



GALAB Laboratories GmbH



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

HAW Hamburg – Fakultät Life Sciences

Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Molekülmasse sowie der Dispersität von Hyaluronsäure mittels SEC

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Nele Felicitas Fahrig

Matrikelnummer: 2019633

Hamburg, am 29. Juni 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Dr. Jürgen Kuballa (GALAB Laboratories GmbH)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, an Eides statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 29.06.15

Ort, Datum

N. Rahng

Unterschrift des Verfassers

Vorwort

Diese Abschlussarbeit wurde im Rahmen des Studienganges Bachelor of Science Biotechnologie an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW) in den Laboratorien des Unternehmens GALAB Laboratories GmbH (GALAB) erstellt. Es sollte eine Methode entwickelt werden um das Molekulargewicht und die Dispersität hochmolekularer Hyaluronsäure mittels SEC bestimmen zu können.

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben. Mein Dank geht an Jürgen Kuballa, der mir unter anderem das Thema zur Verfügung gestellt und mich während der Anfertigung unterstützt und betreut hat. Vielen Dank auch an die Mitarbeiter und Kollegen von der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, mit und bei Ihnen zu forschen und zu arbeiten. Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern und deren Lebensgefährten Dank, für die tatkräftige Unterstützung und Ermunterung während meines Studiums. Des Weiteren danke ich meinen Freunden, Kommilitonen und den anderen Studenten bei GALAB für die stets offenen Ohren, die Unterstützung und Ermunterung.

Juni 2015

Nele Felicitas Fahrig

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	II
Abkürzungen und Formelzeichen.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Formelverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	IX
Diagrammverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	XIII
1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	2
2.1 Hyaluronsäure.....	2
2.2 <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i>	5
2.3 Molekülmasse und Dispersität.....	5
2.4 Größenausschluss-Chromatographie (SEC).....	7
2.5 Detektionsverfahren.....	10
2.5.1 Detektion über Lichtbrechung.....	10
2.5.2 Detektion mittels UV-Spektroskopie.....	12
2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	14
3 Materialien und Methoden.....	16
3.1 Verwendete Standards, Materialien und Proben.....	16
3.2 Aufnahme des UV-Spektrums.....	17
3.3 Verwendete Puffer, Apparate und Methoden für die SEC.....	17
3.4 Detektionsverfahren.....	20
3.4.1 Detektion mittels RI-Detektor.....	20
3.4.2 Detektion mittels UV-Detektor.....	22
3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	22
4 Ergebnisse und Diskussion.....	26

4.1	SEC mit RI-Detektor	26
4.2	UV-Spektren	27
4.3	SEC mit UV-Detektion	29
4.3.1	HA mit 2,12 MDa	30
4.3.2	HA mit 1,2 MDa	32
4.3.3	HA mit 1,67 MDa	34
4.3.4	HA mit 0,35 MDa	34
4.3.5	Vergleich der Retentionszeiten unterschiedlicher Molekülmassen	35
4.3.6	Flussratenvergleich	39
4.3.7	Fermentationsüberstand	40
4.3.8	Mögliche Alternativen und Erweiterungen der Methode	43
4.4	AGE.....	47
5	Schlussfolgerung	51
	Literaturverzeichnis	53
	Anhang.....	58
A	Certificates of Analysis (COA).....	58
B	Materialien und Daten.....	62

Abkürzungen und Formelzeichen

AGE	Agarose-Gel-Elektrophorese
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Absorptionseinheit (engl. Absorption Unit)
bp	Basenpaare
COA	Certificate of Analysis, Analysenzertifikat
Cond	Leitfähigkeit (engl. Conductivity)
CV	Column Volume, Säulenvolumen
Da	Atomare Masseneinheit Dalton
DNA	Englische Abkürzung für Desoxyribonukleinsäure (DNS)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FÜ	Fermentationsüberstand
GAG	Glykosaminoglykane
GALAB	Geesthachter Analytik Laboratorien
GCS	Lancefield Gruppe C Streptokokken
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
GlcUA	Glucuronsäure
HA	Hyaluronic acid, Hyaluronsäure oder Hyaluronan
HAW	Hochschule für Angewandte Wissenschaften
HDC	hydrodynamische Chromatographie
HR	High Range
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Liquid Chromatography, Flüssigchromatographie
LS	Lichtstreuung
M	Molar bzw. molare Masse in mol/l oder Molekülmasse in Da
M_n	arithmetischer Molmassen-Mittelwert
M_p	Molekülmasse an der Peakspitze
M_w	nach dem Gewicht gemittelter Wert für die Molekülmasse
NaCl	Natriumchlorid
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia, Europäisches Arzneibuch
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon [®]
R^2	Bestimmtheitsmaß
RI	Refractive Index, Brechungsindex
RID	Brechungsindex-Detektor
RIU	Refractive Index Unit
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
SC	Slalom-Chromatographie
SEC	Size exclusion chromatography, Größenausschluss-Chromatographie

ssp	subspecies
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett-Strahlung(-Spektroskopie)
V	Volt
V_0	Ausschlussvolumen der Säule, interstitielles Volumen der mobilen Phase
V_E	Volumen bei dem eine Substanz eluiert
VE	Vollentsalz
V_I	Internes Porenvolumen der mobilen Phase
V_M	Volumen der mobilen Phase
W	Watt
ε	Epsilon, Extinktionskoeffizient

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Dargestellt sind die sich um die Anzahl n wiederholenden Disaccharid-Einheiten der Hyaluronsäure mit der Summenformel $C_{14}H_{21}O_{11}N$. β -1,4-D-Glucuronsäure (GlcUA) als Uronsäure und β -1,3-N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) als Aminozucker der Disaccharid-Einheit. Die Einheiten sind glykosidisch $\beta(1\rightarrow4)$ verbunden. Bei Hyaluronsäure-Natriumsalz ist an der Hydroxygruppe der Carboxygruppe von GlcUA Wasserstoff (H) durch Natrium (Na) ausgetauscht. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung nach Boeriu et al., 2013..... 2
- Abbildung 2: Lokalisation der Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix. An der Abbildung nach © Pearson Education, Inc. sind Ergänzungen vorgenommen worden... 3
- Abbildung 3: Fiktives Chromatogramm einer möglichen SEC-Trennung. Hier ist beispielhaft dargestellt, an welchem Punkt der Molekülmassenverteilung die Molekülmassenmittelwerte sich befinden können, wobei sich M_p immer an der Peakspitze befindet, und M_n und M_w davon abweichen können. Hierbei handelt es sich um ein uneinheitliches Polymer, da M_n und M_w voneinander abweichen. Bei einem einheitlichen Polymer würden diese aufeinander liegen bzw. deren Werte gleich sein. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung nach Striegel et al., 2009. 5
- Abbildung 4: Schema der chromatographischen Trennung in den Beads mit Poren und Kanälen (stationäre Phase) bei der Größenausschluss-Chromatographie (SEC). Die mobile Phase bewegt sich zusammen mit den Molekülen von oben nach unten an der stationären Phase vorbei. Sterische Effekte beeinflussen die Elutionsreihenfolge. Große Moleküle (rot) eluieren vor kleinen Molekülen (grün), da sie fast oder vollkommen vom Porensystem der stationären Phase (blau) ausgeschlossen sind. Kleinere Moleküle hingegen retardieren und eluieren später. Bei der Abbildung handelt es sich um eine eigene Darstellung. 7
- Abbildung 5: Theoretische Elutionsreihenfolge bei der SEC. Aufgetragen wurde die Absorption gegen das Volumen. V_0 entspricht dem Volumen bei dem Moleküle eluieren, welche aufgrund ihres hydrodynamischen Durchmessers nicht in das Porensystem eindringen können. Es wird auch Ausschlussvolumen der Säule genannt. V_E wird das jeweilige Elutionsvolumen der Substanz genannt. V_M entspricht dem Volumen der mobilen Phase. Abbildung nach GE Healthcare, 2007, modifiziert. 8
- Abbildung 6: Schemata der verschiedenen Volumina die eine Rolle bei der SEC spielen. V_0 entspricht dem interstitiellen Volumen zwischen den Partikeln der gepackten Säule, ohne das Trägerporensystem. V_M ist das Volumen der mobilen Phase, zusammengesetzt aus dem interstitiellen Volumen V_0 zwischen den Partikeln und dem internen Porenvolumen V_I . V_T entspricht dem gesamten Säulenvolumen (Column Volume) aus dem Volumen der mobilen Phase und der stationären Phase. Abbildung nach GE Healthcare, 2007, modifiziert. 9
- Abbildung 7: Lichtbrechung beim Übergang von einem optisch dünneren in das optisch dichtere Medium. Die Formel 1 (das Snellius'sche Brechungsgesetz) dient zum berechnen des Brechungsindex. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung nach Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH. 11
- Abbildung 8: Abbildung zur Erklärung des Lambert-Beer'schen Gesetz. Die Intensität des Lichts (I_0) wird durch die in der Küvette befindliche Lösung geschwächt (I). Je

höher die Konzentration c der Lösung, desto größer ist diese Schwächung. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung..... 13

Abbildung 9: Die chemische Struktur von Stains-All (1-Ethyl-2-[3-(1-ethylnaphtho[1,2-d]thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl]naphtho[1,2-d]thiazolium bromide). Die Abbildung stammt von Sigma-Aldrich®..... 15

Abbildung 10: Alle Hyaluronsäure-Natriumsalz Proben der verschiedenen, welche zur Methodenentwicklung verwendet wurden, lagen als weißes Pulver vor. Abbildung nach Russell Publishing Ltd., modifiziert. 16

Abbildung 11: Apparativer Aufbau des verwendeten Flüssigchromatographen BioCAD® SPRINT™. Die mobile Phase befindet sich in einem Elutionsmittelvorratsgefäß. Mit Hilfe der Pumpe wird die mobile Phase durch den Entgaser zum Injektionsventil befördert. Dort erfolgt die Aufgabe der Probe auf die Säule. In der Säule werden die Substanzen getrennt. Im Anschluss erfolgt die Detektion mit Hilfe eines oder mehrerer Detektoren. Hier erfolgt die Detektion über UV, Leitfähigkeit (Cond) und pH-Wert. Die Detektoren sind mit dem Computer verbunden. Am Ende der Chromatographie landet die mobile Phase zusammen mit den Proben im Abfallgefäß (Waste). Bei der Abbildung handelt es sich um eine eigene Darstellung. . 19

Abbildung 12: Aufnahme des 0,5%igen Agarose-Gels mit Dunkelhaube und Transilluminator. In der Tabelle oben ist angegeben, welche Probe in welche Geltasche pipettiert wurde. Ergänzt wurden Angaben dazu, welcher Molekülmasse die DNA-Ladder entsprechen. Aufgetragen wurden 2,12 MDa Hyaluronsäure-Proben, der Fermentationsüberstand, die DNA-Standards und der Hyaluronsäure-Standard Select-HA HiLadder. Die Hyaluronsäure wurde in den üblichen Konzentrationen aufgetragen, die auch bei der SEC Anwendung fanden. Das Gel wurde über 4 h mit 0,005 % Stains-All in 50 % Ethanol im Dunkeln gefärbt und über Nacht in destilliertem Wasser im Dunkeln entfärbt. (FÜ = Fermentationsüberstand, HR = High Range)..... 49

Abbildung 13: Aufnahme des Gels mit Dunkelhaube. In der Tabelle oben ist wiedergegeben, welche Probe in welche Geltasche pipettiert wurde. An der Seite ist zu sehen, welche Bande wie viele Basenpaare darstellt und wie viel MDa dies laut vorherigen Versuchen in etwa entspricht. Es handelt sich um ein 0,5%iges Agarose-Gel mit einer Länge von ca. 10 cm. Aufgetragen wurden Hyaluronsäure-Proben aller Molekülmassen und die DNA-Standards. Sie wurden in den üblichen Konzentrationen aufgetragen, die auch bei der SEC Anwendung fanden. (HR = High Range)..... 50

Formelverzeichnis

Formel 1: Das Snellius'sche Brechungsgesetz	11
Formel 2: Lambert-Beer'sches-Gesetz	13
Formel 3: RI-Signalwert Berechnung	21

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung von der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ zu der Molekülmasse M_w von verschiedenen Hyaluronsäure-Proben. ^[1] (Mendichi et al., 2002), ^[2] (Mendichi et al., 2003) und ^[3] (Bothner et al., 1988)	4
Tabelle 2: Molekülmassenmittelwerte, Dispersität und ihre Definitionen. Angaben nach Strepto, 2009 und Striegel et al., 2009	6
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Proben mit Molekülmasse und Konzentrationen.	17
Tabelle 4: Die festgelegten Bedingungen der SEC bei Verwendung des UV-Detektors.	21
Tabelle 5: Die bei der Agarose-Gel-Elektrophorese verwendeten DNA und HA Standards und welchen Bereich diese abdecken	22
Tabelle 6: Mengen die an TRIS, EDTA und Essigsäure zur Herstellung von 1l des 10xTAE-Puffers notwendig sind.	23
Tabelle 7: Einwaagen für die Herstellung von Ladepuffer mit Bromphenol Blau und Saccharose.	24
Tabelle 8: Verschiedene kommerziell erhältliche alternative Säulenmaterialien im Vergleich zum verwendeten Säulenmaterial Sephacryl S-500 HR. Diese Materialien wurden von anderen Autoren als zur Molekülmassenbestimmung von Hyaluronsäure geeignet beschrieben. Quellen sind [1] (Mendichi et al., 2002), [2] (Joeng et al., 2014), [3] (Armstrong et al., 1995), [4] (Hokputsa et al., 2003), [5] (Showa Denko K.K., 2015), [6] (TOSOH Bioscience, 2015), [7] (Agilent Technologies, 2014), [8] (Waters, 2015) und [9] (GE Healthcare, 2007).	46
Tabelle 9: Während der Versuche verwendete Chemikalien, Reagenzien und anderes. 62	
Tabelle 10: Während der Versuche verwendete Materialien.....	63
Tabelle 11: Für die Versuche verwendete Geräte und Programme	64
Tabelle 12: Daten zur Fläche und Höhe einiger aufgenommener Chromatogramme bei der jeweiligen Flussrate mit Angaben zur Hyaluronsäure-Probe, sowie Molekülmasse und Konzentration.....	69

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 1 mg/mL, aufgenommen mit einem RID. Die Kurven wurden in Excel als Trendlinien mit gleitendem Durchschnitt (gleitender Mittelwert über 8 Perioden) dargestellt, um sie zu glätten.	26
Diagramm 2: Dargestellt sind die UV-Spektren des Hyaluronsäure-Arbeitsmaterials in drei unterschiedlichen Konzentrationen von 200 – 300 nm. Aufgenommen wurden die Spektren jedoch bis 600 nm. Bei den gekennzeichneten 205 nm fand eine ausreichende Absorption statt.....	27
Diagramm 3: Photometrische Kalibrierfunktion der Extinktionswerte von 1, 2 und 3 mg/mL bei 207 nm. Bei 205 nm konnte das Photometer keinen Wert mehr für 3 mg/mL ausgeben, da die Extinktion bei dieser Konzentration zu hoch war.	28
Diagramm 4: Dargestellt sind die UV-Spektren des Fermentationsüberstandes (1:100 verdünnt) und des Natriumchlorids (NaCl) von 200 – 300 nm. Aufgenommen wurden die Spektren jedoch bis 600 nm. Bei 205 nm erfolgten später die Messungen der Proben mit dem UV-Detektor, da diese sich für die Hyaluronsäure als geeignet herausstellte..	29
Diagramm 5: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 1 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	31
Diagramm 6: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 2 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	31
Diagramm 7: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	31
Diagramm 8: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 1 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	33
Diagramm 9: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 2 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	33
Diagramm 10: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	33
Diagramm 11: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	34
Diagramm 12: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.....	35

Diagramm 13: Vergleich der Chromatogramme des ersten Laufes von HA mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1 mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.....	36
Diagramm 14: Vergleich der Chromatogramme von dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa mit dem zweiten Lauf der HA mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1 mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.....	36
Diagramm 15: Vergleich der Retentionszeiten an der Peakspitze der verschiedenen Molekülmassen bei einer Konzentration von 3 mg/mL.....	37
Diagramm 16: Vergleich der Peakhöhen von allen bei 1 mL/min getätigten Messungen der verschiedenen Hyaluronsäure-Proben.	38
Diagramm 17: Werte aller errechneten Flächen der Läufe von den verschiedenen Hyaluronsäure-Proben aufgetragen gegen die verwendeten Konzentrationen.....	39
Diagramm 18: Vergleich der Retentionszeit bei unterschiedlichen Flussraten und Auflösung des Chromatogramms. Hier wurden immer 2 mL der 2,12 MDa Hyaluronsäure bei einer Konzentration von 3 mg/mL aufgetragen und nur die Flussrate verändert.	40
Diagramm 19: Chromatogramm des Fermentationsüberstandes aus der Fermentation mit <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> . Aufgetragen wurden wie bei den HA-Proben 2 mL. Die Flussrate betrug dabei 0,5 mL/min.....	41
Diagramm 20: Ausschnitt aus Diagramm 18 für das Elutionsvolumen bis 100 Milliliter. Ergebnis der Auftragung des Fermentationsüberstands bei einer Flussrate von 0,5 mL/min.....	41
Diagramm 21: Chromatogramm der 1:1-Mischung aus Fermentationsüberstand mit einer HA-Konzentration von ca. 2,5 mg/mL und 2,12 MDa Hyaluronsäure mit einer Konzentration von 3mg/mL. Die Flussrate betrug dabei 1 mL/min.....	42
Diagramm 22: Ausschnitt aus Diagramm 20 für das Elutionsvolumen bis 100 Milliliter. Der Fermentationsüberstand mit einer HA-Konzentration von ca. 2,5 mg/mL wurde 1:1 mit Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa und einer Konzentration von 3mg/mL gemischt und aufgetragen. Die Flussrate betrug dabei 1 mL/min.	43
Diagramm 23: Vergleich der beiden Chromatogramme des zweiten Laufs von HA mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.....	67
Diagramm 24: Vergleich der beiden Chromatogramme des ersten Laufs von HA mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 2,12MDa bei einer Konzentration von 3mg/mL und einer Flussrate von 1mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.....	67

Diagramm 25: Vergleich der beiden Chromatogramme des ersten Laufs von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa mit dem ersten Lauf von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3mg/mL und einer Flussrate von 1mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden. 68

Diagramm 26: Vergleich der beiden Chromatogramme des zweiten Laufs von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3mg/mL und einer Flussrate von 1mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden. 68

Zusammenfassung

Biotechnologisch, d.h. fermentativ, hergestellte Hyaluronsäure muss für die Anwendung in der Biomedizin bestimmte Kriterien erfüllen, darunter eine hohe Molekülmasse und eine geringe Dispersität. Die dazu notwendigen Molekülmassenmittelwerte müssen über die Größenausschluss-Chromatographie bestimmt werden können, um festzustellen, ob die fermentierten Hyaluronsäure-Polymere diesen Kriterien entsprechen und im genannten Bereich eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde daher das Ziel gestellt, eine Methode zu entwickeln, mit welcher die Molekülmasse sowie die Dispersität von Hyaluronsäure bestimmt werden können. Die Größenausschluss-Chromatographie stellte dabei die Basis zur Methodenentwicklung dar. Zur chromatographischen Trennung der Hyaluronsäure-Polymere wurde eine bei der GALAB Laboratories GmbH vorhandene, Chromatographie-Säule mit einer Länge von 88 cm und einem Durchmesser von 1,5 cm eingesetzt, die mit dem Säulenmaterial Sephacryl S-500 High Resolution gefüllt war. In Kombination mit dieser Säule wurden zwei alternative Detektionsverfahren getestet, zum einen die Detektion über Lichtbrechung und zum anderen über die Ultraviolett-Spektroskopie. Der Ansatz über die Lichtbrechungsdetektion wurde jedoch nicht weiterverfolgt, nachdem erste Versuche ergaben, dass die Anforderungen an die notwendige genaue Konstanthaltung der Temperatur nicht erfüllt werden konnten. Das System aus Chromatographie-Säule und Ultraviolett-Detektor wurde zunächst mit reinem polydisperssem Hyaluronsäure-Natriumsalz bekannter Konzentration (1, 2, 3 mg/mL) getestet. Dazu wurde das Hyaluronsäure-Natriumsalz in der mobilen Phase (0,2 M Natriumchlorid) gelöst und in der Säule aufgetrennt. Die Chromatogramme der Hyaluronsäure-Natriumsalze mit unterschiedlichen Molekülmassen, die mit dem Ultraviolett-Detektor entstanden entsprachen hinsichtlich der Peakform den Erwartungen. Jedoch ergab ein Vergleich der Retentionszeiten, dass mit der gewählten Material-Säulen-Kombination keine chromatographische Trennung hochmolekularer Hyaluronsäuren voneinander erfolgte. Darüber hinaus war die notwendige Kalibrierung der Säule im Wesentlichen aufgrund mangelnder Verfügbarkeit von Standards nicht möglich. Daher reichten die getesteten konzentrationsabhängigen Detektionsverfahren nicht aus, um die Molekülmassenmittelwerte und damit auch die Dispersität einer Hyaluronsäure-Probe bestimmen zu können. Infolgedessen wurden Bedingungen für eine etwaige Lösung des obigen Problems ermittelt. Die Hyaluronsäure-Proben wurden über eine Methode auf Basis der Agarose-Gel-Elektrophorese zusätzlich auf ihre Molekülmasse untersucht. Hier gelang jedoch mit Hilfe der wenig verfü-

baren Standards ebenfalls keine Auftrennung, die eine exakte Beurteilung der Molekülmasse ermöglichen würde. Die geschilderte Problematik ist aus der Literatur gut bekannt. Die Auftrennung hochmolekularer Hyaluronsäure stellt auch heute noch eine große Herausforderung dar, da nur wenige Hyaluronsäure-Standards kommerziell erhältlich und kaum Säulenmaterialien verfügbar sind, die für die Auftrennung hochmolekularer Hyaluronsäure geeignet wären. Molekülmasse und Dispersität der Hyaluronsäure zu bestimmen, sollte grundsätzlich durch Wahl geeigneter Säulenmaterialien und – designs sowie geeigneter Detektionsverfahren, wie z.B. eine Kombination aus Lichtbrechung und Lichtstreuung, möglich sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese Ansätze jedoch nicht weiter verfolgt werden.

