FTIR and laser-raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. Carbohydr. Res. **284**, 145-157.
- Kang, S. K., Park, S. J., Lee, J. D., Lee, T. H., 2000. Physiological effects of levanoligosaccharide on growth of intestinal microflora. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29, 35-40.
- Kasaai, M. R., 2004. Photodegradation and photocrosslinking of polysaccharides. Rec. Res. Dev. Photochem. Photobiol. 7, 201-217.

- Kasapis, S., Morris, E. R., Gross, M., Rudolph, K., 1994. Solution properties of levan polysaccharide from pseudomonas syringae pv. phaseolicola and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. Carbohydr. Polym. 23, 55-64.
- Kassalainen, G. E., Williams, S. K. R., 2003. Coupling thermal field-flow fractionation with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of synthetic polymers. Anal. Chem. 75, 1887-1894.
- Katayama, T., Tada, M., Todoriki, S., Nakauma, M., 2005. Effects of irradiation by electron beam on physical properties of food polysaccharides. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 52(8), 373-379.
- Kato, Y., Onishi, H., Machida, Y., 2003. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. Curr. Pharm. Biotech. **4**(5), 303-309.
- Keith, K., Wiley, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D., Mayer, J., Kaplan, D., 1991. Continous culture system for production of biopolymer levan using erwinia herbicola. Biotechnol. Bioeng. **38**, 557-560.
- Kizil, R., Irudayaraj, J., 2007. Rapid evaluation and discrimination of γ-irradiated carbohydrates using FT-raman spectroscopy and canonical discriminant analysis. J. Sci. Food Agricult. **87**, 1244-1251.
- Knutsen, S. H., Grasdalen, H, 1992. The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for 1H-NMR spectroscopy, Carbohydr. Res. **229**, 233-244.
- Koch, M.H.J., Svergun, S.I., Gabriel, A., Goderis, B., Unruh, T., 2001. Recent developments in synchrotron radiation x-ray scattering on (bio)-polymers. Polym. Mat.: Sci. Eng. **85**, 173.
- Kojima, I., Saito, T., Iizuka, M., Minamiura, N., Ono, S., 1993. Characterization of levan produced by serratia sp. J. Ferment. Bioeng. **75**(1), 9-12.
- Korgel, B. A., van Zanten, J. H., Monbouquette, H. G., 1998. Vesicle size distributions measured by flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering. Biophys. J. **74**, 3264-3272.
- Kratky, O., 1982. A Survey. In: O. Glatter und O. Kratky, Small angle x-ray scattering, Academic Press, London, pp. 3-13.
- Kreuter, J., 1992. Nanoparticles preparation and applications. In: M. Donbrow, Microparticles and nanoparticles in medicine and pharmacy, CRC Press, London, 125-148.
- Krohn, S., 2003. Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von kurzkettigen Chitosanen. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

- Kulicke, W.-M., Heinze, T., 2006. Improvements in polysaccharides for use as blood plasma expanders. Macromol. Symp. 231, 47-59.
- Kulicke, W.-M., Roessner, D., Kull, W., 1993. Characterization of hydroxyethyl starch by polymer analysis for use as a plasma volume expander. Starch/Stärke **45**(12), 445-450.
- Kumar, M. N. V. R., Bakowsky, U., Lehr, C. M., 2004. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. Biomaterials 25(10), 1771-1777.
- Lachman, L., Sheth, P., 1968. Ophthalmic solution containing a poly(1,3-β-glucoside). US Pat. 3,415,929.
- Lamarque, G., Lucas, J.-M., Viton, C., Domard, A., 2005. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: Role of various structural parameters. Biomacromol. **6**, 131-142.
- Lamprecht, A., Schäfer, U., Lehr, C.-M., 2001. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. Pharm. Res. **18**(6), 788-793.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A., N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M. D., Gupta, A., 2003. A validated 1H-NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. J. Pharm. Biomed. Anal. 32, 1149-1158.

Lebensmittelbestrahlungsverordnung (LMBestrV), 2000. Stand 14.12.2000.