1 Einleitung

Für Anwendungen in der Ophthalmologie (Augenheilkunde) und Orthopädie (z.B. die Behandlung von Arthritis) werden definierte hochmolekulare und monodisperse Hyaluronsäure-Polysaccharide mit hoher Langzeitstabilität benötigt (Laurent et al., 1995). Die Länge der Hyaluronsäure-Polymere bestimmt die biologische Wirkung in vielen Zellen und Geweben. Lange und kurze Polymere scheinen häufig entgegengesetzte Wirkung zu haben (Garg et al., 2004). Da sichergestellt werden muss, dass die aus einem Fermentationsprozess gewonnene Hyaluronsäure diesen Anforderungen entspricht, ist die Charakterisierung der Polymere unerlässlich (Schiraldi et al., 2010). In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die limitierte Verfügbarkeit von Standardsubstanzen eine besondere Schwierigkeit bei der Produktcharakterisierung darstellt. Die käuflich zu erhaltenden Standards sind meist Gemische, die häufig schlecht charakterisiert sind. Außerdem sind sie teilweise selbst in geringen Mengen sehr teuer oder die Hyaluronsäure-Polymergrößen sind sehr gering (AMS Biotechnology Limited; Hyalose, L.L.C.). Ansonsten sind einige polydisperse Hyaluronsäure-Natriumsalze mit unterschiedlichen Molekülmassen erhältlich.

Es werden Molekülmassenmittelwerte der Hyaluronsäure benötigt, um die für die Charakterisierung notwendigen Werte für Molekülmasse und Dispersität zu erhalten. Im Auftrag von GALAB sollte eine Methode entwickelt werden, um diese Mittelwerte präzise zu bestimmen. Die Methode basiert auf der hierfür auserlesenen Größenausschluss-Chromatographie, wofür eine geeignete Detektionsmöglichkeit und ein geeignetes Säulenmaterial eruiert werden. Hindernisse bilden bei der Größenausschluss-Chromatographie von hochmolekularen Hyaluronsäure-Proben die Trennung in den Säulen und die Kalibrierung des Systems. Schwierigkeiten machen in der Regel zudem die Degradation der Hyaluronsäure, Konzentrationseffekte, „viscous fingering“, eine schlechte Auflösung und die geringe Reproduzierbarkeit der Trennung. Mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese wurde eine schnelle Analyse der Hyaluronsäure-Proben durchgeführt.

2 Theoretische Grundlagen

Im nachfolgenden Kapitel werden die zum Verständnis der Arbeit notwendigen theoretischen Grundlagen, über die zu untersuchende Hyaluronsäure und die verwendeten Methoden vermittelt.

2.1 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure (engl. hyaluronic acid, Abkürzung HA) gehört zur Klasse der Glykosaminoglykane (GAG) (Laurent et al., 1992). Häufig wird auch der Begriff Hyaluronan verwendet, wobei es sich um das Natriumsalz der Hyaluronsäure handelt. Entdeckt wurde die Säure 1934, von Meyer und Palmer in Rinderaugen (Meyer et al., 1934). Ihr Name setzt sich aus dem griechischen Wort für die gläserne Eigenschaft „hyaloid“ und der in ihrer Struktur vorkommenden Uronsäure (engl. uronic acid) zusammen (Wohlrab et al., 2004). Hyaluronsäure ist nicht sulfatiert und ist aus sich um die Anzahl n wiederholenden Disaccharideinheiten von β -1,4-D-Glucuronsäuren (GlcUA) und β -1,3-N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) aufgebaut (Abbildung 1). Das langkettige, farblose Polysaccharid erreicht eine Molekülmasse (M_w) von bis zu 10 MDa. HA ist ein hygroskopisches, wasserlösliches und polyanionisches Polymer. In der extrazellulären Matrix (EZM) kommt Hyaluronsäure ubiquitär vor (Abbildung 2) und hat dort wichtige Funktionen, wie z.B. die Regulation des Wasserhaushaltes oder die Gewebespannung (Garg et al., 2004; Laurent et al., 1995). Hyaluronsäure befindet sich in der EZM aller Wirbeltiere und in einigen Bakterienkapseln (Fraser et al., 1997; Necas et al., 2008).

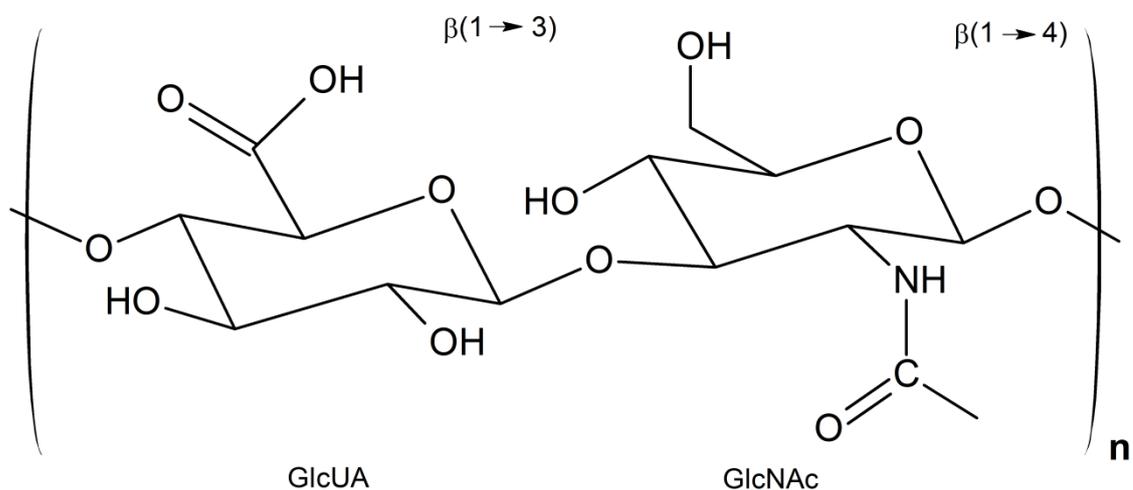


Abbildung 1: Dargestellt sind die sich um die Anzahl n wiederholenden Disaccharid-Einheiten der Hyaluronsäure mit der Summenformel $C_{14}H_{21}O_{11}N$. β -1,4-D-Glucuronsäure (GlcUA) als Uronsäure und β -1,3-N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) als Aminozucker der Disaccharid-Einheit. Die Einheiten sind glykosidisch $\beta(1 \rightarrow 4)$ verbunden. Bei Hyaluronsäure-Natriumsalz ist an der Hydroxygruppe der Carboxygruppe von GlcUA Wasserstoff (H) durch Natrium (Na) ausgetauscht. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung nach Boeriu et al., 2013.

Hyaluronsäure weist durch die glykosidische Bindung eine ungewöhnlich hohe Kettensteifigkeit auf, was dazu führt, dass die Moleküle in Lösung eine extrem hohe intrinsische Viskosität $[\eta]$ (auch Grenzviskositätszahl oder Staudinger-Index genannt) und einen sehr großen hydrodynamischen Radius aufweisen. In Tabelle 1 sind einige intrinsische Viskositäten im Vergleich zur Molekülmasse von Hyaluronsäure aufgelistet. Die Viskosität der HA nimmt ab, je stärker die Scherkräfte werden. Das bedeutet, sie ist strukturviskos. Einigen Angaben zufolge ist Hyaluronsäure aber sogar thixotrop, was bedeutet, dass die Viskosität mit der Zeit bei andauernder Scherung mit konstanter Scherrate ebenfalls abnimmt. (Heinzmann et al., 2007) Zudem ist sie empfindlich gegenüber hohen Scherraten, da die Ketten brechen können. Das Masse- zu Ladungsverhältnis ist konstant, ungeachtet der Molekülmasse. Hyaluronsäure bildet mit Wasser mukoide Lösungen (Heinzmann, 2010; Garg et al., 2004; Wohlrab et al., 2004).

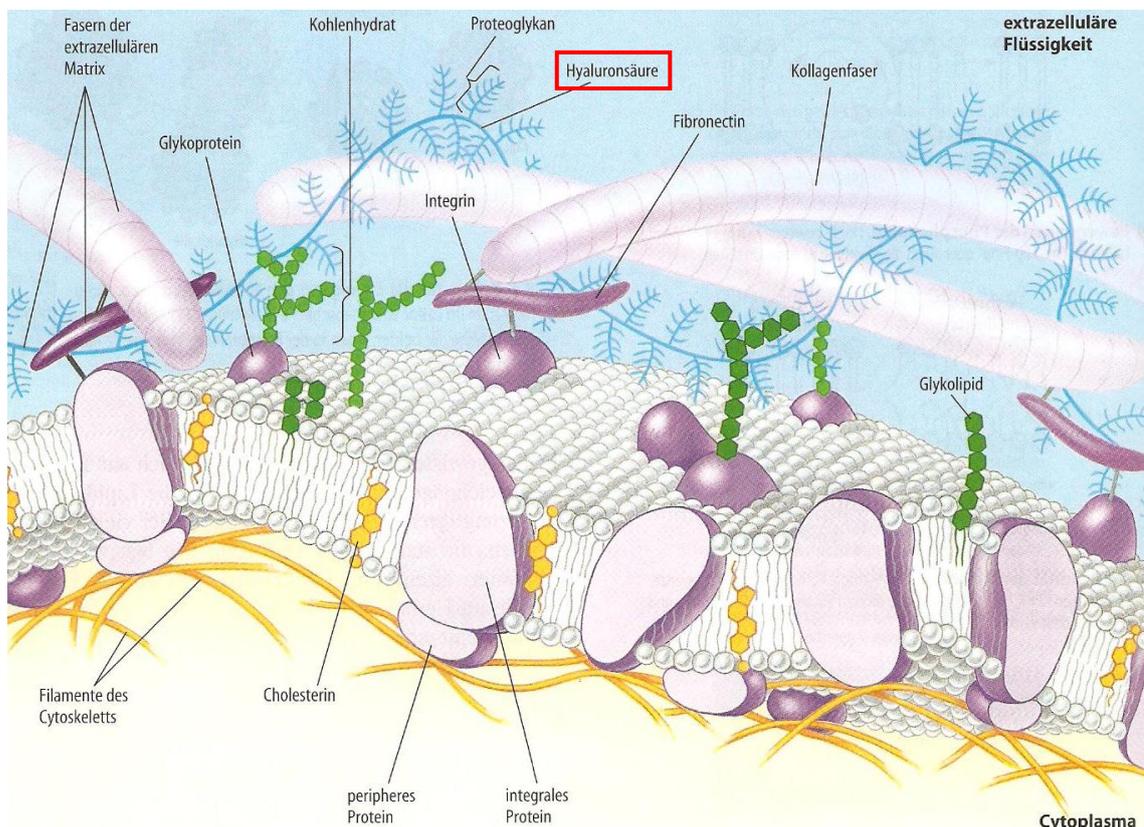


Abbildung 2: Lokalisation der Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix. An der Abbildung nach © Pearson Education, Inc. sind Ergänzungen vorgenommen worden.

Hyaluronsäure wird heute häufig bei der Wundheilung in der Ophthalmologie, Orthopädie und in kosmetischen Produkten eingesetzt (Wohlrab et al., 2004; Necas et al., 2008). Die fehlende Immunogenität macht Hyaluronsäure sehr attraktiv für die Biomedizin zur Entwicklung von Materialien und Wirkstoffen. In der Biomedizin kann unmodifizierte HA jedoch wegen schlechter biomechanischer Stabilität, guter Wasserlöslich-

keit sowie schnellem Abbau *in vivo* kaum verwendet werden (Garg et al., 2004). Hier wird hochmolekulare Hyaluronsäure gebraucht, die eine geringe Dispersität (Verteilung) aufweist (Liu et al., 2011; Chong et al., 2005). Die Produktion und Molekülmasse von Hyaluronsäure durch Biosynthese hängt von den Nukleotidzuckern UDP-GlcUA und UDP-GlcNAc ab (Wohlrab et al., 2004). Die hauptsächlichen Ziele chemischer Modifikation, durch z.B. Veresterung von HA-Polymeren, sind die Hydroxyl- und Carboxylgruppen (Prestwich, 2001).

Tabelle 1: Gegenüberstellung von der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ zu der Molekülmasse M_w von verschiedenen Hyaluronsäure-Proben. ^[1] (Mendichi et al., 2002), ^[2] (Mendichi et al., 2003) und ^[3] (Bothner et al., 1988)

Molekülmasse M_w in MDa	Intrinsische Viskosität $[\eta]$ in dL/g
7,40	53,4 ^[1]
3,50	34,0 ^[1, 2]
1,91	24,1 ^[3]
1,65	21,7 ^[1, 2]
1,21	18,0 ^[2]
0,58	10,6 ^[2]
0,27	6,9 ^[3]

Zurzeit kann man Hyaluronsäure durch Extraktion aus Tiergewebe (z.B. seit den Achtzigern aus Hahnenkämmen) gewinnen, durch Fermentation von pathogenen sowie nicht-pathogenen Mikroorganismen wie z.B. *Pasteurella multocida* oder *Escherichia coli* herstellen oder durch isolierte Hyaluronsäure-Synthetase *in vitro* synthetisieren (DeAngelis et al., 2004). Man ist imstande, kleinere, d.h. um die 1 MDa große Hyaluronsäure-Polymere bereits durch Fermentation eines rekombinanten nicht-pathogenen *Bacillus-subtilis*-Stamms oder andere rekombinante Organismen herzustellen

(Widner et al., 2005). Streptokokken der serologischen Gruppe C werden häufiger als die der Gruppe A zur Produktion verwendet, da sie nicht pathogen und produktiver sind (Boeriu et al., 2013). Zur Gruppe C gehört z.B. auch der Stamm *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* (Lancefield, 1933). Diese Mikroorganismen bilden eine extrazelluläre Hyaluronsäure-Kapsel (Chong et al., 2005). Wegen zunehmender Allergien gegen nicht entfernte Vogelproteine bei der Herstellung aus Hahnenkämmen oder der kritischen Entfernung von Exo- und Endotoxinen bei der Beispielsweise durch Streptokokken gewonnenen HA, ist es sinnvoll auf rekombinante Mikroorganismen wie *B. subtilis* auszuweichen. Andererseits wird durch Fermentation mit *Bacillus subtilis* aber ein geringerer Titer und eine niedrigere Molekülmasse als mit Streptokokken erreicht (Liu et al., 2011). Die HA aus Hahnenkämmen ist zusätzlich mit Proteoglykanen komplexiert, wodurch hochreine, hochmolekulare HA sehr teuer und dieses Verfahren unattraktiv wird (O'Regan et al., 1994; Nielsen et al., 2005).

2.2 *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*

Die Hyaluronsäure-Polymere, mit denen die Methode etabliert werden soll, stammen aus der Fermentation eines Streptokokken-Stamms. *Streptococcus zooepidemicus* ist eine der Subspezies von *Streptococcus equi* (Köhler, 2007). Es kommt in der normalen Bakterien-Flora von Pferden vor und löst in Tieren einschließlich Menschen Infektionen aus (Stevens et al., 2000). Wie andere Streptokokken, ist es unbeweglich, verkapselt und kann keine Sporen bilden. Zudem ist es Gram-positiv und Katalase-negativ. Streptokokken-typisch bildet es kettenförmige gelagerte Kokken. Es ist β -hämolytisch (komplette Hämolyse) und pyogen (Eiter bildend) (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 1995). Es besitzt das gruppenspezifische Antigen der Lancefield-Gruppe-C-Streptokokken (GCS) (Lancefield, 1933).

2.3 Molekülmasse und Dispersität

Polymere, darunter auch Hyaluronsäure, sind polydispers. Dies bedeutet, sie besitzen nicht eine distinkte Molekülmasse wie zum Beispiel Proteine, sondern eine Molekülmassenverteilung. Die einzelnen Polymerketten bestehen aus sehr stark unterschiedlicher Anzahl von Monomereinheiten. Die Molekülmasse einer Polymerprobe wird durch Mittelwertbildung angegeben. An jedem Punkt eines Peaks aus der Größenausschluss-Chromatographie gibt es eine Molekülmasse. Diese große Anzahl muss nun in eine

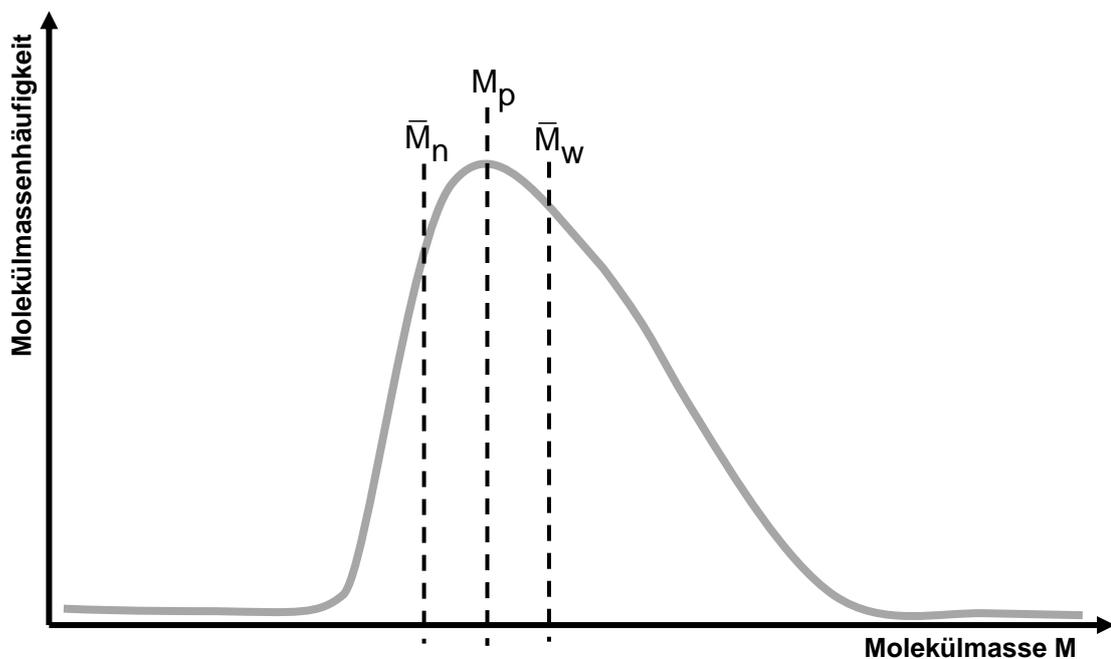


Abbildung 3: Fiktives Chromatogramm einer möglichen SEC-Trennung. Hier ist beispielhaft dargestellt, an welchem Punkt der Molekülmassenverteilung die Molekülmassenmittelwerte sich befinden können, wobei sich M_p immer an der Peakspitze befindet, und M_n und M_w davon abweichen können. Hierbei handelt es sich um ein uneinheitliches Polymer, da M_n und M_w voneinander abweichen. Bei einem einheitlichen Polymer würden diese aufeinander liegen bzw. deren Werte gleich sein. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung nach Striegel et al., 2009.

mittlere Molekülmasse umgerechnet werden. Jeder Molekülmassenmittelwert wird auf eine andere mathematische Weise berechnet. Es kann z.B. ein arithmetischer Mittelwert (M_n = number average molar mass) oder auch ein nach dem Gewicht gemittelter Wert (M_w = weight average molar mass) sein. Wenn auf Mittelung verzichtet werden soll kann auch die Molekülmasse an der Peakspitze (M_p = peak average molar mass) angegeben werden, was jedoch sehr ungenau und kaum reproduzierbar ist. Anhand von Abbildung 3 bekommt man einen Eindruck zur Dispersität einer Probe, und Tabelle 2 kann man die Definitionen der Molekülmassenmittelwerte entnehmen. Die jeweilige Dispersität \mathcal{D} des Polymers wird durch das Verhältnis der Mittelwerte der Molekülmassen M_w und M_n beschrieben. Ohne diese beiden Werte kann die Dispersität also nicht bestimmt werden. Die IUPAC definiert die Dispersität als ein Maß für die Verteilung (oder Ausbreitung) der Molekülmasse, relativen Molekülmasse, des Molekulargewichts oder Polymerisationsgrades. Für ein einheitliches Polymer ist $\mathcal{D} = 1$ (Strepto, 2009; Lechner et al., 2010).