- Lee, I.-Y., 2005. Curdlan. In: A. Steinbüchel and S. K. Rhee, Polysaccharides and Polyamides in the food industry. Properties, Production and Patents, Wiley VCH, New York, pp. 209-232.
- Lill, N., Tertsch, K., 1996. Injizierbare Arzneiformen auf Basis biodegradabler Polymere. PZ Prisma 1, 60-68.
- Lim, L.-Y., Khor, E., Koo, O., 1998. γ Irradiation of chitosan. J. Biomed. Mat. Res. B 43(3), 282-290.
- Litzen, A., Walter, J. K., Krischollek, H., Wahlund, K.-G., 1993. Separation and quantification of monoclonal antibody aggregates by asymmetrical flow field-flow fractionation and comparison to gel permeation chromatography. Anal. Biochem. **212**, 469-480.
- Liu, M.-K., Li, P., Giddings, J. C., 1993. Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field-flow-fractionation. Protein Sci. 2, 1520-1531.
- Liu, L. Z., Priou, C., 2003. Molecular weight reduction of polysaccharides by electron beams. Pat. WO 2004/000885.

- Liu, Y. M., Xu, G. Y., 2002. Positional and quantitative characterization of the hydroxyethyl groups in hydroxyethyl starch by GC/MS or NMR. Chin. Chem. Lett. **13**(11), 1097-1099.
- Maache-Rezzoug, Z., Rezzoug, S. A., Allaf, K., 2001. Kinetics of drying and hydration of the scleroglucan polymer. A comparative study of two conventional drying methods with a new drying process: dehydratation by successive pressure drops. Drying Technol. **19**(8), 1961-1974.
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J.C., 2004. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. Eur. J. Pharm. Biopharm. 57, 1-8.
- Mao, S., Augsten, C., M\u00e4der, K., Kissel, T., 2007. Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical Flow Field-Flow-Fractionation: a comparison with traditional methods. J. Pharm. Biomed. Anal. 45, 736-741.
- Markland, P., Yang, V.C., 2002. Biodegradable polymers as drug carriers. In: J. Swarbrick, J. C. Boylan, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker, New York, pp. 136-155.
- Martin, D. R., Ablett, S., Darke, A., Sutton, R. L., Sahagian, M., 1999. Diffusion of aqueous sugar solutions as affected by locust bean gum studied by NMR. J. Food Sci. **64**(1), 46-49.
- Mastromarino, P., Petruzziello, R., Macchia, S., Rieti, S., Nicoletti, R., Orsi, N., 1997. Antiviral activity and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. J. Antimicrob. Chemother. **39**, 339-345.
- McCreery, R. L., 2000. Raman spectroscopy for chemical analysis. In: J. D. Winefordner, Chemical Analysis Volume 157, Wiley Interscience, New York.
- McIntyre, D. D., Vogel, H. J., 1991. Nuclear magnetic resonance studies of homopolysaccharides related to starch. Starch/Stärke **43**(2), 69-76.
- Molpeceres, J., Guzman, M., Aberturas, M.R., Chacon, M., Berges, L., 1996. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. J. Pharm. Sci. 85(2), 206-213.
- Moon, M. H., 2000. Sedimentation field-flow fractionation. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 225-238.
- Motwani, S. K., Khar, R. K., Ahmad, F. J., Chopra, S., 2006. Effect of solvents quality on determination of particle size and polydispersity of nanoparticles. J. Exp. Nanosci. 1(3), 307-316.

- Müller, J. J., Lukowski, G., Kröber, R., Damaschun, G., Dittgen, M., 1994. Acrylic acid copolymer nanoparticles for drug delivery: structural characterization of nanoparticles by small-angle x-ray scattering, Coll. Polym. Sci. 272, 755-769.
- Müller, R. H., Hildebrand, G. E., 1998. Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Müller, R. H., Schumann, R., 1996. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Murakami, H., Kawashima, Y., Toshiyuki, N., Tomoaki, H., Takeuchi, H., Kobayashi, M., 1997. Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) an the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle. Int. J. Pharm. 149, 43-49.
- Mutlu, G. M., Green, D., Bellmeyer, A., Baker, C. M., Burgess, Z., Rajamannan, N., Christman, J. W., Foiles, N., Kamp, D. W., Ghio, A. J., Chandel, N. S., Dean, D. A., Sznajder, J. I., Budinger, G. R. S., 2007. Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway. J. Clin. Invest. 117, 2952-2961.
- Nakata, Y., Takahashi, Y., 2000. Nanoparticles consisting of biodegradable ABA triblock copolymers containing poly(L-lactic acid) A-block attached to cental polyoxyethylene B-blocks. Drug Deliv. Syst. **15**(5), 449-456.
- Nardin, R., Vincendon, M., 1989. Isotopic exchange study of the scleroglucan chain in solution. Macromolecules 22, 3551-3554.
- Newbrun, E., Lacy, R., Christie, T. M., 1971. The morphology and size of the extracellular polysaccharide from oral streptococci. Arch. Oral Biol. **16**, 863-872.
- Nguyen Cong Duc, A., 1982. Glucosylglucans and their use in gastroenterology, especially in the treatment of colon disorders. Eur. Pat. Appl. 45,338.
- Nitzsche, R. 1997. Partikelgrößenmessung im Submikronbereich, CLB Chemie in Labor und Biotechnik **48**(10), 422-427.
- No, K. H., Myers, S. P., 1997. Preparation of chitin and chitosan. In: R. A. A. Muzzarelli, M. G. Peter, Chitin Handbook, Atec Edizioni, Grottammare, pp. 475-489.
- Nystroem, C., Fransen, N., Bjoerk, E., 2006. Pharmaceutical compositions useful in the transmucosal administration of drugs. Patent WO 2006/085101.

- Opinion of the scientific committee on food on carrageenan, 2003. European commission health & consumer protection directorate-general, SCF/CS/ADD/EMU/199 Final.
- Ottoy, M. H., Varum, K. M., Christensen, B. E., Anthonsen, M. W., Smidsrod, O., 1996. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. Carhohydr. Polym. **31**, 253-261.
- Peter, M. G., 2005. Chitin and chitosan from animal sources. In: A. Steinbüchel, S. K. Rhee, Polysaccharides: Polysaccharides and polyamides in the food industry, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp. 119-208.
- Ph. Eur. 6.0, 2008. European Pharmacopoeia sixth edition, Council of Europe, Strasbourg.
- Picker-Freyer, K. M., Brink, D., 2006. Evaluation of powder and tableting properties of chitosan. AAPS Pharm. Sci. Tech. 7(3), 75.
- Pirri, R., Gadioux, J., Rivenq, R., 1992. Crosslinking of scleroglucan gels for the oil industry. Eur. Pat. Appl. 484,217.
- Porod, G., 1982. General Theory. In: O. Glatter und O. Kratky, Small angle x-ray scattering, Academic Press, London, pp. 17-51.
- Pretus, H. A., Ensley, H. E., McNamee, R. B., Jones, E. J., Browder, I. W., Williams, D. L., 1991. Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. J. Pharmacol. Exp. Ther. 257(1), 500-510.
- Prokof'ev, E. P., Yurin, O. A., 1990. Determination of the degree of substitution and molar substitution in hydroxyethylated starches by using proton NMR. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal **24**(7), 82-84.
- Punia, Z. K., 1985. The biology, ecology, and control of sclerotium rolfsii. Ann. Rev. Phytopath. 23, 97-127.
- Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Doelker, E., Fessi, H., 1997. A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. Coll. Polym. Sci. 275, 640-647.
- Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H., Doelker, E., 1998. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. Drug Dev. Ind. Pharm. 24(12), 1113-1128.
- Ratanathanawongs-William, S. K., 2000. Flow field-flow fractionation. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 257-278.
- Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Casolari, S., 2002. Bacteria sortine by field-flow fractionation. Application to whole cell Escherichia coli vaccine strains. Anal. Chem. **74**, 4895-4904.

- Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Nichelini, E., Roda, A., 2005. Field-flow fractionation and biotechnology. Trends Biotechnol. **23**(9), 475-483.
- Rhee, S.-K., Song, K.-B., Kim, C.-H., Park, B.-S., Jang, E.-K., Jang, K.-H., 2005. Levan. In: A. Steinbüchel, S.K. Rhee, Polysaccharides: Polysaccharides and polyamides in the food industry, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp. 323-349.
- Richardson, S. C. W., Kolbe, H. V. J., Duncan, R., 1999. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. Int. J. Pharm., 178(2), 231-243.
- Rinaudo, M., Dung, P. L., Gey, C., Milas, M., 1992. Substituent distribution on O,N-carboxymethylchitosans by 1H and 13C N.M.R.. Int. J. Biol. Macromol. **14**, 122-128.
- Roberts, G. A. F., 1997. Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product. Adv. Chit. Sci. **2**, 22- 31.
- Roldo, M., Hornof, M., Caliceti, P., Bernkop-Schnürch, A., 2004. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis an in vitro evaluation. Eur. J. Pharm. Biopharm. **57**, 115-121.
- Rübe, A., Hause, G., Mäder, K., Kohlbrecher, J., 2005. Core-shell structure of miglyol/poly(D,Llactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. J. Contr. Rel. **107**, 244-252.
- Sandler, N., Savolainen, M., Saupe, A., Strachan, C., Rades, T., 2007. Applications of Raman spectroscopy in aqueous environments. Pharm. Technol. Europe **19**(2), 24-29.
- San-Ei Chemical Industries Ltd., 1982. Improvement of frozen food quality with sclerogum. Japan Kokai Tokkyo Koho 57, 163, 451.
- Schimpf, M. E., 2000a. Resolution and fractionating power. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 71-78.
- Schimpf, M. E., 2000b. Thermal field-flow fractionation. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Fieldflow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 239-256.
- Schimpf, M. E., 2000c. Experimental field-flow fractionation: overview. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 185-188.
- Schmidt, P. W., 1989. Use of scattering to determine the fractal dimension. In: D. Avnir, The fractal approach to heterogeneous chemistry, Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 67-79.