Tabelle 2: Molekülmassenmittelwerte, Dispersität und ihre Definitionen. Angaben nach Strepto, 2009 und Striegel et al., 2009.

Wert	Statistisches Gewicht (g)	Definition	Information
Zahlenmittel \bar{M}_n	n_i	$\bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}$	-
Massenmittel \bar{M}_w	m_i	$\bar{M}_w = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i m_i}$	-
Peakmolekülmasse M_p	-	-	Molekülmasse an der Peakspitze
Dispersität \mathcal{D}	-	$\mathcal{D} = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$	-

Zur Molekülmassenbestimmung von Polymeren gibt es mehrere Methoden. Diese werden in absolute und relative Methoden unterteilt. Die Größenausschluss-Chromatographie gehört z.B. zusammen mit der Viskosimetrie zu den Relativmethoden. Zu den Absolutmethoden zählt zum Beispiel das Verfahren der Lichtstreuung. Bei den Relativmethoden handelt es sich um Verfahren, bei denen kein direkter, durch mathematische Gleichungen ausdrückbarer physikalisch-chemischer Zusammenhang zwischen der erhaltenen Messgröße und der Molekülmasse der Probe besteht. Der Zusammenhang entsteht nur durch eine zwingend notwendige Kalibrierung mit Proben bekannter Molekülmasse. Als Proben zur universellen Kalibrierung sollten im Idealfall

strikt monodisperse Standards derselben Substanz verwendet werden. Des Weiteren kann die SEC mit monodispersen Standards über die Peak-Position oder über die Mark-Houwink Gleichung kalibriert werden. Mit der Hamielec-Methode oder einer der optimierten Versionen davon kann mit polydispersen Standards kalibriert werden (Striegel et al., 2009; Balke et al., 1969). Die SEC wird jedoch in Kombination mit einem Lichtstreuendetektor und einem Konzentrationsdetektor, beispielsweise einem UV-Detektor oder RI-Detektor, zu einer Methode, die absolute Molekülmassen ohne Kalibrierung liefert (Koltzenburg et al., 2014).

2.4 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Die Bestimmung der Molekülmasse und Dispersität der Hyaluronsäure soll chromatographisch, auf Basis der Größenausschluss-Chromatographie (engl. Size Exclusion Chromatography, SEC), erfolgen. Die SEC ist ein flüssigchromatographisches Verfahren (engl. Liquid Chromatography, LC), das vielfach zur Auftrennung von Biopolymeren verwendet wird (Biochromatographie). Bei der LC ist die mobile Phase regelmäßig flüssig und bewegt sich in eine bestimmte Richtung an der anderen (stationären) Phase, die meistens fest ist, vorbei (Engelhardt et al., 1995; Gey, 2008).

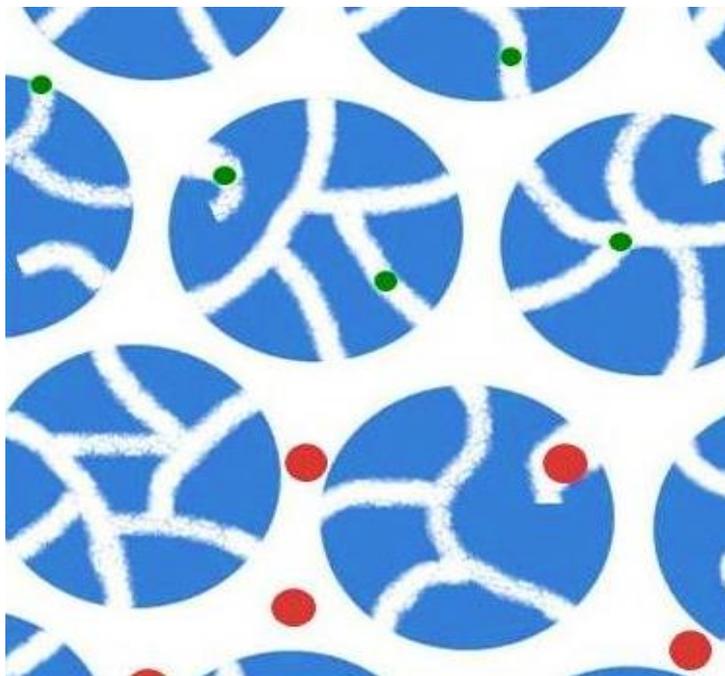


Abbildung 4: Schema der chromatographischen Trennung in den Beads mit Poren und Kanälen (stationäre Phase) bei der Größenausschluss-Chromatographie (SEC). Die mobile Phase bewegt sich zusammen mit den Molekülen von oben nach unten an der stationären Phase vorbei. Sterische Effekte beeinflussen die Elutionsreihenfolge. Große Moleküle (rot) eluieren vor kleinen Molekülen (grün), da sie fast oder vollkommen vom Porensystem der stationären Phase (blau) ausgeschlossen sind. Kleinere Moleküle hingegen retardieren und eluieren später. Bei der Abbildung handelt es sich um eine eigene Darstellung.

Mittels SEC können gelöste Biopolymere nach Gewicht und Größe, genauer nach dem hydrodynamischen Volumen getrennt werden. Das hydrodynamische Volumen ist über die intrinsische Viskosität proportional zur Molekülmasse. Die SEC wird verwendet,

um die Molekülmassenmittelwerte und damit die Dispersität zu bestimmen. Es sind keine physikalisch-chemischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase erwünscht, wie dies bei anderen Methoden der Fall ist (Striegel et al., 2009).

In der Praxis werden häufig Säulen verwendet, die beispielsweise mit porösen sphärischen Kugeln („beads“) als stationärer Phase gepackt sind. Die Wahl der Säule richtet sich nach der Probenzusammensetzung, dem bzw. den Eluenten und dem Molekülmassenbereich. Die Poren bzw. Kanäle weisen eine spezifische Größenverteilung auf, und haben etwa die Größe der Probenmoleküle. Große Moleküle eluieren bei der SEC zuerst, da sie kaum oder gar nicht in das Porensystem der stationären Phase eindringen können, kleinere hingegen werden vom Porensystem retardiert (Abbildung 4). Da Molekülen mit abnehmender Größe ein größeres effektives Porenvolumen zur Verfügung steht, ergibt sich somit, dass große vor kleineren Molekülen eluieren. Es ist nicht empfehlenswert, Substanzen nahe an der oberen oder unteren Molekülmassentrennungsgrenze zu trennen. Im Anschluss an die Trennung in der Säule erfolgt die Detektion der Moleküle über ein oder mehrere Parameter (z.B.: UV, RI und/oder LS) (Gey, 2008; Striegel et al., 2009; Cammann, 2001).

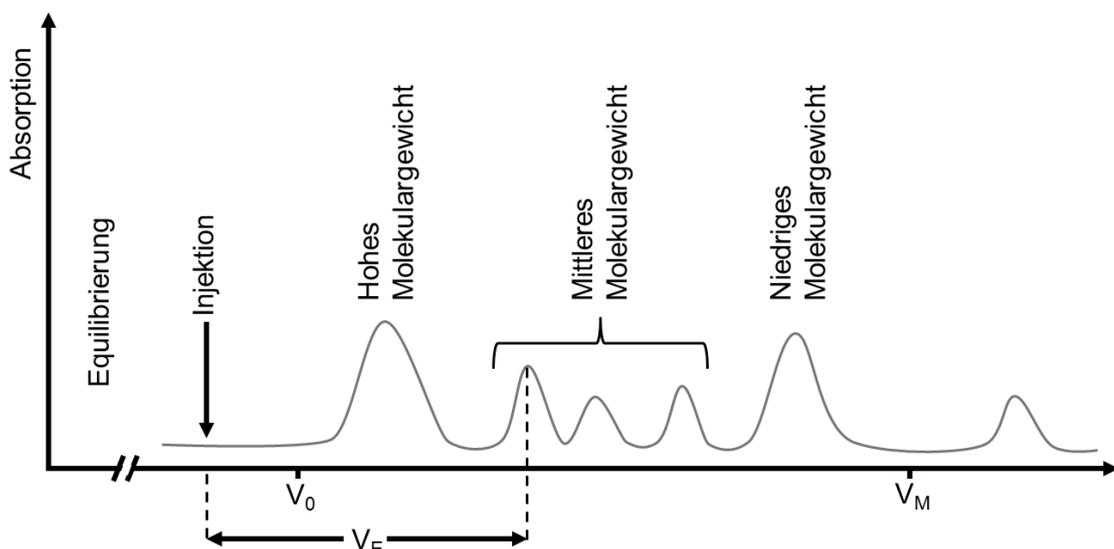


Abbildung 5: Theoretische Elutionsreihenfolge bei der SEC. Aufgetragen wurde die Absorption gegen das Volumen. V_0 entspricht dem Volumen bei dem Moleküle eluieren, welche aufgrund ihres hydrodynamischen Durchmessers nicht in das Porensystem eindringen können. Es wird auch Ausschlussvolumen der Säule genannt. V_E wird das jeweilige Elutionsvolumen der Substanz genannt. V_M entspricht dem Volumen der mobilen Phase. Abbildung nach GE Healthcare, 2007, modifiziert.

Die Größentrennung bei der SEC erfolgt aufgrund der differentiellen Verteilung der gelösten Probe zwischen dem Volumen der mobilen Phase außerhalb und innerhalb der Poren der Säulenpackung. Der Vorgang, bei dem einige Moleküle in das Porensystem eindringen und durch dieses diffundieren, wird auch Permeation genannt. Nach oder mit

dem Volumen der mobilen Phase V_M (Abbildung 5 und Abbildung 6) eluieren alle Moleküle, die so klein sind, dass sie vollständig alle Poren durchdringen (totale Permeation). Über die Retentionszeit bzw. das Retentionsvolumen (auch Elutionsvolumen) kann dann auf die Molekülmasse der Substanz geschlossen werden (Cammann, 2001).

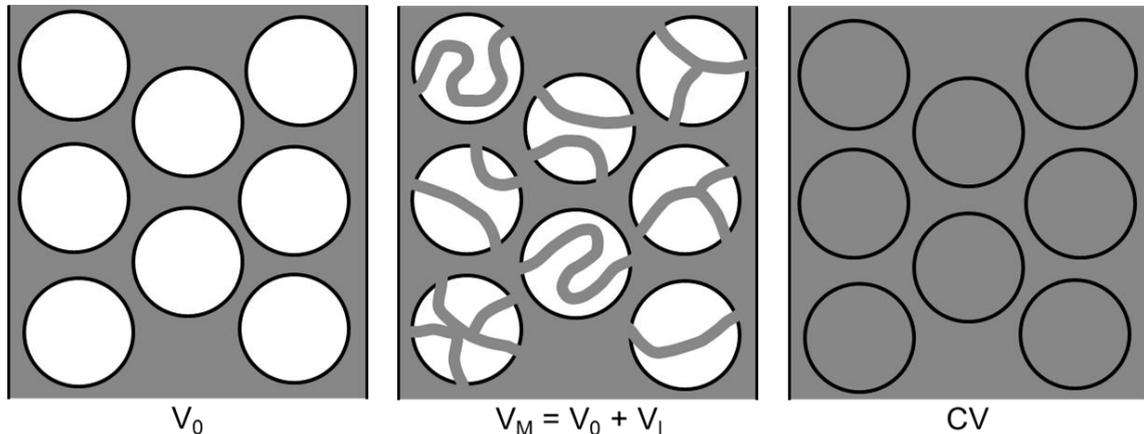


Abbildung 6: Schemata der verschiedenen Volumina die eine Rolle bei der SEC spielen. V_0 entspricht dem interstitiellen Volumen zwischen den Partikeln der gepackten Säule, ohne das Trägerporensystem. V_M ist das Volumen der mobilen Phase, zusammengesetzt aus dem interstitiellen Volumen V_0 zwischen den Partikeln und dem internen Porenvolumen V_1 . CV entspricht dem gesamten Säulenvolumen (Column Volume) aus dem Volumen der mobilen Phase und der stationären Phase. Abbildung nach GE Healthcare, 2007, modifiziert.

Die Trennung von Molekülen mit der SEC ist ein durch Entropie kontrollierter Vorgang. Temperaturänderungen haben bei der SEC nur einen kleinen Nebeneffekt, da diese nämlich die Größe der Polymermoleküle beeinflusst. Wenn hochmolekulare Polymere bei hohen Flussraten separiert werden, kann es bei der SEC zu zwei Effekten kommen. Diese nennen sich hydrodynamische (HDC) und Slalom-Chromatographie (SC) Effekte, welche, anders als die SEC, nicht auf Gleichgewichts-Chromatographie beruhen. Bei der SC ist die Elutionsreihenfolge umgekehrt zu derjenigen bei SEC und HDC. Bei der SC zum Beispiel drehen sich die Moleküle beim Durchwandern immer wieder um die Partikel der Säulenpackung herum, welches die Elution größerer Moleküle deutlich stärker verzögert als die von kleinen Molekülen. Inhomogen gepackte Säulen können eine Verbreiterung des Peaks hervorrufen. Die Packungsqualität der Säule wird zusätzlich durch die Partikelgrößenverteilung und die Form der Partikel beeinflusst. Jedoch kommt es auch aus anderen Gründen zur Peakverbreiterung. Dazu zählt die Eddy-Diffusion, bei der die Moleküle verschiedene Wege durch die Säule gehen. Dieses Phänomen ist auf die Brownsche Molekularbewegung zurück zu führen. Außerdem führt das laminare Strömungsprofil zu verschiedenen lokalen Fließmittelgeschwindigkeiten zwischen den Partikeln und in den Partikelporen (Striegel et al., 2009).

Viskosimetrische Verfahren spielen in der Praxis der SEC eine große Rolle, da anhand der Viskosität oftmals festgestellt wird, ob das Produkt den Spezifikationen, in diesem Fall also der gewünschten Molekülmasse, entspricht. Hyaluronsäure in Lösung weist gegenüber der mobilen Phase eine erhöhte Viskosität auf, die von der Konzentration und der Molekülmasse abhängig ist. Die Probenkonzentration ist wegen der Viskosität in der SEC oftmals limitiert. Bei hohen Probenkonzentrationen kann erhöhte Lösungsviskosität durch „viscous fingering/streaming“ signifikante Bandenverbreiterung hervorrufen (Striegel et al., 2009).

2.5 Detektionsverfahren

In Betracht gezogen wurden hier die Detektion über die Lichtbrechung und UV-Spektroskopie. Ein Detektor hat die Aufgabe, ein chromatographisches Konzentrationsprofil wahrnehmbar zu machen. Über die erhaltenen Retentionszeiten können dann die einzelnen Substanzen charakterisiert und identifiziert werden. Aus den Signalfächern kann eine quantitative Aussage gemacht werden. Detektoren unterschiedlicher Messprinzipien werden direkt hinter die Säule geschaltet. Dadurch kann eine kontinuierliche Messung erfolgen. Ideale Detektoren haben eine sehr geringe Drift, niedriges Rauschen und hohe Empfindlichkeit. Außerdem besitzen sie ein schnelles Ansprechverhalten sowie einen großen dynamischen Bereich und ein geringes Totvolumen. Auch die Messzellen müssen gegenüber den verwendeten Eluenten unempfindlich sein (Schwedt et al., 2010).

Wird bei der SEC ein konzentrationsabhängiger Detektor, wie der UV- oder RI-Detektor verwendet, erhält man eine Größenverteilung in der Gewichtskonzentration. Mit Hilfe von Kalibrierung können dann die Daten in eine Molekülmassen-Verteilung konvertiert werden. Ebenso können dadurch die Molekülmassenmittelwerte und damit die Dispersität bestimmt werden.

2.5.1 Detektion über Lichtbrechung

Die Konzentration einer Substanz kann mittels Brechungsindex n (englisch refractive index, RI) über einen RI-Detektor (RID) bestimmt werden. Der Brechungsindex ist ein Maß für die Abschwächung der Geschwindigkeit, die das Licht beim Übergang von einem Medium in ein anderes Medium erfährt und hängt von der Wellenlänge und der Dichte ab. Bei der LC registriert der Detektor Verbindungen, die einen anderen Brechungsindex als die reine mobile Phase aufweisen. Aufgezeichnet wird in diesem Fall die Änderung des Brechungsindex bzw. die unterschiedliche Brechung eines Licht-

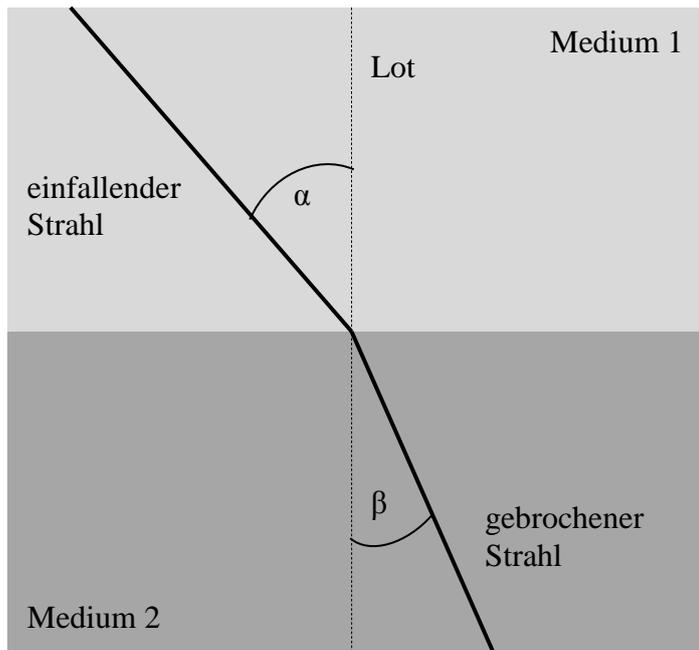


Abbildung 7: Lichtbrechung beim Übergang von einem optisch dünneren in das optisch dichtere Medium. Die Formel 1 (das Snellius'sche Brechungsgesetz) dient zum berechnen des Brechungsindex. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung nach Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH.

strahls. Deswegen nennt sich diese Art von RI-Detektor auch Differenzialrefraktometer. Der RID ist ein universeller Detektor und dadurch im Vergleich zu anderen Detektoren nicht sehr selektiv und empfindlich (Nachweisgrenze: 100-1000 ng). Da der Brechungsindex von der Dichte abhängig ist, muss die Zusammensetzung des Eluenten bei dieser Art von Detektion konstant bleiben, denn die Dichte hängt von der Temperatur, dem Druck und der Medienzusammensetzung ab.

Es ist keine Gradientenelution möglich, denn die Veränderung würde somit das Signal verändern. Der RI-Detektor ist sehr stark temperatur- und druckabhängig. Die Wellenlänge im Detektor ist jedoch in der Regel stabil. Der Brechungsindex von Polymeren bleibt bei unterschiedlicher Molekülmasse konstant, demnach erfolgt eine quantitative Detektion.

Dieser konzentrationsabhängige Detektor bestimmt die Anzahl der Teilchen pro Volumen der strömenden Flüssigkeit (Masse pro Volumen). Der RI-Detektor ist aber nicht nur von der Konzentration abhängig, sondern ebenfalls vom $\frac{dn}{dc}$ -Wert, der Änderung des Brechungsindex der Probe über deren Konzentration. Hyaluronsäure hat zum Beispiel einen ermittelten $\frac{dn}{dc}$ -Wert von 0,15 mL/g in 0,15 M und in 0,5 M NaCl bei 25 °C und einer Wellenlänge von $\lambda = 632,8$ nm (Mendichi et al., 1998).

Beim Übertritt des Lichtstrahls, von einem Medium in ein anderes verändern sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit und der Ausbreitungswinkel. Für diesen Übergang, dargestellt in Abbildung 7 gilt das Snellius'sche Brechungsgesetz:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{c_1}{c_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

Formel 1: Das Snellius'sche Brechungsgesetz

Mit:

α = Einfallswinkel zur Senkrechten (Lot) bezüglich der Einfallsebene hin gemessen

β = Ausfalls-/Brechungswinkel zur Senkrechten (Lot) bezüglich der Einfallsebene

c = Lichtgeschwindigkeit im jeweiligen Medium, mit $c_m = \frac{c_0}{n}$, wobei

c_0 = Lichtgeschwindigkeit

n = Brechungsindex des jeweiligen Mediums

Beim Übergang vom optisch dünneren zum optisch dichteren Medium, wird der Lichtstrahl zum Lot hin gebrochen. Eine Brechung vom Einfallslot weg findet beim Übergang vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium statt (Harris, 2011; Kazakevich).

2.5.2 Detektion mittels UV-Spektroskopie

Spektroskopie beinhaltet analytische Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und dem Probenmaterial basieren. Eine häufig genutzte Wechselwirkung ist die Lichtabsorption, bei der die stoffspezifische Schwächung einer elektromagnetischen Strahlung, beispielsweise UV-Strahlung, ausgenutzt wird. Je nachdem, ob eine Wechselwirkung mit Atomen oder ganzen Molekülen stattfindet, wird zwischen Atom- und Molekülspektroskopie unterschieden. Die UV-Spektroskopie wird zur letzteren Methode gezählt. Bestimmte Wellenlängen(-bereiche) der auftreffenden Strahlung werden am Molekül absorbiert. Daraus resultiert eine Differenz zwischen eingestrahelter und durchgehender Energie. Diese trägt man gegen die Wellenlänge auf, wodurch ein Spektrum zustande kommt. Molekülspektroskopische Methoden dienen vor allem der Strukturaufklärung oder Verfolgung von biochemischen Reaktionen. (Harris, 2011).

Viele Analyten absorbieren im UV-Bereich. Die Ultraviolett-Detektion ist daher eine der meistgenutzten Detektionsprinzipien für die LC. Entsprechende UV-Detektionsgeräte verfügen in der Regel über einen quantitativen Detektor mit Mikrodurchflussküvette. Es gibt drei verschiedene Varianten von Detektoren, welche mit festen oder variablen Wellenlängen und Dioden-Array-Detektoren (Hein et al., 2004). Konzentrationen von Analyten werden basierend auf einem spektralphotometrischen Verfahren, bei dem UV-Licht genutzt wird, bestimmt. Als mobile Phasen dienen Verbindungen oder Mischungen, die nicht oder wenig im UV-Bereich absorbieren (Gottwald et al., 1998). Der Bereich der UV-Strahlung erstreckt sich laut DIN 5031 – Teil 7 (Deutsches Institut für Normung e.V., 1984) von 100 - 380 nm. Als UV-

Lichtquellen dienen Deuteriumlampen. Dabei handelt es sich um Gasentladungslampen. Bei diesen sind in einem unter niedrigem Druck stehenden Glaskolben Anode und Kathode eingeschmolzen. Erst beim Anlegen einer hohen Spannung (von ca. 80 – 100 V) fließt Strom und es treten Gasentladungen auf, wodurch im Ergebnis sichtbares Licht und ultraviolette Strahlung entstehen (Gottwald et al., 1998).

Bei einem aufgenommenen Spektrum einer Substanz ist die Intensität des Signals (Absorption) gegen den Wellenlängenbereich aufgetragen. Bei einem aufgenommenen Chromatogramm hingegen wird bei z.B. einer festgelegten Wellenlänge die Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Bei welcher Wellenlänge das Chromatogramm durch einen UV-Detektor aufgenommen werden sollte, erfährt man durch Aufnahme eines Spektrums durch ein Spektralphotometer (Gottwald et al., 1998).

Bei einem Spektralphotometer wird mit Hilfe eines Monochromators mit geringer Spaltbreite aus dem polychromatischen Licht der Deuteriumlampe (im sichtbaren Bereich eine Wolframlampe) monochromatisches Licht erzeugt. Dies ist notwendig damit das Lambert-Beer'sche-Gesetz über einen großen Konzentrationsbereich gültig ist. Die Absorption des Stoffes bei einer bestimmten Wellenlänge λ ist gegeben durch das Lambert-Beer'sche-Gesetz. Es gilt für Lösungen und Gase.

$$A_\lambda = -\lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 2: Lambert-Beer'sches-Gesetz

Mit:

A_λ = Extinktion oder Absorbanz/Absorption bei der Wellenlänge λ

I = Intensität des Lichts vor und nach der Schwächung durch den Stoff in W/m^2

d = Schichtdicke der Küvette in cm

c = Konzentration der Probe in der Küvette in mol/L

ε = molarer Extinktionskoeffizient in $\text{L}/\text{mol}\cdot\text{cm}$

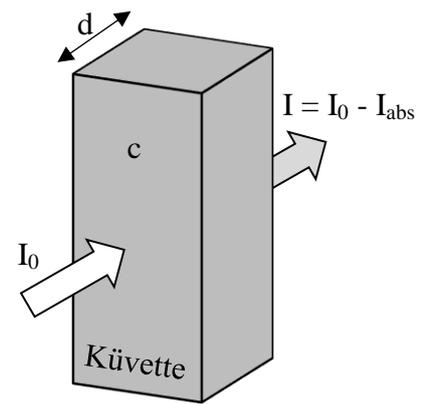


Abbildung 8: Abbildung zur Erklärung des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Die Intensität des Lichts (I_0) wird durch die in der Küvette befindliche Lösung geschwächt (I). Je höher die Konzentration c der Lösung, desto größer ist diese Schwächung. Die Abbildung ist eine eigene Darstellung.

Das Licht der Lampe gelangt hinter der Küvette (Abbildung 8) auf einen Detektor (z.B. eine Photodiode). Hier wird es in elektrische Signale umgewandelt, registriert und auf einem Anzeigeelement sichtbar gemacht. Mit einem Spektralphotometer können (durch Verstellen des Monochromators) sowohl Spektren, als auch die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge aufgenommen werden (Hein et al., 2004).

2.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE) ist eine trägergestützte Elektrophorese, bei der man eine horizontal angeordnete Platte verwendet, worauf das Trenngel aus Agarose homogen und mit gleicher Schichtdicke aufgetragen wird. Mit dieser Elektrophorese, werden geladene Moleküle im Gleichstromfeld nach ihrer Molekülmasse, ihrer Ladung und dem Volumen getrennt. Kleinere und stärker positiv geladene Moleküle wandern dabei schneller durch die Gelmatrix zur Kathode als größere und weniger stark positiv geladene Moleküle (Siebeffekt). Die Moleküle befinden sich während der Elektrophorese in einer wässrigen Lösung, dem Puffer. Die anionischen und kationischen Analyten migrieren zu den Polen mit entgegengesetzter Ladung. Hyaluronsäure ist negativ geladen und wandert aufgrund dessen nach Anlegen einer Spannung zur Anode und positioniert sich entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit im Agarose-Gel (Gey, 2008; Jansohn et al., 2012).

Agarose wird aus Zellwänden von roten Meeresalgen gewonnen und ist aus glykosidisch verbundenen Einheiten von β -1,3-D-Galactopyranose und 3,6-Anhydro- α -1,4-L-Galactopyranose aufgebaut. Das Polysaccharid ist ein lineares ungeladenes Molekül und zeigt wenige Wechselwirkungen mit Proteinen und Nucleinsäuren. Die Agarose-Gel-Elektrophorese wird vor allem zur DNA-Sequenzierung verwendet.

Wenn Agarose erwärmt wird, polymerisiert sie und bildet beim Abkühlen eine Gelmatrix (Doppelhelices) mit einem Porendurchmesser von 100-500 nm, wobei der Durchmesser von der Konzentration an Agarose abhängig ist. Die Porengröße verkleinert sich mit steigender Agarosekonzentration. Agarose hat im Vergleich zu anderen für Gele verwendeten Polymeren, eine große mittlere Porengröße und ist deswegen gut geeignet, um HA mit hoher Molekülmasse (high molecular weight hyaluronan, HMWHA) zu trennen (Garg et al., 2004; AppliChem, 2009; Mülhardt, 2013).

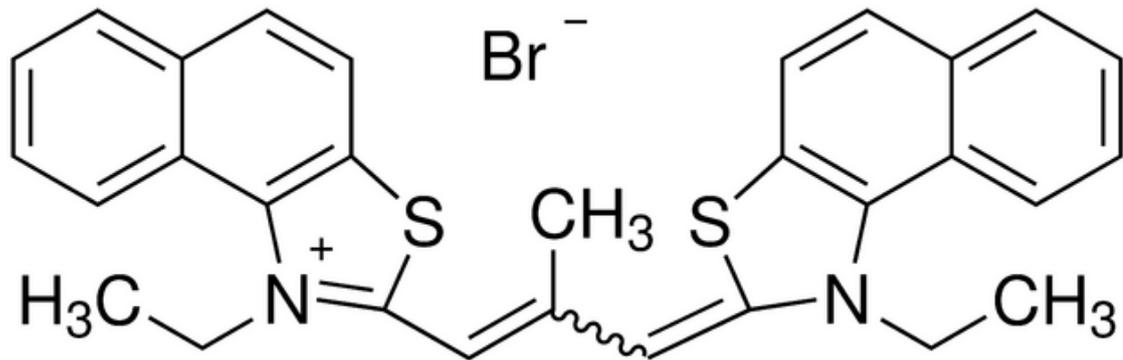


Abbildung 9: Die chemische Struktur von Stains-All (1-Ethyl-2-[3-(1-ethylnaphtho[1,2-d]thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl]naphtho[1,2-d]thiazolium bromide). Die Abbildung stammt von Sigma-Aldrich®.

Die Moleküle im Gel sind nach der Elektrophorese noch nicht sichtbar und müssen angefärbt werden. Das Anfärben mit Stains-All von Agarose-Gelen in denen z.B. auch DNA und RNA aufgetrennt wurde, ist in vielen Veröffentlichungen beschrieben worden. Es handelt sich hierbei um einen kationischen Farbstoff, der zu den geschlossenkettigen Cyaninen mit Benzothiazol-Endgruppen (Thiacarbocyanin) gehört. Stains-All wurde so benannt, weil es Nukleinsäuren und Proteine sowie saure Polysaccharide färbt. Die Substanz ist ein dunkelgrünes bis braunes Pulver, welches, wie viele Cyanine, lichtgeschützt und bei 2-8 °C gelagert werden muss. Die chemische Struktur dieses Cyanin-Farbstoffs ist in Abbildung 9 dargestellt. Stains-All färbt DNA und Glykoproteine blau, Proteine rot und Lipide gelb-orange. Hyaluronsäure wirkt blau-lila (Dahlberg et al., 1969).

Anhand von Standards die zusätzlich zu der zu untersuchenden Probe auf das Gel aufgetragen werden, kann nach der Färbung auf die Ladung und Größe der Moleküle geschlossen werden.

3 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel sind die Vorgehensweisen zu den jeweiligen verwendeten Methoden beschrieben, und welche Probleme dabei gegebenenfalls zu überwinden waren. Die Auflistung der verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Programme befinden sich im Anhang B Materialien und Daten.

3.1 Verwendete Standards, Materialien und Proben

Als Arbeitsmaterial für die Methodenentwicklung diente Hyaluronsäure-Natriumsalz (Abbildung 10) mit verschiedenen Molekülmassen aus der Fermentation mit *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*. Genauere Informationen, wie beispielsweise die Molekülmassen zu den Arbeitsmaterialien, sind in Tabelle 9 und in den jeweiligen Analysezertifikaten (Certificate of Analysis, COA) in Anhang A und B zu finden. Es wurden Lösungen von den Arbeitsmaterialien in einer Natriumchlorid-Lösung (NaCl) als Standards von Konzentrationen mit 1, 2 und/oder 3 mg/mL hergestellt. Dafür wurden 50, 100 und 150 mg eingewogen und jeweils in 50 mL 0,2 M NaCl gelöst. Um die HA in dem NaCl zu lösen, wurden die Röhrchen in einen rotierenden Mischer eingespannt und für einige Minuten bis Stunden langsam geschüttelt. Die Konzentration der bereits fermentierten HA liegt bei ca. 2,5 mg/mL, weshalb die Standardkonzentrationen um diesen Bereich herum gewählt wurden. Diese Standards dienen als Referenzmaterialien zur Überprüfung der Genauigkeit der Methode. Genutzt wurden vier verschiedene Hyaluronsäure-Proben mit unterschiedlichen Molekülmassen. Vorhanden war Hyaluronsäure-

Natriumsalz mit Molekülmassen von 0,35 MDa, 1,2 MDa, 1,67 MDa und 2,12 MDa. Über eine Fermentation mit dem Streptokokken-Stamm ATCC 35246 wurde Hyaluronsäure produziert. Zur Abtren-



Abbildung 10: Alle Hyaluronsäure-Natriumsalz Proben der verschiedenen, welche zur Methodenentwicklung verwendet wurden, lagen als weißes Pulver vor. Abbildung nach Russell Publishing Ltd., modifiziert.

nung der HA von den Zellen wurde zu den 500 mL Fermentationskultur 500 mL 0,1%iges SDS hinzugegeben, 10 min gewartet und dann für 10 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand für 10 min auf 70 °C erhitzt, erneut zentrifugiert und anschließend durch einen 0,22 µm PES-Filter filtriert. Dieser Fermentationsüberstand (FÜ) diente ebenfalls als Probe für die Entwicklung der SEC und wurde bei der AGE ebenfalls aufgetragen. In Tabelle 3 ist eine Übersicht der Proben dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Proben mit Molekülmasse und Konzentrationen.

Name der Probe	Beschreibung	Konzentration
2,12 MDa HA	Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa gelöst in 0,2 M NaCl	Angesetzt in Konzentrationen von 1, 2 und 3 mg/mL
1,67 MDa HA	Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa gelöst in 0,2 M NaCl	Angesetzt in einer Konzentration von 3 mg/mL
1,2 MDa HA	Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa gelöst in 0,2 M NaCl	Angesetzt in Konzentrationen von 1, 2 und 3 mg/mL
0,35 MDa HA	Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa gelöst in 0,2 M NaCl	Angesetzt in einer Konzentration 3 mg/mL
FÜ	Fermentationsüberstand	2,5 mg/mL

3.2 Aufnahme des UV-Spektrums

Um zu wissen, bei welcher Wellenlänge mit dem UV-Detektor gemessen werden musste, wurde mit dem Photometer (siehe Tabelle 11) ein Spektrum des HA-Arbeitsmaterials aufgenommen. Das Spektrum wurde von 200 - 600 nm aufgenommen, also sowohl im sichtbaren als auch im UV-Bereich. Die verwendete Küvette bestand aus Quarz (SiO₂, Siliziumdioxid). Glas oder Polystyrol sind nur für den sichtbaren Bereich geeignet, da sie UV-Strahlen sehr stark absorbieren. Bei der UV-Spektroskopie sollte man möglichst bei der Wellenlänge am Extinktionsmaximum messen (Harris, 2011; Gottwald et al., 1998).

3.3 Verwendete Puffer, Apparate und Methoden für die SEC

Als Puffer für die Chromatographie (mobile Phase) wurde 0,2 M Natriumchlorid (NaCl) verwendet, um störende ionische Wechselwirkungen mit der stationären Phase zu unterdrücken. Vom Hersteller der Säulenpackung wurde deswegen eine Mindestkonzentration von 0,15 M NaCl im Puffer empfohlen. Dazu wurden für einen Liter jeweils

11,68 g Natriumchlorid eingewogen und in VE-Wasser gelöst. Mit diesem Puffer wurden auch die Proben angesetzt. Der Trennvorgang findet unter isokratischen Bedingungen statt, das bedeutet, die Zusammensetzung der mobilen Phase bleibt während des gesamten Laufs konstant.

Als erstes musste die Säule mit dem Material gepackt werden. Hierzu wurde das Material mit der mobilen Phase suspendiert und dann in die senkrecht stehende Säule gefüllt. Da keine Pumpe vorhanden war, musste gewartet werden, bis sich das Material abgesetzt hat, oder es wurde mit einer Spritze nachgeholfen, indem mit dieser unten die mobile Phase abgesaugt oder oben unter ein wenig Druck eingefüllt wurde. Die verwendete Säulenpackung Sephacryl S-500 High Resolution hat relativ große Partikel. Dieses und ähnliches Material wurde in den letzten Jahren auch von anderen zur Analytik von Hyaluronsäure verwendet (Joeng et al., 2014; Hardingham et al., 2000). Man kann zwischen vielen verschiedenen Säulendimensionen und Säulenmaterialien wählen. Bei der Wahl spielen die chemische und mechanische Stabilität und die spezifische Oberfläche eine Rolle. Die stationäre Phase muss bei dem Druck mechanisch stabil sein und eine spezifische Oberfläche aufweisen, damit sie mit der mobilen Phase ein bestimmtes Verhältnis beibehält. Diese spezifische Oberfläche kann nur mit porösen Trägermaterialien, wie z.B. quervernetzten Polymeren, erreicht werden. Die mobile Phase sollte bei der LC frei von gelösten Gasen sein, damit z.B. durch die Kompression an der Pumpe oder durch die Entspannung auf Atmosphärendruck nach der Säule kein Ausgasen möglich wird. Dadurch kann es allerdings eventuell zu nicht reproduzierbaren Messwerten kommen. Außerdem muss auf eine geeignete Partikel- und Porengröße geachtet werden (Gey, 2008; Cammann, 2001). Die Säulenlänge der verwendeten Kronlab-Säule vom einen Stopfen zum anderen Stopfen betrug ca. 88 cm bei einem Durchmesser von 1,5 cm. Daraus errechnete sich ein Säulenvolumen (CV) von ca. 155 mL. Als Faustformel gilt, dass man 0,5 - 4 % des CV als Probenvolumen auftragen soll, wenn nach der Molekülmasse aufgetrennt werden soll. Dies würde einem Volumen von ca. 0,8 – 6 mL entsprechen. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 2 mL, was ungefähr 1,5 % des CV entspricht. Weitere Informationen zu Säule und Material sind Tabelle 10 und Tabelle 11 entnehmbar.

Das Vorbereiten der LC-Anlage lief ab, wie im Folgenden beschrieben. Zuerst musste das Gas aufgedreht und der Entgaser angestellt werden. Wenn die Säule oder richtige Injektionsschleife nicht angeschlossen waren, mussten diese zunächst unter niedrigem

Fluss von z.B. 0,2 mL/min angeschlossen werden. Außerdem musste im System die mobile Phase vorhanden sein. War dies nicht der Fall, musste es vorher damit gespült werden. Bei längerer Nichtbenutzung der Anlage, sollte das System mit VE-Wasser oder 20 % Ethanol gespült werden. Bei erneuter Verwendung ist es somit vonnöten, das System anschließend mit der gewünschten mobilen Phase zu spülen. Säulen und Säulenmaterialien sollten bei längerer Lagerung in 20 % Ethanol gelagert werden und müssen dann vor Verwendung mit der mobilen Phase equilibriert werden.

Die mobile Phase sollte bei der LC frei von gelösten Gasen sein, damit z.B. durch die Kompression an der Pumpe oder durch die Entspannung auf Atmosphärendruck nach der Säule kein Ausgasen möglich wird. Andernfalls kann es zu nicht reproduzierbaren Messwerten kommen. Deswegen wird der verwendete NaCl-Puffer, der Ethanol und das VE-Wasser zum einen vorher durch einen 0,2 µm-Membranfilter filtriert, zum anderen in diesem Fall zusätzlich durch einen On-line-Entgaser entgast. Es handelt sich hierbei um einen Vakuumentgaser mit einem Schlauch aus Polytetrafluorethylen (PTFE, auch Teflon® genannt), der eine hohe Gaspermeabilität aufweist.