- Schmidt, A. G., Wartewig, S., Picker, K. M., 2003. Potential of carrageenans to protect drugs from polymorphic transformation. Eur. J. Pharm. Biopharm. 56, 101-110.
- Schnabel, W., 1978. Degradation by high energy radiation. In: H. H. G. Jellinek, Aspects of degradation and stabilization of polymers, Elsevier Scientific Publishing, New York, pp. 148-189.
- Schuhmann, R., Müller, R. H., 1995. Analytik disperser Systeme mit Streulichtverfahren, Pharm. Ind. 57(7), 579-584.
- Schure, M. R., Schimpf, M. E., Schettler, P. D., 2000. Retention normal mode. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 31-48.
- Sekkal, M., Dincq, V., Legrand, P., Huvenne, J. P., 1995. Investigation of the glycosidic linkages in several oligosaccharides using FT-IR and FT Raman spectroscopies. J. Mol. Struct. **349**, 349-352.
- Sekkal, M., Legrand, P., 1993. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500-100cm⁻¹ spectral range. Spectrochim. Acta **49A**(2), 209-221.
- Sekurada, I., Okada, T., Kaji, K., 1971. Radiation-induced scission of cellulose molecules. Nippon Genshiryoku Kenkyusho Nempo, 16-21.
- Serumwerk Bernburg AG, 2003. Lokkoidaler Volumenersatz aus Bernburg: Kompendium. Druckerei Wolfram, Dresden-Pappritz.
- Sheth, P., Lachman, L., 1967. The coating of tablets. Fr. Pat. 1,480,874.
- Shih, I.-L., Yu, Y.-T., Shieh, C.-J., Hsieh, C.-Y., 2005. Selective production and characterization of levan by bacillus subtilis (natto) takahashi. J. Agric. Food Chem. **53**, 8211-8215.
- Sletmoen, M., Geissler, E., Stokke, B. T., 2006. Determination of molecular parameters of linear and circular scleroglucan coexisting in ternary mixtures using light scattering. Biomacromolecules **7**, 858-865.
- Song, K. B., Belghith, H., Rhee, S. K., 1996. Production of levan, a fructose polymer, using an overexpressed recombinant levansucrase. Ann. N. Y. Acad. Sci. **799**, 601-607.
- Stachowicz, W., Strzelczak-Burlinska, G., Michalik, J., Wojtowicz, A., Dziedzic-Goclawska, A., Ostrowski, K., 1992. Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy for control of irradiated food. J. Sci. Food Agric. 58(3), 407-415.
- Stivala, S. S., Bahary, W. S., Long, L. W., Ehrlich, J., 1975. Levans. II. Light-scattering and sedimentation data of streptococcus salvitarius levan in water, Biopolym. 14, 1283-1292.

- Stokke, B. T., Elgsaeter, A., Hara, C., Kitamura, S., Takeo, K. (1993). Physicochemical properties of (1→6)branched (1→3)-β-D-glucans. 1. Physical dimensions estimated from hydrodynamic and electron microscopic data. Biopolymers 33, 561-573.
- Stolnik, S., Dunn, S.E., Garnett, M.C., Davies, M.C., Coombes, A.G.A., Taylor, D.C., Irving, M.P., Purkiss, S.C., Tadros, T.F., Davis, S.S., Illum, L., 1994. Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethyleneglycol) copolymers. Pharm. Res. 11(12), 1800-1808.
- Stolnik, S., Illum, L., Davis, S.S., 1995. Long circulating microparticulate drug carriers. Adv. Drug Del. Rev. 16, 195-214.
- Teixeira, J., 1994. Neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies. Higher european research course for users of large experimental systems, Grenoble, France, 24.März.
- Thielking, H., Kulicke, W.-M., 1996. On-line coupling of flow field-flow fractionation and multiangle laser light scattering for the characterization of macromolecules in aqueous solution as illustrated by sulfonated polystyrene samples. Anal. Chem. **68**, 1169-1173.
- Thommes, M., 2006. Systematische Untersuchungen zur Eignung von κ-Carrageenan als Pelletierhilfsstoff in der Feuchtextrusion/Sphäronisation. Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Tobacman, J. K., 2001. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments, Environ. Health Perspect. **109**(10), 983-994.
- Ulanski, P., Rosiak, J., 1992. Preliminary studies on radiation-induced changes in chitosan. Radiat. Phys. Chem. **39**(1), 53-57.
- Ulanski, P., Janik, I., Kadlubowski, S. Kozicki, M., Kujawa, P., Pietrzak, M., Stasica, P., Rosiak, J. M., 2002. Polymeric biomaterials synthesized by radiation techniques – current studies at IARC, Poland. Polym. Adv. Technol. **13**, 951-959.
- USP 31, 2008. The United States Pharmacopoeia The National Formulary, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville.
- Vandervoort, J., Ludwig, A., 2002. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. Int. J. Pharm. 238, 77-92.
- Van de Velde, F., De Ruiter, G. A., 2005. Carrageenan. In: A. Steinbüchel, S. K. Rhee, Polysaccharides and polyamides in the food industry: Volume 1: Polysaccharides, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 85-113.