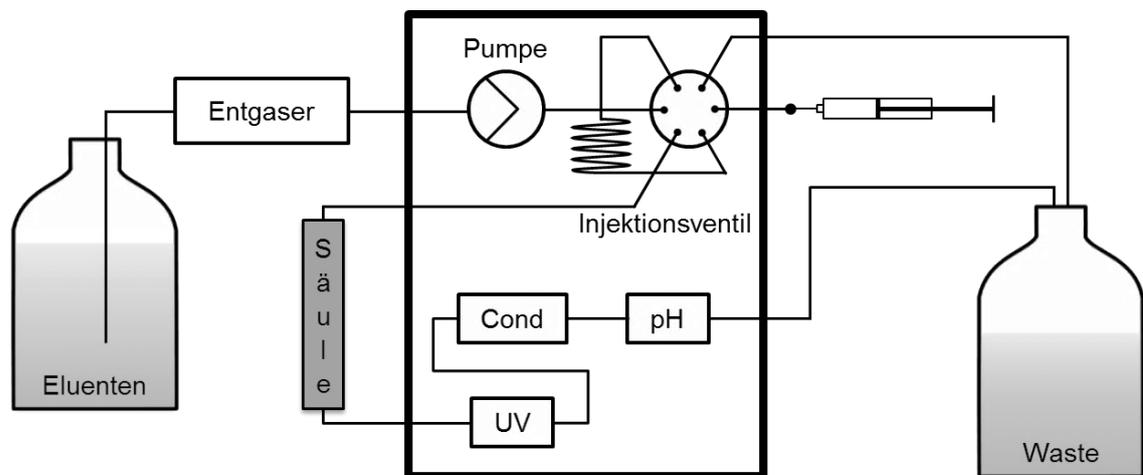


Abbildung 11: Apparativer Aufbau des verwendeten Flüssigchromatographen BioCAD® SPRINT™. Die mobile Phase befindet sich in einem Elutionsmittelvorratsgefäß. Mit Hilfe der Pumpe wird die mobile Phase durch den Entgaser zum Injektionsventil befördert. Dort erfolgt die Aufgabe der Probe auf die Säule. In der Säule werden die Substanzen getrennt. Im Anschluss erfolgt die Detektion mit Hilfe eines oder mehrerer Detektoren. Hier erfolgt die Detektion über UV, Leitfähigkeit (Cond) und pH-Wert. Die Detektoren sind mit dem Computer verbunden. Am Ende der Chromatographie landet die mobile Phase zusammen mit den Proben im Abfallgefäß (Waste). Bei der Abbildung handelt es sich um eine eigene Darstellung.

Die über die Software der Computersteuerung festlegbare Flussrate des Systems wurde durch Pumpen im Gerät konstant gehalten und kontrolliert. Bei der Pumpe handelt es sich meistens um eine Kolbenhubpumpe. Sie muss die mobile Phase mit hoher Flusskonstanz befördern und einen möglichst großen Bereich von Flussraten aufweisen. Außerdem muss sie beständig gegenüber der verwendeten mobilen Phase sein. Salzhaltige

Eluenten können, besonders bei der Lagerung der Pumpe darin, auskristallisieren und so den Kolben blockieren oder Dichtungen und Materialien zerstören. Aufgrund dessen sollte bei der Verwendung von salzhaltigen Eluenten das System regelmäßig mit z.B. VE-Wasser gespült werden und möglichst eine Hinterkolbenspülung eingesetzt werden (Gey, 2008; Cammann, 2001). Das Fließmittel wurde von einem äußeren Reservoir (Schott-Flaschen) durch Schläuche in den Entgaser, dann in die Pumpe und von dort aus in das System geleitet. Die Standards und Proben wurden manuell über eine Einzelspritze in die 2 mL-Injektionsschleife injiziert und durch das System mit der mobilen Phase auf die Säule geladen. Auch die Proben wurden vor der Injektion mit einem Einzelspritzenfilter, dessen Porengröße ebenfalls 0,2 µm betrug, filtriert.

Das Injektionssystem ist ein Rheodyneventil. Hier wird die Probe über eine Dosierspritze unter Normaldruck in das Ventil injiziert und eine Probenschleife gefüllt. Die Probenschleife kann ausgetauscht werden, so dass das injizierte Volumen variiert werden kann. In Abbildung 11 ist ein schematischer Aufbau des verwendeten Flüssigchromatographen mit dem Reservoir, den Detektoren, dem Injektionsventil, etc. dargestellt.

Das Programm zeichnete dann Temperatur, Leitfähigkeit, Druck, pH-Wert sowie das UV-Signal gegen die Zeit bzw. das Volumen auf. Die Auflösung der Moleküle hängt von der Partikelgröße, Porengröße, Flussrate, den Säulendimensionen und dem Probenvolumen ab. Die höchste Auflösung bekommt man bei niedrigen Flussraten, einer schmalen langen Säule, kleinen Partikeln und kleinen Probenvolumina. Die Daten der Läufe wurden mit dem Programm BioCAD® (näheres dazu siehe Tabelle 11) in eine Textdatei exportiert und auf einer Diskette gespeichert. Diese Datei wurde anschließend auf einem anderen Rechner in eine Tabellenkalkulation (Microsoft® Excel 2010) importiert und die Rohdaten bearbeitet.

3.4 Detektionsverfahren

Nach Verlassen der Säule werden die eluierten Moleküle mittels eines RI- oder UV-Detektors detektiert. Im Folgenden werden die Vorgänge bei der jeweiligen Detektionsmöglichkeit beschrieben.

3.4.1 Detektion mittels RI-Detektor

In ersten Vorversuchen wurde ein Brechungsindex-Detektor verwendet, da er für die flüssig-chromatographische Bestimmung von Sacchariden bei hohen Konzentrationen an Kohlenhydraten in der injizierten Probe benutzt werden kann. Dieser ist allerdings

sehr stark temperaturempfindlich sowie weniger selektiv und unempfindlicher als der später verwendete UV-Detektor (Harris, 2011). Es erwies sich als schwer realisierbar die Temperatur des RID konstant zu halten, wodurch extreme Verschiebungen der Basislinie stattfanden. Diese Verschiebung begründete sich durch die langsam ansteigende Temperatur während des Laufs. Zudem müsste der

Tabelle 4: Die festgelegten Bedingungen der SEC bei Verwendung des UV-Detektors.

Parameter	Wert
Flussrate	1 mL/min
Puffer	0,2 M Natriumchlorid
Säulenvolumen	155 mL
Säulenpackung	Sephacryl S 500 High Resolution
Probenschleifenvolumen	2 mL
Messwellenlänge	205 nm

Detektor noch mit einer Lösung von bekanntem $\frac{dn}{dc}$ -Wert kalibriert werden, um die Molekülmasse entsprechend genau ermitteln zu können. Dafür kann man häufig Werte der Literatur entnehmen. Dies war jedoch nicht möglich, da dieser Wert bei der gleichen Wellenlänge des Detektors bestimmt werden muss.

Verwendet wurde der Smartline RI-Detektor 2400 der Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, welcher für den semi-präparativen Einsatz entwickelt wurde. Das analoge Signal des RI-Detektors wurde durch einen A/D-Wandler in ein digitales Messsignal (mV) umgewandelt, so dass es von der Software aufgenommen werden konnte. Der vom RID ausgegebene Signalwert wird berechnet über die Formel:

$$\text{RI-Signal} = \left(\frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2} + a \right) \cdot K$$

Formel 3: RI-Signalwert Berechnung

Mit:

I = Intensitätswerte

a = durch die am RID verfügbare Funktion *Autozero* bestimmte Konstante

K = durch die am RID verfügbare Funktion *Calibrate* bestimmte Konstante

Die besten Messergebnisse erhält man, wenn I_1 und $I_2 \approx 0,5$, demnach $I_1 - I_2 \approx 0$ und $I_1 + I_2 \approx 1$ wären. Der Detektor nimmt die Änderung der Lichtbrechung vom reinen Eluenten zum Eluenten mit der Hyaluronsäure wahr, also die dazwischen liegende Differenz.

3.4.2 Detektion mittels UV-Detektor

Schlussendlich wurde der UV-Detektor verwendet, da bei dem RID eine sehr starke Basisliniendrift auftrat. Bei dem Detektor war die Wellenlänge variabel einstellbar. Als Lichtquelle diente eine Deuterium-Lampe, welche ein kontinuierliches Spektrum von 190 - 360 nm aufwies.

Im Programm konnte die ermittelte Wellenlänge von 205 nm eingegeben und bestätigt werden, bei der der Detektor messen sollte. Anschließend musste dieser seine Betriebstemperatur erreichen, bevor gemessen werden konnte. Bei diesem Detektionsverfahren trat kaum Basisliniendrift auf. Die Parameter, die für die Größenausschluss-Chromatographie mit dem UV-Detektor festgelegt wurden, sind oben in Tabelle 4 aufgelistet.

3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurden Gele selber hergestellt, der Puffer und die Färbelösung angesetzt sowie Proben vorbereitet. Die gesamte Vorgehensweise basiert auf einer modifizierten Methode von Cowman et al. (Lee et al., 1994; Cowman et al., 2011)

Als Standard dient bei dieser Methode DNA mit definierten Banden. Die DNA Standards „GeneRuler DNA Ladder Mix“ und „GeneRuler High Range DNA Ladder ready-to-use“ wurden von der Firma

Tabelle 5: Die bei der Agarose-Gel-Elektrophorese verwendeten DNA und HA Standards und welchen Bereich diese abdecken.

Bezeichnung des Standards	Bereich
GeneRuler DNA Ladder Mix	100-10000 bp
GeneRuler High Range DNA Ladder	10171-48502 bp
Select-HA HiLadder	~500-1500 kDa

Thermo Fisher Scientific Inc. erworben. Diese enthalten als zusätzlichen Farbmarker zu Bromphenol-Blau noch Xylen-Cyanol, welches langsamer wandert. Zusätzlich zu diesen Standards wurde bei einigen Gelen noch der „Select-HA™ HiLadder“ der Firma Hyalose L.L.C. verwendet, ein chemoenzymatisch synthetisierter Hyaluronsäure-Standard mit bekannten Molekülmassen. Weitere Informationen zu den verwendeten Standards sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Es wurde 10xTAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA) hergestellt, der dann für die Elektrophorese und die Gelherstellung 1:10 verdünnt wurde (1xTAE). Die Mengen an Essig-

säure, TRIS und EDTA, die verwendet wurden, um einen Liter 10xTAE-Puffer herzustellen, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Zum Gießen der Gele wurde ein 8er-Kamm (Taschenschablone) verwendet, um am einen Ende des Gels Taschen zum Hineinpipettieren der Proben zu erzeugen. Jeder Zinken dieses Kamms hat eine Breite von 6 mm und ist 1 mm tief, die Höhe beträgt insgesamt ebenfalls 6 mm. Der Kamm wurde jedoch immer nur vertikal ca. 3-4 mm tief in das horizontal liegende Gel eingetaucht, so dass ein Volumen von um die 20 μL in die Taschen passte. Es wurden ausschließlich 0,5 %ige Agarose-Gele hergestellt. Diese hatten eine Länge von 10 cm. Die Kammer wurde in einen Gelgießer eingespannt. Die Gele wurden so gegossen, dass sie eine Dicke von ca. 0,6 cm und eine Breite von ca. 6,5 cm aufwiesen. Dafür wurde ein Puffervolumen von 40 mL verwendet.

Tabelle 6: Mengen die an TRIS, EDTA und Essigsäure zur Herstellung von 1l des 10xTAE-Puffers notwendig sind.

Substanz	Menge
Tris-Base	48,4 g
EDTA	3,7 g
Essigsäure	11,42 ml

Zur Herstellung der Agarose-Gele für die Elektrophorese wird nur Agarose, Puffer und ein wenig VE-Wasser benötigt. Als erstes wurden 21 g Agarose eingewogen und in 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle für ca. eine Minute gelöst. Vor dem Lösen der Agarose in der Mikrowelle wurde der kleine Erlenmeyerkolben gewogen. Anschließend wurde rückgewogen, um beim Erwärmen verdampftes Wasser nachzufüllen. Die Agarose-TAE-Lösung wurde dann in die Kammer mit 8er-Kamm gegossen. Nun musste die Lösung mindestens 20 Minuten ruhen, um zum Gel zu erstarren. Anschließend wurde der Kamm entfernt, um die Proben in die entstandenen Taschen pipettieren zu können.

Die in Kapitel 3.1 erwähnten Hyaluronsäure-Lösungen wurden, ebenso wie der Fermentationsüberstand mit der produzierten HA, als Proben aufgetragen. Als Standard dienten die monodisperse HA mit definierten Banden und die beschriebenen DNA-Ladder.

Der HA-Standard wurde zum Laden genau wie die Proben vorbereitet. Zu dem 5 μL Aliquot (gelöste HA oder Standard) wurden 3 μL Ladepuffer und 10 μL destilliertes Wasser gegeben. Diese 18 μL wurden dann auf das Gel aufgetragen.

Die DNA-Ladder wurden zum Laden nach gegebener Anleitung von Thermo Fisher Scientific Inc. hergestellt oder lagen einsatzfertig vor. Zum Verfolgen der Auftrennung wurde allen Proben Bromphenol-Blau in Form des Ladepuffers beigemischt, bevor sie auf das Gel geladen wurden. Dieser Ladepuffer bestand aus 0,002 % Bromphenol-Blau

und 2 M Saccharose in 1xTAE-Puffer. Für jenen wurde eine Stammlösung von 2 M Saccharose in 1xTAE und eine Stammlösung 2 % Bromphenol-Blau, ebenfalls in

Tabelle 7: Einwaagen für die Herstellung von Ladepuffer mit Bromphenol Blau und Saccharose.

Substanz	Einwaage	Weitere Information
Bromphenol Blau	0,00197 g	2 %ige Stammlösung 2 mg in 1 ml 1xTAE-Puffer
Saccharose	6,84720 g	2 M Stammlösung 6,846 g in 10 ml 1xTAE-Puffer

1xTAE-Puffer, hergestellt. Die Einwaagen zur Herstellung dieser Lösungen sind in Tabelle 7 zu finden. Für den Ladepuffer wurden dann 10 µL der Bromphenol-Blau-Lösung und 990 µL Saccharose-Lösung zusammengeführt. Die Saccharose dient dazu, die Dichte der Probe zu erhöhen, so dass die Probe besser in der Geltasche bleibt und beim Auftragen in die Tasche sinkt. Wie erwähnt, wird als Farbmarker im Ladepuffer Bromphenol-Blau verwendet. Dies dient während des elektrophoretischen Laufs als Anhaltspunkt, wie weit die Moleküle im Gel bereits aufgetrennt sind und wann der Lauf gestoppt werden muss, damit die Moleküle nicht aus dem Gel hinaus wandern.

Die fertig gegossenen Gele wurden mit der Kammer in die Elektrophoresezelle transferiert und Puffer eingefüllt, bis das Gel einige Millimeter mit diesem bedeckt war. Anschließend wurden die Proben in die entstandenen Taschen pipettiert. Danach konnte die Elektrophorese durch Anlegen der gewählten Spannung gestartet werden. Angefangen mit einer Spannung von 40 V wurde nach 20 Minuten auf 80 V erhöht. Schließlich wurde die Elektrophorese nach ungefähr zwei Stunden beendet, wenn die Bromphenol-Blau-Lauffront kurz vor Ende des Gels angekommen war. Die Elektrophorese erfolgte ebenfalls mit dem für die Gele genutzten TAE-Puffer, bestehend aus TRIS-Base, EDTA und Essigsäure. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit 0,005 % Stains-All in 50 % Ethanol gefärbt und mit 10 % Ethanol oder destilliertem Wasser entfärbt. Beim Transferieren in die Färbeschale musste vorsichtig vorgegangen werden, um das Gel nicht zu zerstören, da Teile leicht abbrechen können.

Die Gele wurden einige Stunden in der lilafarbenen Lösung angefärbt. Dabei musste die Färbeschale kontinuierlich vor Lichteinstrahlung geschützt sein, da das Licht ansonsten die Färbelösung entfärbt hätte. Entfärbt wurde für wenige Stunden unter Lichtausschluss in 10 %igem Ethanol, einige Minuten bei Licht oder mehrere Stunden unter Lichtausschluss in destilliertem Wasser.

Anschließend wurden mit einer Dunkelhaube und mit Hilfe des Programms ArgusX1 (Biostep GmbH) die Aufnahmen der Gele angefertigt. Hier musste beim Transferieren aus der Färbeschale auf den Schiebetisch ebenfalls vorsichtig vorgegangen werden, um das Gel nicht zu zerstören. Anhand der Standards konnte dann auf die Molekülmasse der Hyaluronsäure-Proben geschlossen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte faktisch dargelegt, interpretiert und mit anderen verglichen.

4.1 SEC mit RI-Detektor

Wie erwähnt, wurden zuerst Versuche mit einem Brechungsindex-Detektor gemacht. Dabei wurde jedoch schnell festgestellt, dass mit diesem Detektor keine guten Ergebnisse erzielt werden können, wenn die Temperatur nicht konstant gehalten werden kann. Dies war allerdings im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht ausreichend möglich. In Diagramm 1 wurden drei Läufe der gleichen Konzentration verglichen. Hier wird deutlich, wie stark die Basisliniendrift war, und warum als Alternative dann der UV-Detektor gewählt wurde. Man erkennt deutlich, wann die Temperatur über den Lauf hinweg stieg oder sank. Dies liegt daran, dass bei diesem Detektor die Änderung je Grad Kelvin z.B. für reines Wasser $\sim 1 \times 10^{-4}$ RIU beträgt. Das Messen mit einem RI-Detektor müsste aber prinzipiell möglich sein, wenn man diesen oder die zu ihm führenden Schläuche sehr genau temperieren kann.

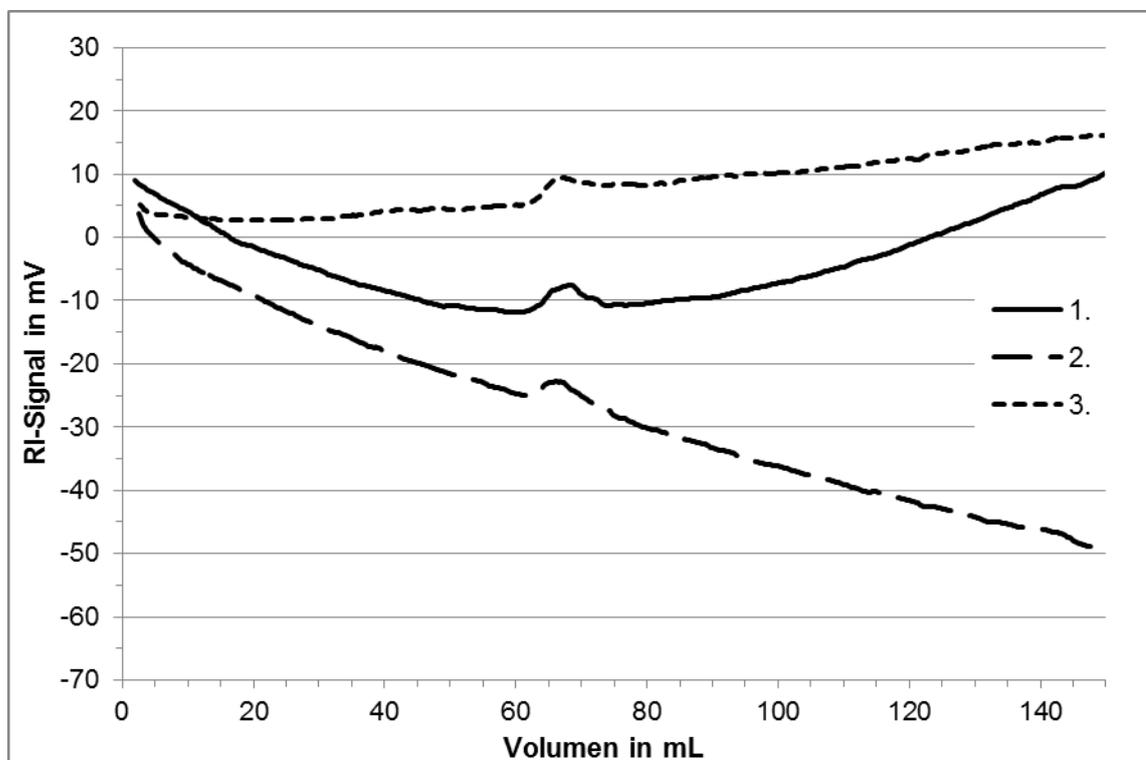


Diagramm 1: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 1 mg/mL, aufgenommen mit einem RID. Die Kurven wurden in Excel als Trendlinien mit gleitendem Durchschnitt (gleitender Mittelwert über 8 Perioden) dargestellt, um sie zu glätten.