- Van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., Cerezo, A. S., 2002. 1H and 13C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. Trends Food Sci. Tech. **13**, 73-92.
- Van Hijum, S.A.F.T., Bonting, K., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L., 2001. Purification of a novel fructosyltransferase from lactobacillus reuteri strain 121 and characterization of the levan produced. FEMS Microbiol. Lett. 205, 323-328.
- Varum, K. M., Smidsrod, O., 2005. Structure-property relationship of chitosans. In: S. Dumitriu, Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility, second edition, Dekker, New York, pp. 625-642.
- Vasko, P. D., Blackwell, J., Koenig, J. L., 1971. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. Carbohydr. Res. **19**, 297-310.
- Vereyken, I. J., Chupin, V., Demel, R. A., Smeekens, S. C. M., Kruijff, B., 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 1510, 307-320.
- Viebke, C., Williams, P. A., 2000. Determination of molecular mass distribution of κ -carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. Food Hydrocoll. **14**, 265-270.
- Vina, I., Karsakevich, A., Gonta, S., Linde, R., Bekers, M., 1998. Influence of some physicochemical factors of the viscosity of aqueous levan solutions of Zymomonas mobilis. Acta Biotechnol. 18, 167-174.
- Viovy, J.-L., Lesec, J., 1994. Separation of macromolecules in gels: permeation chromatography and electrophoresis. In: V. A. Bershtein, G. C. Berry, N. Ise, J. Lesec, H. Matsuoka, I. S. Osad'ko, V. A. Ryzhov, J.-L. Viovy, Polymer analysis and characterization, Springer, Berlin, pp. 1-41.
- Vlachou, S., Politou, A., Dais, P., Mazeau, K., Taravel, F. R., 2001. Structure and dynamics of the branched polysaccharide scleroglucan in dilute solutions studies by 1D and 2D NMR spectroscopy. Carbohydr. Polym. 46, 349-363.
- Wagner, H., 1999. Pharmazeutische Biologie Band 2, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Wahlund, K.-G., 2000. Asymmetrical flow field-flow fractionation. In: M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings, Field-flow fractionation handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 279-294.
- Wahlund, K.-G., Giddings, J. C., 1987. Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. Anal. Chem. 59, 1332-1339.

- White, D. R., 1999. Applications of gel permeation chromatography and multi-angle light scattering to the characterization of polysaccharides. In: M. A. El-Nokaly, H. A. Soini, ACS Symposium Series 737: Polysaccharide Applications - Cosmetics and Pharmaceuticals, American Chemical Society, pp. 299-316.
- White, R. J., 1997. FFF-MALS-a new tool for the characterisation of polymers and particles. Polym. Int. 43, 373-379.
- Wijnhoven, J. E. G. J., Van Bommel, M. R., Poppe, H., Kok, W. T., 1996. Practical experience with organic solvent flow field-flow fractionation. Chromatographia **42**(7/8), 409-415.
- Wilkinson, V. M., Gauld, G. W., 1998. Food irradiation a reference guide. Woohead Publishing Ltd., Cambridge.
- Windsor, C.G., 1988. An introduction to small-angle neutron scattering. J. Appl. Cryst. 21, 582-588.
- Winter, R., Noll, F., 1998. Methoden der Biophysikalischen Chemie. B. G. Teubner, Stuttgart.
- Wittgren, B., Borgström, J., Piculell, L., Wahlund, K.-G., 1998. Conformation change and aggregation of κcarrageenan studied by flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. Biopolym. **45**, 85-96.
- Wittgren, B., Wahlund, K.-G., 1997. Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation multiangle light scattering. J. Chromatogr. A **760**, 205-218.
- Wittgren, B., Wahlund, K.-G., Andersson, M., Arfvidsson, C., 2002. Polysaccharide characterization by flow field-flow fractionation-multiangle light scattering: initial studies of modified starches. Int. J. Polym. Anal. Charact. 7(1-2), 19-40.
- Workman, J., 2001a. Handbook of organic compounds: NIR, IR, raman, and UV-Vis spectra featuring polymers and surfactants. Volume 1: Methods and interpretations, Academic Press, New York.
- Workman, J., 2001b. Handbook of organic compounds: NIR, IR, raman, and UV-Vis spectra featuring polymers and surfactants. Volume 3: IR and raman spectra, Academic Press, New York.
- Wündrich, K., 1989. Radiation resistance for commercial plastic and elastomeric materials. In: J. Brandrup, E.H. Immergut, Polymer Handbook, Wiley Interscience, New York, pp. 463-474.
- Wyatt, P. J., 1993. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. Anal. Chim. Acta 272, 1-40.
- Wyatt, P. J., 1998. Submicrometer particle sizing by multiangle light scattering following fractionation. J. Coll. Int. Sci. **197**, 9-20.