4.2 UV-Spektren

In Diagramm 2 sind UV-Spektren eines Arbeitsmaterials zu sehen. Hier wurde die UV-Absorption von Hyaluronsäure mit den Konzentrationen von 1, 2 und 3 mg/mL mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa vermessen. Das Photometer wurde mit dem NaCl-Puffer genullt, damit nur die Absorption der HA gemessen wird. Die Konzentrationen wurden gewählt, da die späteren Proben sich auch in diesem Bereich bewegen würden. Hyaluronsäure weist eine zunehmende Absorption ab 230 nm bis 200 nm auf. Gekennzeichnet wurde jeweils 205 nm, da hier eine ausreichend starke Absorption der HA vorhanden ist. Deswegen erfolgten bei dieser Wellenlänge später die Messungen der Proben mit dem UV-Detektor. Diagramm 3 stellt zu Extinktionswerten aus den UV-Spektren von Diagramm 2 bei 207 nm eine photometrische Kalibrierfunktion dar. Aufgetragen wurde die Absorption gegen die Konzentration. Das Bestimmtheitsmaß ist mit 0,998 in Ordnung. Ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1$ würde bedeuten, dass es einen perfekten linearen Zusammenhang gibt.

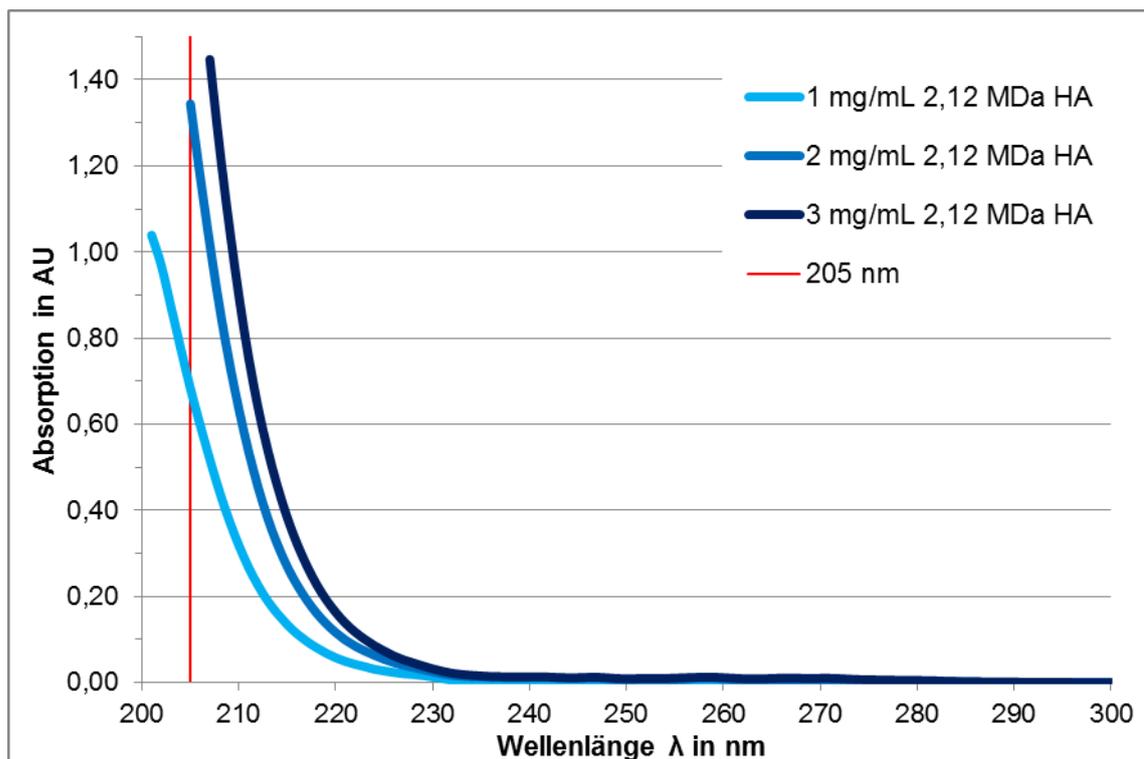


Diagramm 2: Dargestellt sind die UV-Spektren des Hyaluronsäure-Arbeitsmaterials in drei unterschiedlichen Konzentrationen von 200 – 300 nm. Aufgenommen wurden die Spektren jedoch bis 600 nm. Bei den gekennzeichneten 205 nm fand eine ausreichende Absorption statt.

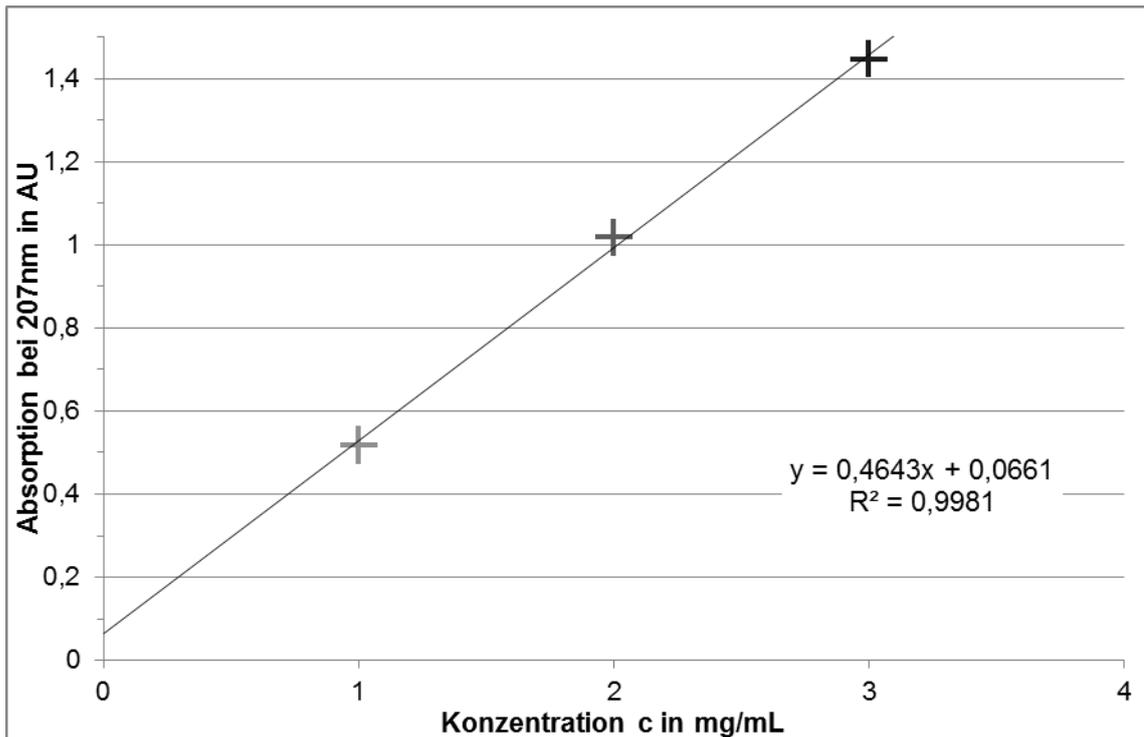


Diagramm 3: Photometrische Kalibrierfunktion der Extinktionswerte von 1, 2 und 3 mg/mL bei 207 nm. Bei 205 nm konnte das Photometer keinen Wert mehr für 3 mg/mL ausgeben, da die Extinktion bei dieser Konzentration zu hoch war.

In Diagramm 4 ist das UV-Spektrum des verdünnten Fermentationsüberstandes und vom verwendeten 0,2 M NaCl-Puffer dargestellt. Er enthält, wie erwähnt 2,5 mg/mL Hyaluronsäure, die Molekülmasse muss jedoch noch bestimmt werden. Hier erfolgte beim Fermentationsüberstand ab 235 nm bis 200 nm eine zunehmende, jedoch geringere, Absorption als bei der Hyaluronsäure. Der FÜ wurde verdünnt, da er sonst eine viel zu hohe Absorption gehabt hätte. Der NaCl-Puffer absorbiert erst ab Wellenlängen < 210 nm und stark bei unter 205 nm. Das Photometer wurde hier mit VE-Wasser genullt. Es sollte also eigentlich kein Problem bei den Messungen mit dem UV-Detektor geben. Problematisch ist jedoch, dass viele Verbindungen bei Wellenlängen um die 200 nm absorbieren. Eine Messung bei einer höheren Wellenlänge wäre wegen der dort geringeren Absorption der HA jedoch auf Kosten der Genauigkeit gegangen.

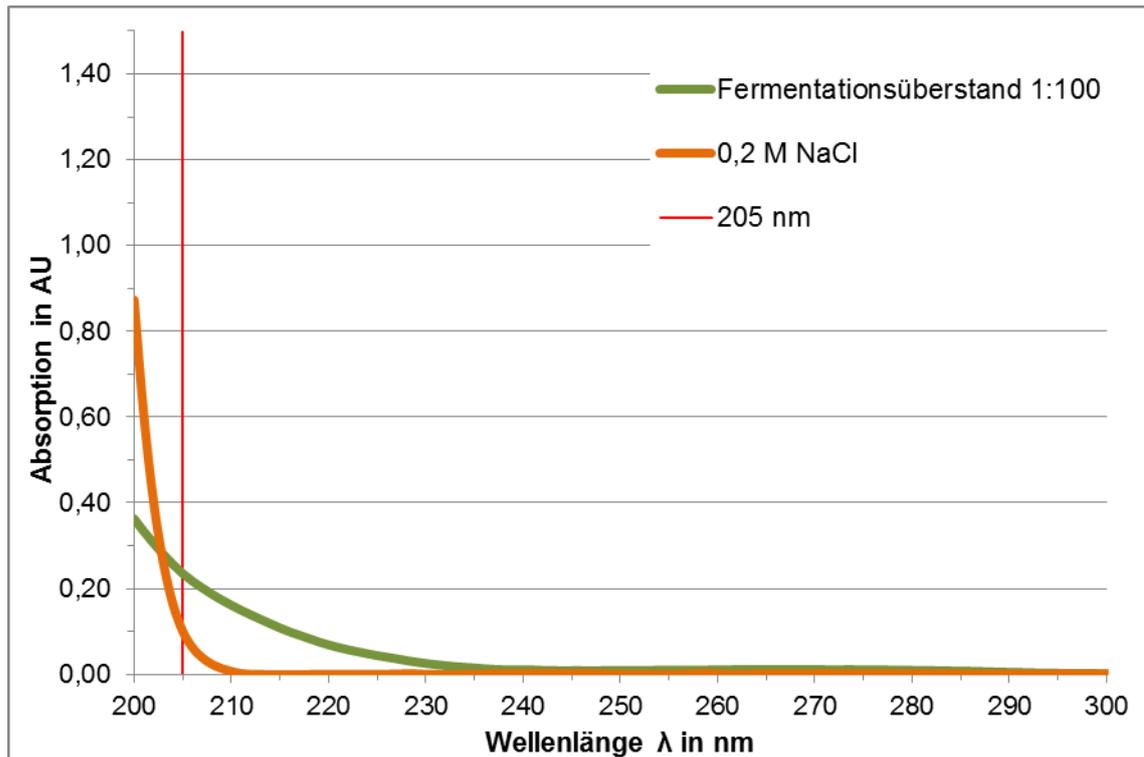


Diagramm 4: Dargestellt sind die UV-Spektren des Fermentationsüberstandes (1:100 verdünnt) und des Natriumchlorids (NaCl) von 200 – 300 nm. Aufgenommen wurden die Spektren jedoch bis 600 nm. Bei 205 nm erfolgten später die Messungen der Proben mit dem UV-Detektor, da diese sich für die Hyaluronsäure als geeignet herausstellte.

4.3 SEC mit UV-Detektion

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Größenausschluss-Chromatographie mit UV-Detektion zu den Hyaluronsäuren mit 0,35, 1,2, 1,67 und 2,12 MDa beschrieben.

Es wurden jeweils Konzentrationen von 1 mg/mL, 2 mg/mL und 3 mg/mL oder nur 3 mg/mL der entsprechenden Hyaluronsäure eingesetzt. Das Lösen von Hyaluronsäure mit einer Konzentration von 3 mg/mL war bei allen Molekülmassen sehr schwierig. Außerdem wiesen diese Proben eine sehr hohe Viskosität auf, weshalb das Injizieren mit der Spritze durch die kleinen Poren des Filters teilweise sehr viel Druck benötigte.

Alle nachfolgend in den Kapitel 4.3.1 bis 4.3.4 sowie die in Anhang B dargestellten Chromatogramme wurden mit Excel geglättet. Und zwar wurde eine Trendlinie mit gleitendem Durchschnitt erstellt (gleitender Mittelwert über 100 Perioden). Es wurden jeweils die Peakhöhen an der höchsten Stelle (Peakspitze) und die Retentionszeiten bestimmt. Aus der Höhe der Peaks kann auf die Hyaluronsäure-Konzentration in der Probe geschlossen werden. Über die in Kapitel 2.5.2 erwähnte Formel 2 zum Lambert-Beer'schen-Gesetz kann dann die Konzentration einer unbekannt Probe berechnet werden. Die Retentionszeiten und Peakhöhen wurden mit Hilfe des Programms Bio-

CAD® (siehe Tabelle 12 in Anhang B) ermittelt. Alle Peaks beginnen in etwa bei 50 mL.

Auf die Säule wurden jeweils 2 ml Hyaluronsäure-NaCl-Lösung aufgetragen. In den Diagrammen ist auf der Abszisse das eluierte Volumen aufgetragen. Da die Flussrate immer 1 mL/min betrug, entsprechen die Volumenwerte den Retentionszeiten (in min).

4.3.1 HA mit 2,12 MDa

Es wurden Chromatogramme für Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei drei Konzentrationen (1, 2 und 3 mg/mL; jeweils drei Einzelläufe) aufgenommen. Wie aus den Diagrammen 5 bis 7 ersichtlich ergab sich für die Konzentration von 1 mg/mL im Mittel eine Absorption von um die 0,11 AU, für die Konzentration von 2 mg/mL von um die 0,16 AU und für eine Konzentration von 3 mg/mL von um die 0,19 AU. Die einzelnen Daten können Tabelle 12 im Anhang B entnommen werden. Die unterschiedlichen Konzentrationen werden gut detektiert.

Bei der geringsten Konzentration (1 mg/mL) erstreckt sich der Peak in Diagramm 5 von 50 mL bis 105 mL und hat durchschnittlich eine Fläche von 2,42 AU · min. Bei 2 mg/mL, dargestellt in Diagramm 6, eluieren die ersten Moleküle ebenfalls bei 50 mL, die letzten und kleinsten bei etwa 115 mL. Die Peakfläche beträgt durchschnittlich 4,79 AU · min. Hier sind die Peaks nahezu identisch. Bei 3 mg/mL eluieren die ersten und größten Hyaluronsäure-Moleküle ebenfalls bei 50 mL und die Probe ist erst nach weiteren 80 mL durchgelaufen (siehe Diagramm 7). Mit durchschnittlichen 7,07 AU · min haben diese Peaks natürlich die größte Fläche.

Die immer wieder kehrenden Hügel im Abstieg der Absorption in Diagramm 7 sind wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass hier Hyaluronsäure-Moleküle mit einer bestimmten Molekülmasse in einer etwas höheren Konzentration vorhanden sind als von denjenigen mit einer darunter oder darüber liegenden Molekülmasse. Dieses Phänomen ist vermutlich durch die Fermentation begründet. Alternativ könnte es auch zur Degradation der HA bei der recht hohen Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min gekommen sein. Dieser Abbau (Kettenbrüche) könnte eventuell auch schon beim Lösen der Proben oder beim Filtrieren stattgefunden haben (Milas et al., 2001). Zur näheren Aufklärung dieser Beobachtung könnte die Verwendung eines anderen Detektors eventuell zur Abhilfe beitragen. In Frage käme beispielsweise ein Lichtstreuendetektor, da dieser absolute Molekülmassen misst.

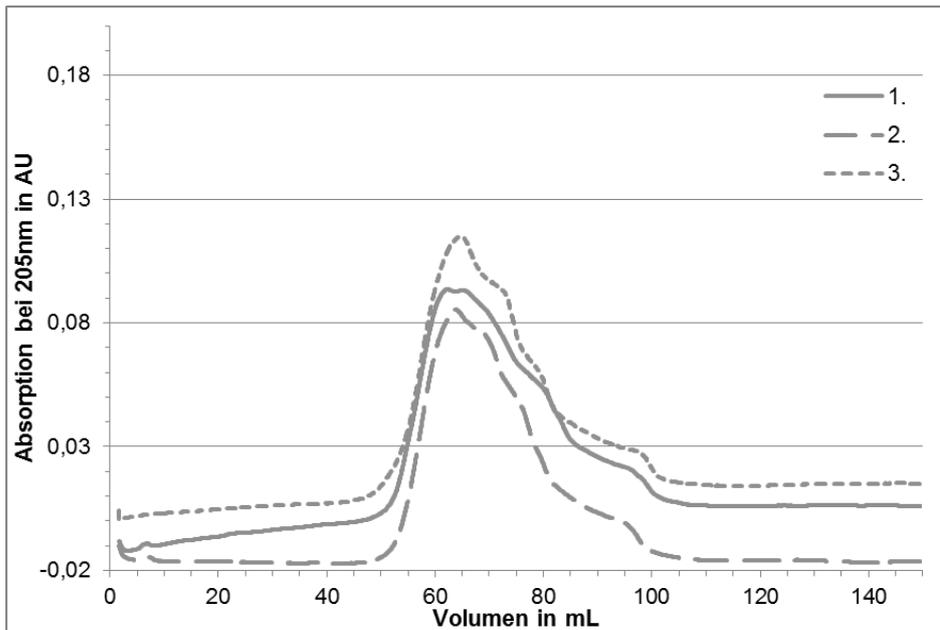


Diagramm 5: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 1 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

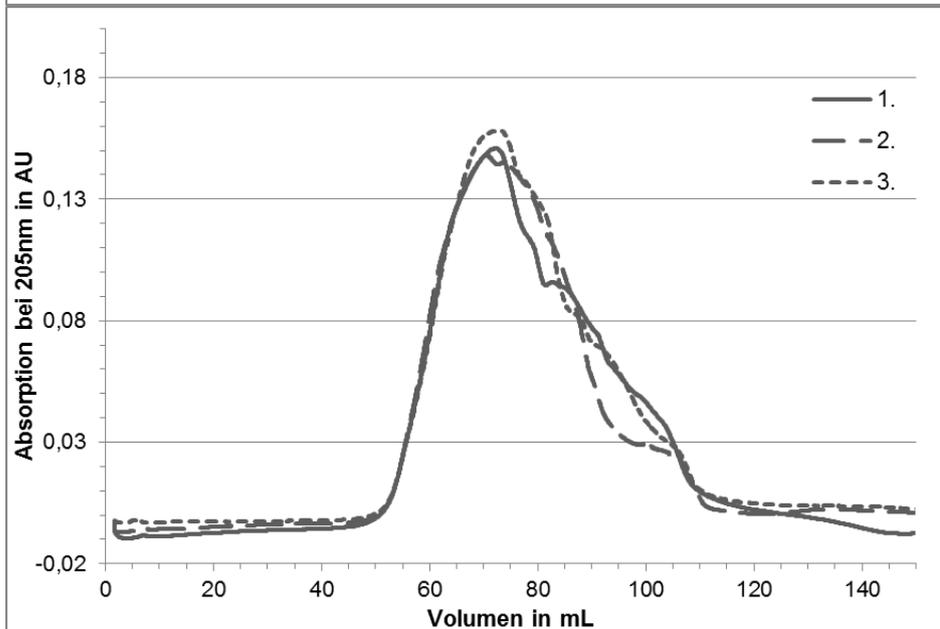


Diagramm 6: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 2 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

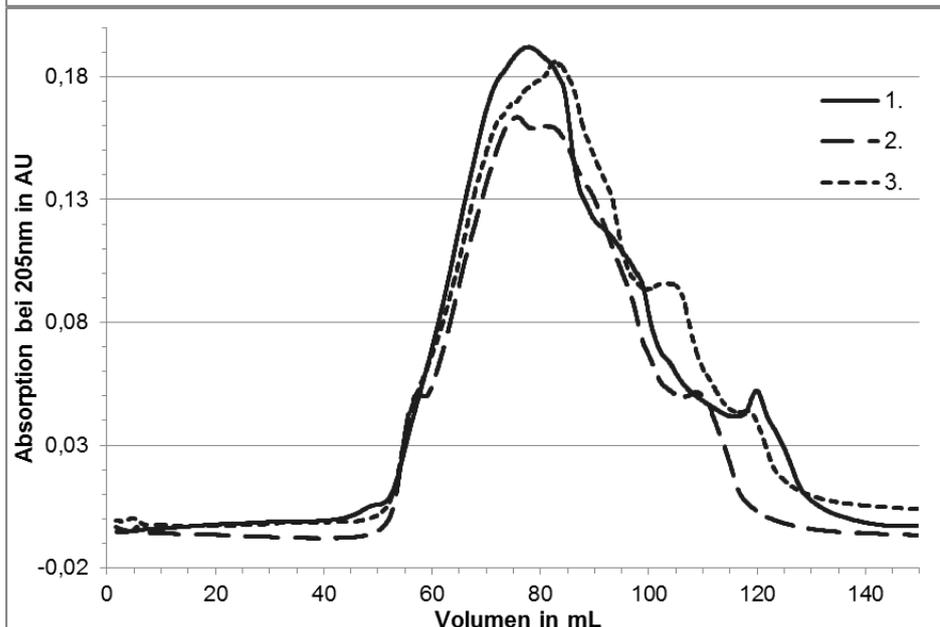


Diagramm 7: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

4.3.2 HA mit 1,2 MDa

Es wurden Chromatogramme für Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei drei Konzentrationen (1, 2 und 3 mg/mL; jeweils drei Einzelläufe) aufgenommen. Auch hier wurden die unterschiedlichen Konzentrationen gut detektiert. Die Höhe des Peaks bei einer Konzentration von 1 mg/mL (siehe Diagramm 8) lag durchschnittlich bei 0,11 AU, bei einer Konzentration von 2 mg/mL (siehe Diagramm 9) bei 0,15 AU und bei einer Konzentration von 3 mg/mL bei 0,18 AU (siehe Diagramm 10).