- Yanaki, T., Ito, W., Tabata, K., Kojima, T., Norisuye, T., Takano, N., Fujita, H., 1983. Correlation between the antitumoral activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. Biophys. Chem. 17, 337-342.
- Yanaki, T., Norisuye, T., Fujita, H., 1980. Triple helix of schizophyllum commune polysaccharide in dilute solution. 3. Hydrodynamic properties in water. Macromolecules **13**, 1462-1466.
- Yanaki, T., Norisuye, T., Fujita, H., 1980. Triple helix of schizophyllum commune polysaccharide in dilute solution. 3. Hydrodynamic properties in water. Macromolecules **13**, 1462-1466.
- Zivanovic, S., Basurto, C. C., Chi, S., Davidson, P. M., Weiss, J., 2004. Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions. J. Food Protect. **67**(5), 952-959.
- Zylka-Menhorn, V., 2005. Feinstäube Winzlinge mit großer Wirkung. Deutsches Ärzteblatt **102**(14), A954 A958.

10.2 Eigene Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

10.2.1 Reporte und Artikel

- Augsten, C., Rübe, A., Kiselev, M. A., Gehrke, R., Mäder, K., 2004. SAXS study of nanospheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and a Poloxamer shell. HASYLAB Annual Report 2004, Deutsches Elektronen Synchrotron Hamburg, Deutschland.
- Augsten, C., Mäder, K., 2005. Light scattering for the masses: characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. LCGC North America Sep. (Suppl.), 80.
- Amado, E., Augsten, C., M\u00e4der, K., Blume, A., Kressler, J., 2006. Amphiphilic water soluble triblock copolymers based on Poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate) and Poly(propylene oxide): synthesis by atom transfer radical polymerization and micellization in aqueous solutions. Macromol. **39**, 9486-9496.
- Augsten, C., Mäder, K., 2006. Asymmetrische Fluß Feld-Fluß-Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkel-Lichtstreudetektion. Pharm. Ind. **68**(12), 1420-1428.
- Augsten, C., Mäder, K., 2007. Field-Flow Fractionation with Multiangle Light Scattering: A Viable Method for the Characterization of Different Types of Hydroxyethylstarches, LCGC The Peak Jan., 7-12.
- Augsten, C., Mäder, K., 2007. Hydroxyethylstarches (HES), LCGC North America Feb. (Suppl.), 17.
- Mao, S., Augsten, C., M\u00e4der, K., Kissel, T., 2007. Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical Flow Field-Flow-Fractionation: a comparison with traditional methods. J. Pharm. Biomed. Anal. 45, 736-741.
- Augsten, C., M\u00e4der, K., 2008. Characterizing Molar Mass Distributions and Molecule Structures of Different Chitosans using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation combined with Multi-Angle Light Scattering. Int. J. Pharm. 351, 23-30.
- Augsten, C., Knolle, W., Mäder, K., 2008. Characterizing the Influence of Electron Irradiation on Scleroglucan. Carbohydr. Polym. **72**, 707-718.
- Augsten, C., Kiselev, M. A., Gehrke, R., Hause, G., M\u00e4der, K., 2008. A Detailed Analysis of Biodegradable Nanospheres by Different Techniques – A Combined Approach to Detect Particle Sizes and Size Distributions. J. Pharm. Biomed. Anal. 47(1), 95-102.

- Rübe, A., Augsten, C., Mäder, K., 2004. ESR Investigations on the dynamics of colloidal drug cariers. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg, 15.-18. März.
- Rübe, A., Augsten, C., Mäder, K., 2004. An Electron Spin Resonance Study on Nanocapsules and Nanospheres.The Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery, Tromso, Norwegen, 1.-3. Juli.
- Augsten, C., Rübe, A., Kiselev, M.A., Gehrke, R., Kohlbrecher, J., M\u00e4der, K., 2005. SAXS and SANS study of PLGA nanospheres containing a Poloxamer shell. CRS German Local Chapter Meeting 2005, Marburg, Deutschland, 15. M\u00e4rz.
- Augsten, C., M\u00e4der, K., 2005. Measuring particle size distributions of degrading nanospheres consisting of PLGA using asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. 12th International Symposium on Field-Flow Fractionation, Brno, Tschechische Republik, 28.-30. August.
- Augsten, C., Mäder, K., 2005. Characterizing Different Chitosan Types Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering. First Munich Conference on Field Flow Fractionation in Pharmaceutical Biotechnology, München, Deutschland, 6.-7. Oktober.
- Augsten, C., M\u00e4der, K., 2005. Charakterisierung von Chitosan-Makromolek\u00fclen mit Hilfe der aF-FFF in Kombination mit MALS. 2. Treffen der Pharmazeutischen Technologie Mitteldeutschlands, Jena, Deutschland, 4. November.
- Augsten, C., Amado, E., Blume, A., Kressler, J., M\u00e4der, K., 2006. Characterizing Different Types of Poly (2,3dihydroxypropyl methacrylate) - block - Polypropylene oxides Using Flow-FFF and MALS. CRS German Chapter Annual Meeting 2006, Jena, Deutschland, 24. Februar.
- Augsten, C., Mäder, K., 2006. Characterization of Chitosans in Solvents of Different pH using Flow-FFF and MALS. 33rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Wien, 22.-26. Juli.
- Hünerbein, A., Augsten, C., Mäder, K., Neubert, R. H. H., 2006. The adhesion of PLGA Nanoparticles studied with a new Cell surface model based on Quartz crystal microbalance. 20th EUROSENSORS Conference Anniversary, Göteborg, Schweden, 17.-20. September.
- Augsten, C., Knolle, W., M\u00e4der, K., 2006. Characterizing Polysaccharides with Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering: Detecting the Influence of Electron Irradiation on Chitosans. Polypharma 2006, Halle, Deutschland, 25.-26. September.

- Augsten, C., Mao, S., Kissel, T., M\u00e4der, K., 2006. Characterizing different Trimethyl chitosanes and Poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers using asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering. Polymeric Materials 2006, Halle, Deutschland, 27.-29. September.
- Augsten, C., Klein, S., M\u00e4der, K., 2007. A new fast quality check of pancreatin: Separating via aF-FFF and Characterizing by MALS/RI. CRS German Chapter Annual Meeting 2007, Freiburg, Deutschland, 22.-23. M\u00e4rz.
- Augsten, C., Hünerbein, A., Neubert, R. H. H., Mäder, K., 2007. A new Possibility to Determine Size Distributions of Biodegradable Nanoparticles: Characterizing PLGA Nanospheres by Separation via Flow-FFF and Detection via MALS. 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Long Beach, USA, 7.-11. Juli.
- Augsten, C., Knolle, W., M\u00e4der, K., 2007. Can Chitosans get sterilized by Electron Irradiation? Monitoring Chitosan Degradation by Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering. 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Long Beach, USA, 7.-11. Juli.
- Thommes, M., Augsten, C., Mäder, K., Kleinebudde, P., 2007. Investigation of the κ-Carrageenan Pelletisation Mechanism. 2007 AAPS Annual Meeting and Exposition, San Diego, USA, 11.-15. November.

Ich danke...