Die Retentionszeit an der Peakspitze betrug bei 1 mg/mL HA durchschnittlich 65,51 min (siehe Diagramm 8). Bei einer Konzentration von 2 mg/mL Hyaluronsäure, dargestellt in Diagramm 9, lag die Retentionszeit bei 70,69 min und bei 3 mg/mL bei 78,15 min (Diagramm 10). Ermittelt wurden die einzelnen Werte mit Hilfe des Programms BioCAD®. Bei dem ersten Lauf mit 1 mg/mL HA (Diagramm 8) ist eine leichte Basisliniendrift zu erkennen. Diese könnte dadurch entstanden sein, dass der UV-Detektor noch nicht richtig aufgewärmt war und erst im weiteren Verlauf seine Betriebstemperatur annahm. Ansonsten trat dieses Phänomen bei diesem Detektor nicht wieder auf.

Die Fläche steigt von 2,36 AU·min bei 1 mg/mL auf 4,57 AU·min bei 2 mg/mL HA bis auf 6,91 AU·min bei einer Konzentration von 3 mg/mL an. Teilweise gibt es eine starke Abweichung von der Basislinie wie bei Lauf 1 in Diagramm 8. In Diagramm 10 ist der Verlauf aller Peaks nahezu identisch.

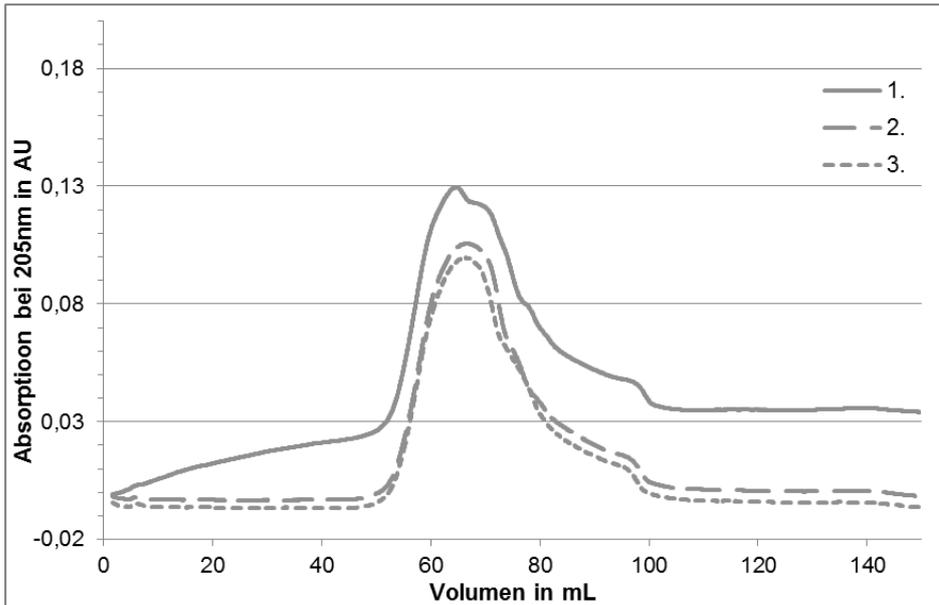


Diagramm 8: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 1 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

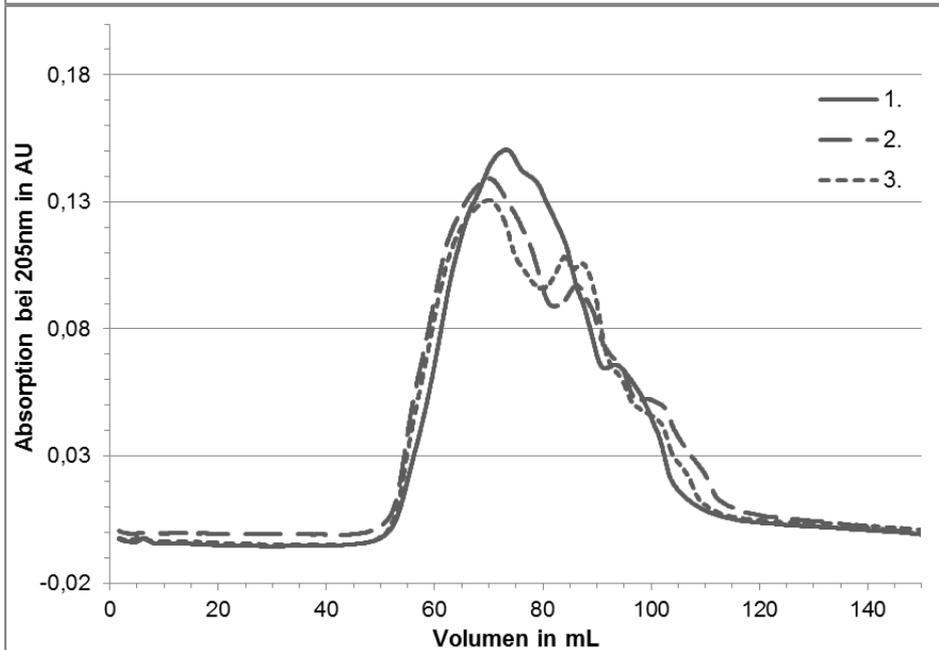


Diagramm 9: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 2 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

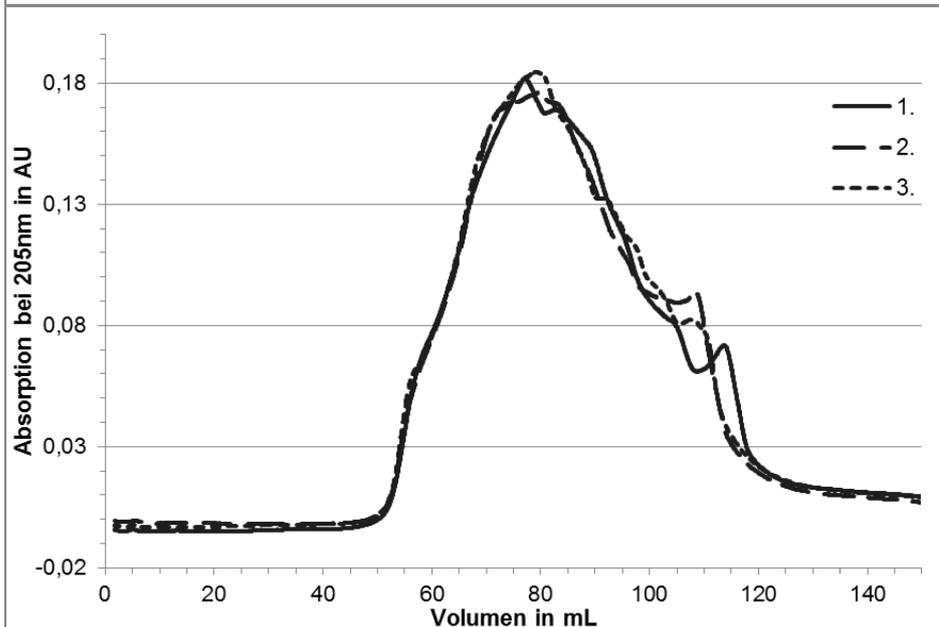


Diagramm 10: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

4.3.3 HA mit 1,67 MDa

Die Hyaluronsäure-Probe mit der Molekülmasse von 1,67 MDa wurde nur in einer Konzentration von 3 mg/mL in das System injiziert. Hier betrug die Höhe der Peaks durchschnittlich 0,19 AU (siehe Diagramm 11), was sich mit der Höhe der anderen Molekülmassen bei derselben Konzentration gut deckt. Die Durchschnitts-Fläche der Peaks liegt bei 7,59 AU·min und ist damit etwas größer als bei den anderen Molekülmassen. Die Retentionszeit betrug durchschnittlich 76,1 min.

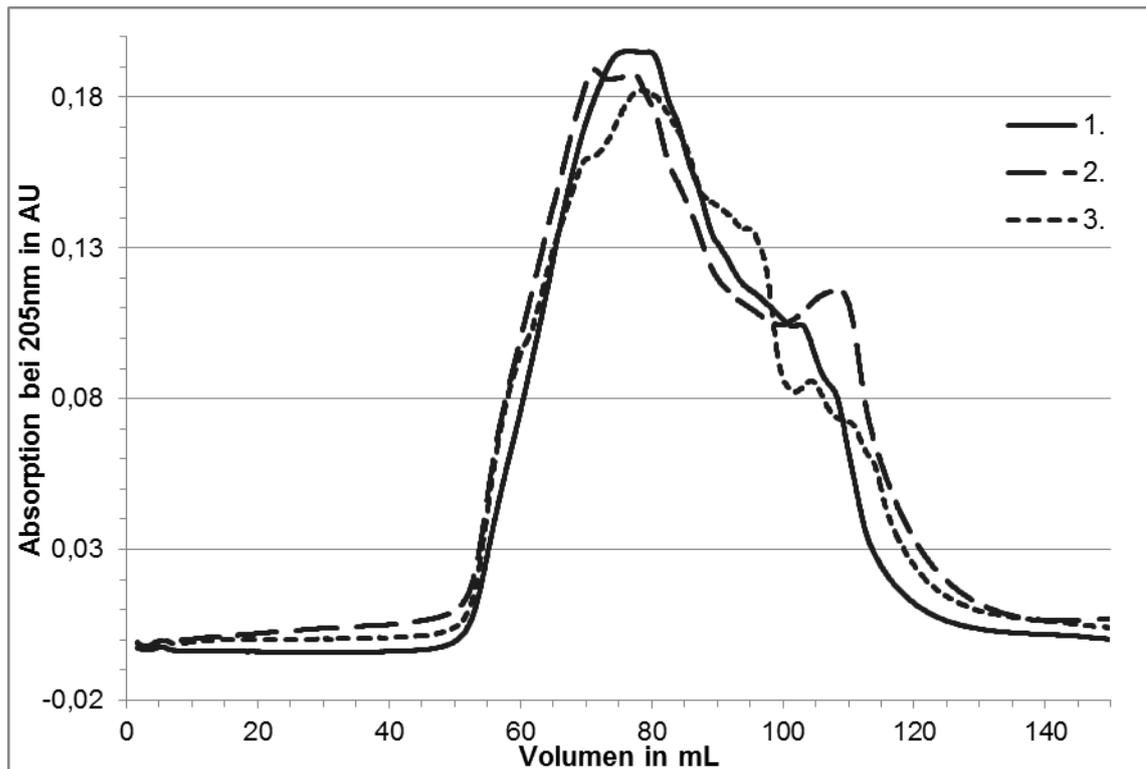


Diagramm 11: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

4.3.4 HA mit 0,35 MDa

Bei den Kurvenverläufen der drei Läufe (siehe Diagramm 12) sind hier kaum Abweichungen feststellbar. Bei den anderen Molekülmassen gab es wesentlich mehr Abweichungen. Das durchschnittliche Elutionsvolumen V_E der Proben betrug 85,61 mL. Die durchschnittliche Peakhöhe und Fläche fielen mit 0,21 AU und 8,84 AU·min im Vergleich zu den vorherigen Läufen bei derselben Konzentration etwas größer aus.

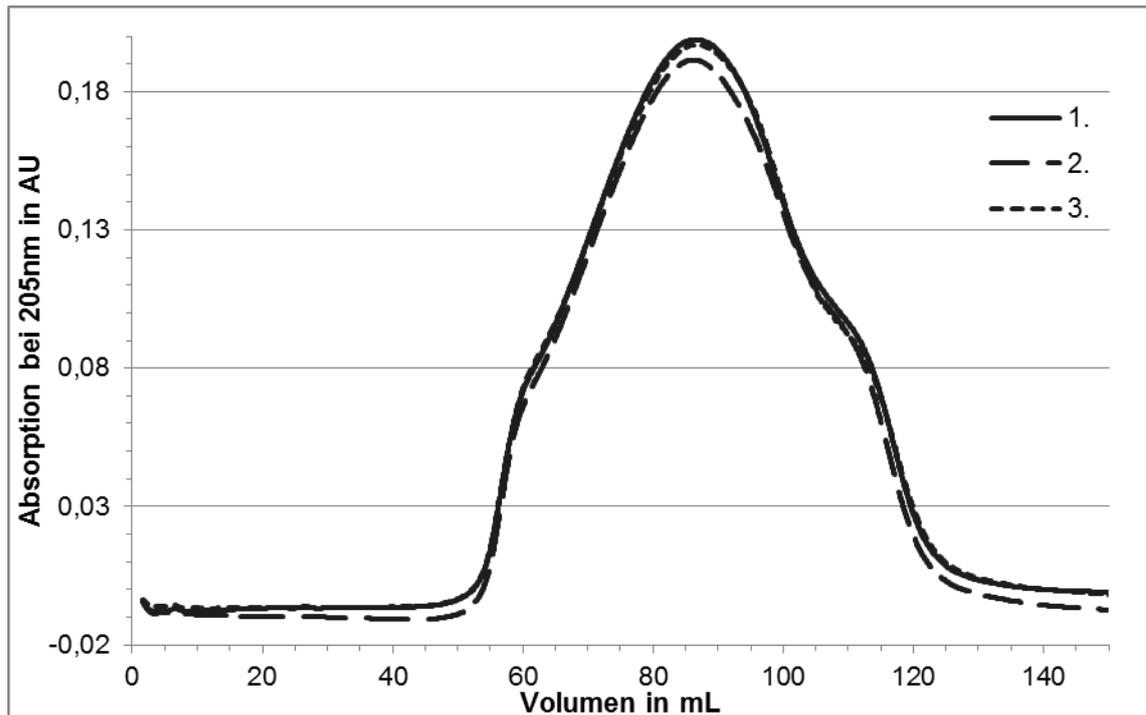


Diagramm 12: Vergleich der drei Läufe von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL, jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min.

4.3.5 Vergleich der Retentionszeiten unterschiedlicher Molekülmassen

Nachfolgend werden die Chromatogramme der Hyaluronsäure-Proben mit unterschiedlicher Molekülmasse, aber gleicher Konzentration, miteinander verglichen. Dies ist zwingend notwendig, um festzustellen, ob Proben signifikant voneinander getrennt werden können. Nur dann ist es möglich, mit diesem zusammengestellten System aus Säule, Detektor etc. die Molekülmasse einer unbekannt Probe zu bestimmen.

Wie aus der Darstellung in Diagramm 13 ersichtlich, ist zwar ein Unterschied im Elutionsvolumen (entsprechend der Retentionszeit in min) der Hyaluronsäuren mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa und 0,35 MDa zu erkennen. Der Unterschied beträgt jedoch nur 7,63 min. Noch geringer wird dieser Unterschied, wenn man Chromatogramme von 1,2 MDa und 1,67 MDa vergleicht, wie dies in Diagramm 14 zu erkennen ist. Er beträgt hier nur noch 0,67 min. Hier wurde bei 1,2 MDa zum besseren Vergleich der zweite Lauf gewählt, da beim ersten eine Basisliniendrift stattfand.

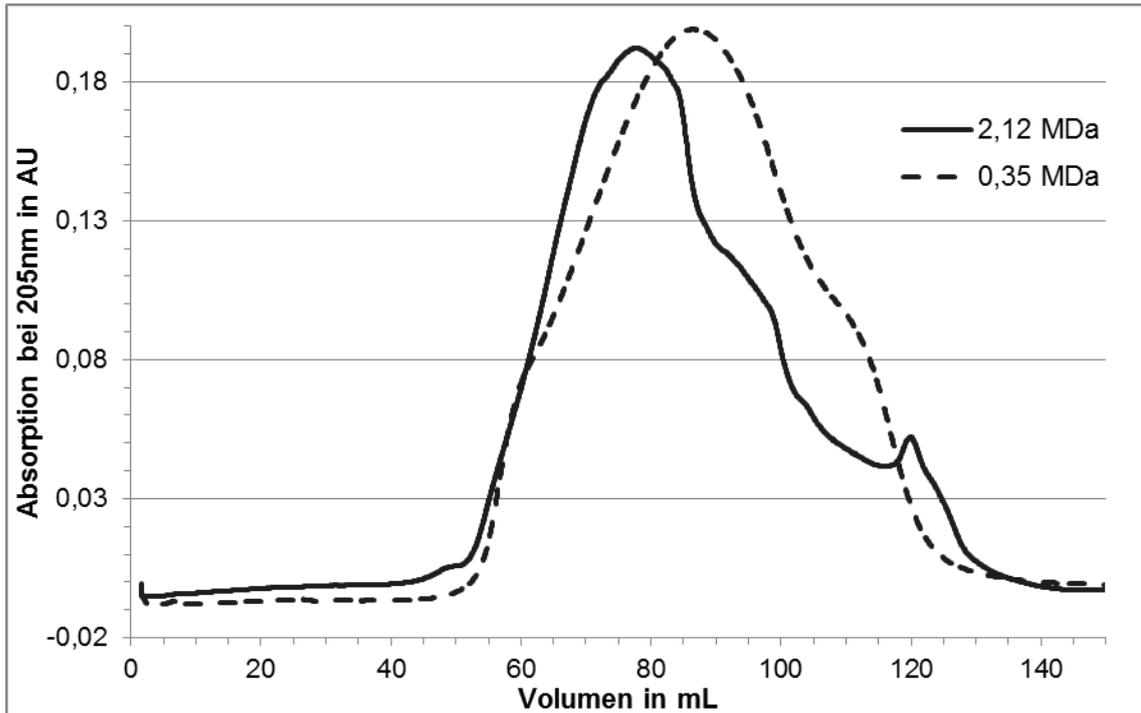


Diagramm 13: Vergleich der Chromatogramme des ersten Laufes von HA mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1 mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.