- ... Prof. Dr. K. Mäder für die Vergabe dieses interessanten Forschungsthemas, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sein offenes Ohr für jegliche Fragen und die großen Freiheiten bei der Bearbeitung der Themen.
- ... allen Gutachtern für die Anfertigung des Gutachtens.
- ... Prof. Dr. Dr. R. H. H. Neubert und A. Hünerbein vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der MLU Halle-Wittenberg, Dr. M.A. Kiselev vom Joint Institute for Nuclear Research in Dubna, Dr. R. Gehrke vom HASYLAB beim DESY in Hamburg und Dr. G. Hause vom Biozentrum der MLU Halle-Wittenberg für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung von PLGA-Nanosphären.
- ... Prof. Dr. J. Kressler und E. Amado von Fachbereich Ingenieurswissenschaften sowie Prof. Dr. Alfred Blume vom Institut f
 ür Physikalische Chemie der MLU Halle-Wittenberg f
 ür die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Triblock-Copolymere.
- ... Prof. Dr. T. Kissel und Dr. S. Mao vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps Universität Marburg für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der (Trimethyl)Chitosane.
- ... Prof. Dr. P. Kleinebudde und Dr. M. Thommes vom Institut f
 ür Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Heinrich-Heine-Universit
 ät D
 üsseldorf f
 ür die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der κ-Carrageenane.
- ... Dr. W. Knolle vom Leibnitz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. Leipzig für die für die Zusammenarbeit bei der Bestrahlung der Polysaccharide.

- ... Dr. D. Ströhl und Dr. H. Metz für die Hilfe bei der Charakterisierung mittels NMR, Frau H. Rudolph für die Hilfe bei der Charakterisierung mittels Raman-Spektroskopie, Dr. C. Schmelzer für die durchgeführten Messungen mittels Maldi-TOF, Frau S. Todte für die Bestimmungen der Viskosität, Frau S. Klein sowie PD Dr. habil. K. M. Picker-Freyer für das zur Verfügung gestellte Pankreatin bzw. die Chitosane und Herr D. Reese bzw. seinen Kollegen für die häufige schnelle Hilfe bei den vielen technischen Problemen.
- ... Frau N. Adrus, Frau R. V. Contri und Frau A. Stahn für die aufgewendete Meßzeit an der aF-FFF.
- ... den Firmen Microdyn-Nadir GmbH für die Membranen, dem Serumwerk Bernburg für die Hydroxyethylstärken, der Degussa GmbH für die Scleroglucane, Realbiotech Co. Ltd für die Levane, Primex Ingredients und Medical Chitosan für die zur Verfügung gestellten Chitosane.
- ... Herr Dr. Roessner (Wyatt Technology Europe), Dr. Nitzsche (Malvern Instruments GmbH) sowie Dr. F. van der Kammer für die hilfreichen Diskussionen.
- ... dem Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V. und der Controlled Release Society für die beiden erhaltenen Preise.
- … Andra Rübe, Karsten und Andrea Hauschild, Sandra Strübing, Sandra Klein, Wolfgang Schmid, Andreas Hünerbein und allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Halle-Wittenberg für die stete Hilfe sowie die sehr schöne Zeit.
- ... meiner gesamten Familie für den Zuspruch und die Unterstützung, die ich während des Studiums und der Promotion erfahren habe, und speziell meinem Schatz Nesrin für das rasche Gegenlesen dieser Arbeit und meinem Sohn Fabius Raphael für die vielen schönen Vater-Sohn-Abende.

"Wir haben so viel Ungeklärtes auf dieser Welt; damit dieses so bleibt, haben wir die Wissenschaft."

Otto Waalkes.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Augsten
Wohnsitz	Windmühlenstraße 12, 06246 Bad Lauchstädt
Telefon	01744897524
Geburtsdatum/-ort	04.08.1977 / Merseburg
Konfession	Katholisch
Staatsangehörigkeit	Deutsch



Schule, Studium und Berufstätigkeit

09/1984-08/1991	Dr. Salvador-Allende-Oberschule in Bad Lauchstädt
09/1991-05/1996	Elisabeth-Gymnasium Halle, Abschluß Abitur 06/1996
08/1996-08/1997	Zivildienst, Diakonie - Sozialstation in Merseburg
09/1997-10/2001	Grund- und Hauptstudium der Pharmazie an der Martin-Luther-
	Universität Halle-Wittenberg mit erstem und zweitem Abschnitt der
	pharmazeutischen Prüfung
11/2001-04/2002	Diplomand am Institut für Pharmazeutische Technologie und
	Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	unter der Leitung von Prof. Dr. P. Kleinebudde
05/2002-01/2003	Pharmaziepraktikant in der Sonnen-Apotheke Merseburg
02/2003-05/2003	Einreichung und Verteidigung der Diplomarbeit, dritter Abschnitt
	der pharmazeutischen Prüfung, Erhalt der Approbation 06/2003
06/2003-07/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische
	Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität
	Halle-Wittenberg, Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof.
	Dr. K. Mäder
Seit 08/2007	Mitarbeiter in der Zulassungsabteilung der Jenapharm GmbH &
	Co. KG

Halle, den 22. Februar 2008

Christian Augsten

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b und 2c der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, daß ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 22. Februar 2008

Christian Augsten