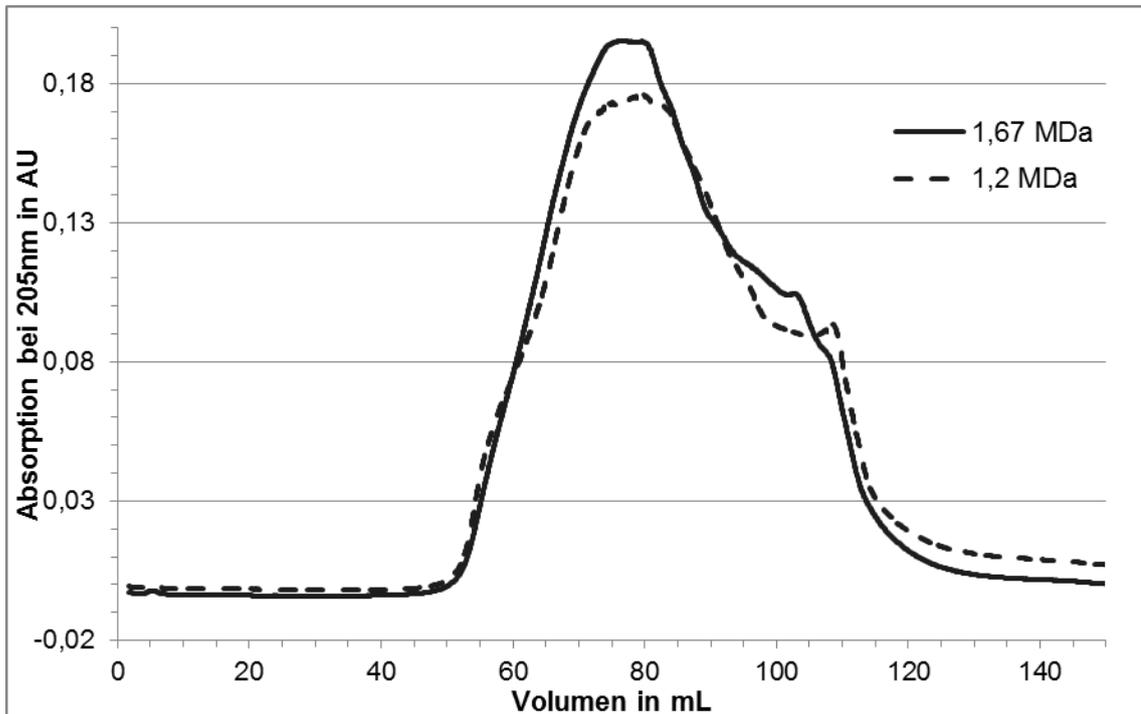


Diagramm 14: Vergleich der Chromatogramme von dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa mit dem zweiten Lauf der HA mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1 mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.

Zwar kann man hochmolekulare Hyaluronsäure von niedermolekularer mit der Säule voneinander unterscheiden, jedoch können die hochmolekularen Hyaluronsäure-Proben nicht voneinander getrennt werden. Dies bestätigt der Vergleich zwischen 2,12 MDa

HA mit 1,2 MDa bzw. 1,67 MDa (siehe Diagramm 23 und Diagramm 24 in Anhang B), denn die Verläufe und Retentionszeiten der unterschiedlichen Molekülmassen sind nahezu identisch. Bei dem Vergleich zwischen 0,35 MDa HA mit 1,2 MDa bzw. 1,67 MDa (siehe Diagramm 25 und Diagramm 26 in Anhang B) zeigt sich, dass es hier ebenfalls nur geringe Unterschiede in der Retentionszeit gibt. Außerdem wird die unzureichende Trennung bestätigt, wenn man die Retentionszeiten gegen die Molekülmassen aufträgt, wie dies in Diagramm 15 für sämtliche Läufe mit 3 mg/mL gemacht wurde. Aufgrund der Molekülmasse wäre eine Elutionsreihenfolge von 0,35 – 1,2 – 1,67 – 2,12 zu erwarten gewesen, d.h. die Werte für 2,12 MDa müssten beispielsweise in dem Diagramm weiter unten, d.h. in Richtung kürzerer Retentionszeiten, als die von 1,2 MDa und 1,67 MDa liegen. Im Vergleich der höheren Molekülmassen (1,2, 1,67 und 2,12 MDa) eluierte jedoch eine Probe mit 2,12 MDa sogar vor den kleineren Molekülmassen. Entsprechendes gilt außerdem für die zwei Retentionszeiten von 1,67 MDa ebenfalls falsch, Die Retentionszeit müsste hier geringer als die von 1,2 MDa sein. Dies war jedoch nur für einen aus drei Läufen der Fall.

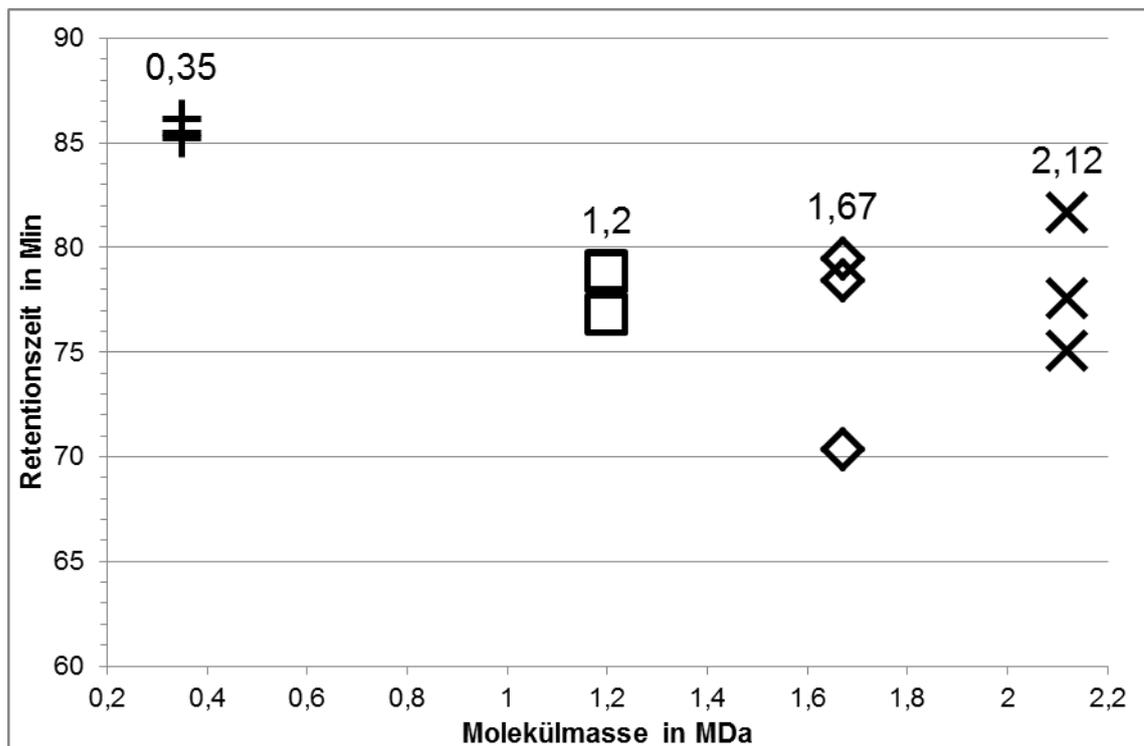


Diagramm 15: Vergleich der Retentionszeiten an der Peakspitze der verschiedenen Molekülmassen bei einer Konzentration von 3 mg/mL.

Eventuell ist die fehlende Unterscheidbarkeit in den Retentionszeiten bei höheren Molekulargewichten auf die in Kapitel 2.4 beschriebenen SC- oder HDC- Effekte zurückzuführen. Diese Effekte treten insbesondere dann auf, wenn hochmolekulare Polymere bei hohen Flussraten separiert werden. Dies wäre dann der Grund, warum die Auftren-

nung der hochmolekularen HA-Proben nicht erfolgen konnte. Es zeigte sich jedoch, dass auch bei geringeren Flussraten von z.B. 0,5 mL/min keine bessere Auftrennung zu erreichen war. Eine andere Erklärung wäre, dass es hier bei den hohen Konzentrationen von HA-Proben mit hoher Viskosität durch „viscous fingering/streaming“ zu einer signifikanten Bandenverbreiterung gekommen ist (Striegel et al., 2009).

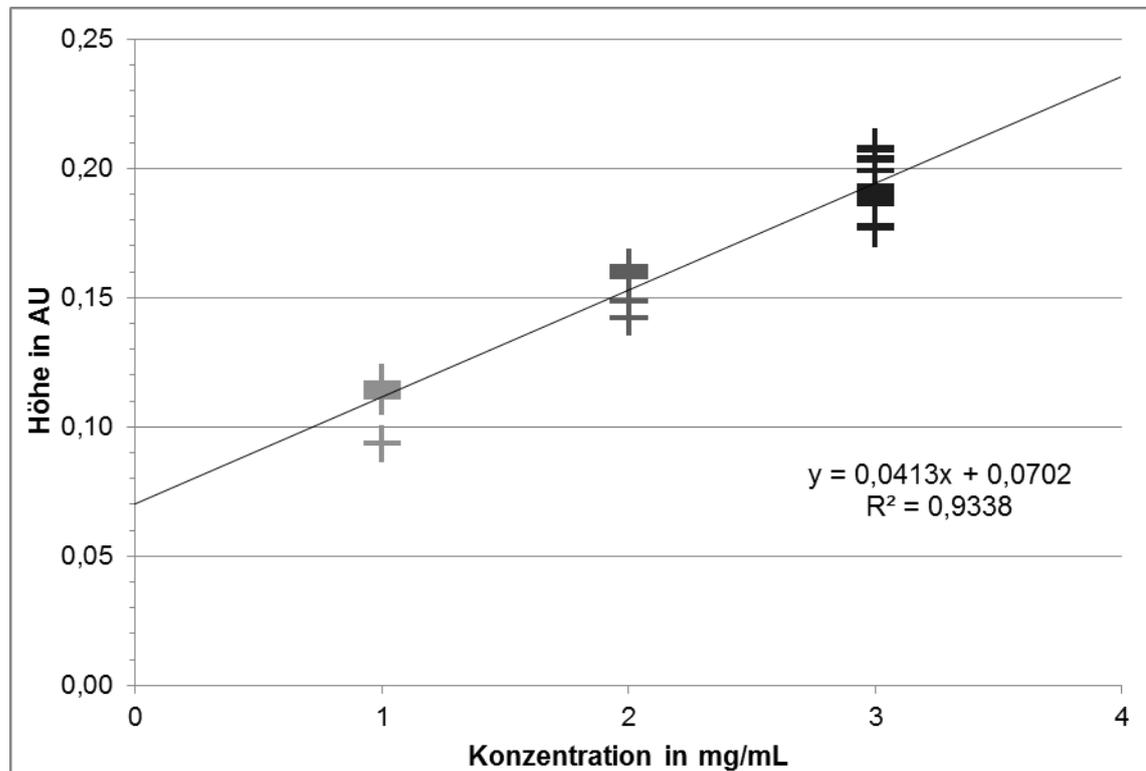


Diagramm 16: Vergleich der Peakhöhen von allen bei 1 mL/min getätigten Messungen der verschiedenen Hyaluronsäure-Proben.

Wenn man die HA-Konzentration gegen die Peakhöhe bei UV-Detektion aufträgt (siehe Diagramm 16), zeigt sich, dass hier eine lineare Beziehung herstellbar ist, auch wenn anhand des Bestimmtheitsmaßes von 0,9338 ersichtlich ist, dass diese keineswegs perfekt ist.

Der UV-Detektor eignet sich durchaus, um die Konzentration einer unbekanntes Hyaluronsäure-Probe zumindest annähernd zu bestimmen, beispielsweise die Konzentration von Hyaluronsäure, die in einem Fermentationsprozess gewonnen wurde.

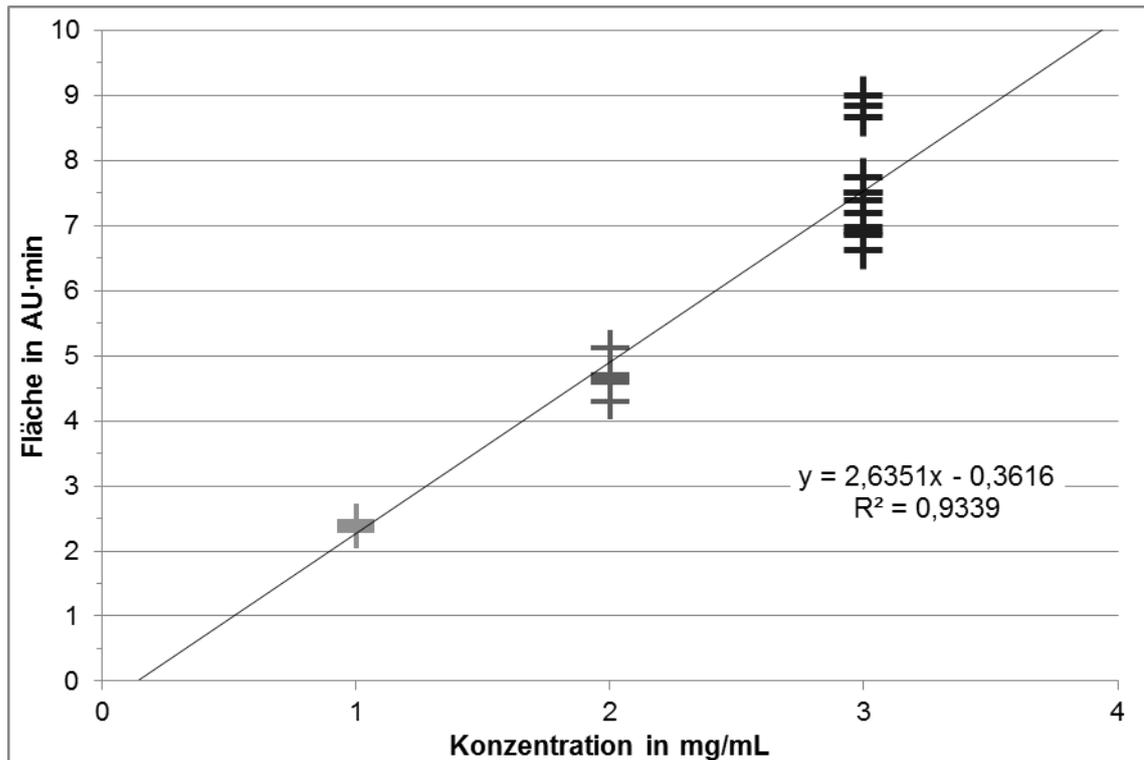


Diagramm 17: Werte aller errechneten Flächen der Läufe von den verschiedenen Hyaluronsäure-Proben aufgetragen gegen die verwendeten Konzentrationen.

Ähnliches lässt sich auch feststellen, wenn man die Peakflächen gegen die HA-Konzentration aufträgt (siehe Diagramm 17). Allerdings nimmt die Streuung der Werte mit zunehmender Konzentration zu, und bei einer Konzentration von 3 mg/mL weichen die Flächen relativ weit voneinander ab. Dies gilt insbesondere für die niedermolekularen Hyaluronsäuren, d.h. für die Werte der Hyaluronsäure mit 0,35 MDa. Hier weichen die Peakflächen stark nach oben ab (siehe auch die Werte in Tabelle 12 in Anhang B). Das Bestimmtheitsmaß ist mit 0,9339 ebenfalls nicht ideal und spiegelt diese Abweichung wieder.

4.3.6 Flussratenvergleich

Je schneller die mobile Phase durch das System gepumpt wird, desto schneller erhält man auch das Chromatogramm der Substanz. Dies dauerte in diesem Fall unter den gewählten Bedingungen und bei 1 mL/min ca. 200 min. Halbiert man die Flussrate auf 0,5 mL/min verlängert sich die Zeitdauer auf das Doppelte. Bei einem Lauf mit einer Flussrate von 0,5 mL/min benötigt man mit allen Vor- und Nachbereitungen, wie z.B. dem Equilibrieren und Spülen, mehr als einen Arbeitstag. Jedoch war die Auflösung der Probe umso besser, je geringer die Flussrate gewählt wurde, wie in Diagramm 18 deutlich zu erkennen ist. Eventuell könnte also bei einer noch geringeren Flussrate von z.B. 0,2 mL/min eine bessere Auftrennung von Hyaluronsäuren mit ähnlich hohen Mole-

külmassen erreicht werden. Dadurch könnten möglicherweise auftretende Effekte, wie die hydrodynamische (HDC) und Slalom-Chromatographie (SC), verhindert werden.

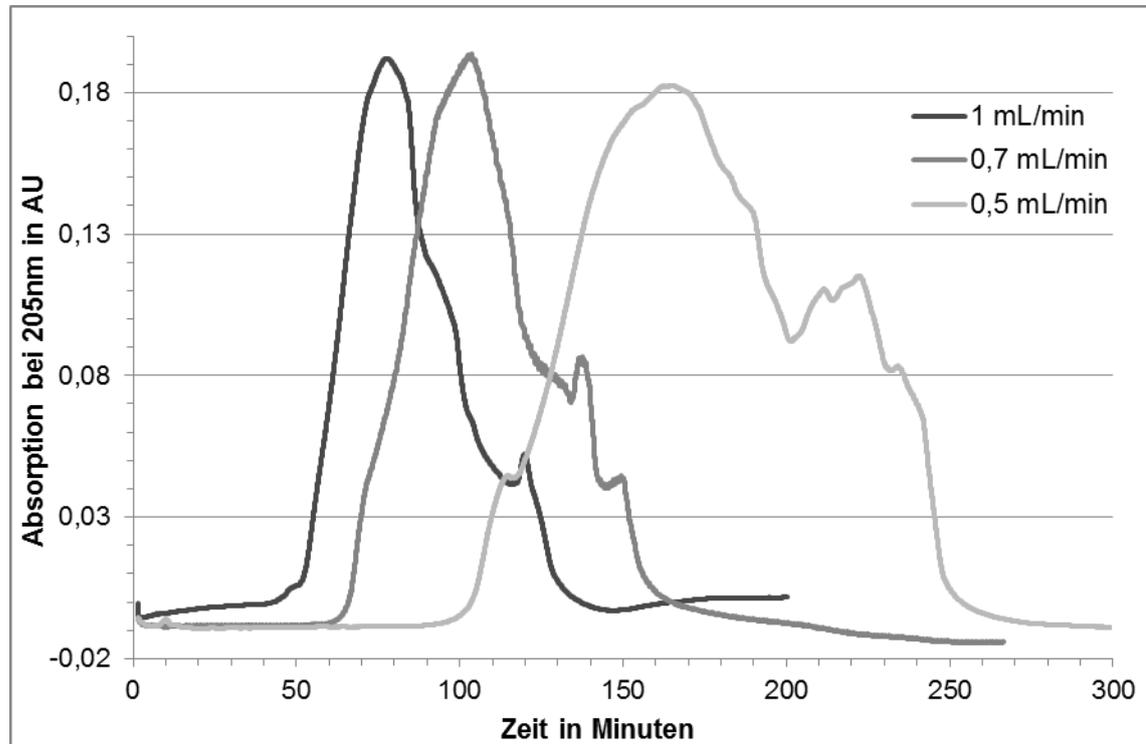


Diagramm 18: Vergleich der Retentionszeit bei unterschiedlichen Flussraten und Auflösung des Chromatogramms. Hier wurden immer 2 mL der 2,12 MDa Hyaluronsäure bei einer Konzentration von 3 mg/mL aufgetragen und nur die Flussrate verändert.

4.3.7 Fermentationsüberstand

Nachfolgend sind die Chromatogramme des Fermentationsüberstandes dargestellt. In Diagramm 19 ist bei einem Elutionsvolumen von ca. 55 bis 95 mL kleiner Peak zu sehen, mit einer Spitze bei ca. 70 mL. Darauf folgt ein großer Peak von ca. 100 bis 190 mL. Vergrößert man den Bereich von 0 bis 100 mL, wie in Diagramm 20 dargestellt, erkennt man von ca. 35 bis 45 mL einen weiteren Peak, der sehr klein ist. Aus Kenntnis der vorherigen Chromatogramme, bei denen ausschließlich HA aufgetragen wurde, handelt es sich bei dem Peak mit der Spitze bei 70 mL um die produzierte HA. Festgestellt wurde dies ebenfalls bei einem hier nicht beschriebenen Versuch, bei dem die Fraktionen im Anschluss an die Trennung aufgefangen wurden und auf das Agarose-Gel aufgetragen wurden. Dabei war bei der Fraktion in der HA vermutet wurde der typische Verlauf zu erkennen. Ob diese HA-Fraktion eventuell noch mit etwas anderem vermischt ist, kann jedoch nicht beurteilt werden, da Stains-All diese nicht anfärbt. Bei dem großen Peak könnte es sich z.B. um Pepton, SDS oder einen anderen Bestandteil des Fermentationsüberstandes handeln (siehe Tabelle 9 im Anhang B). Man könnte die

Hyaluronsäure jedoch nahezu von allen anderen Bestandteilen des Fermentationsüberstandes abtrennen, wenn man den HA-Peak in einer Fraktion auffangen würde.

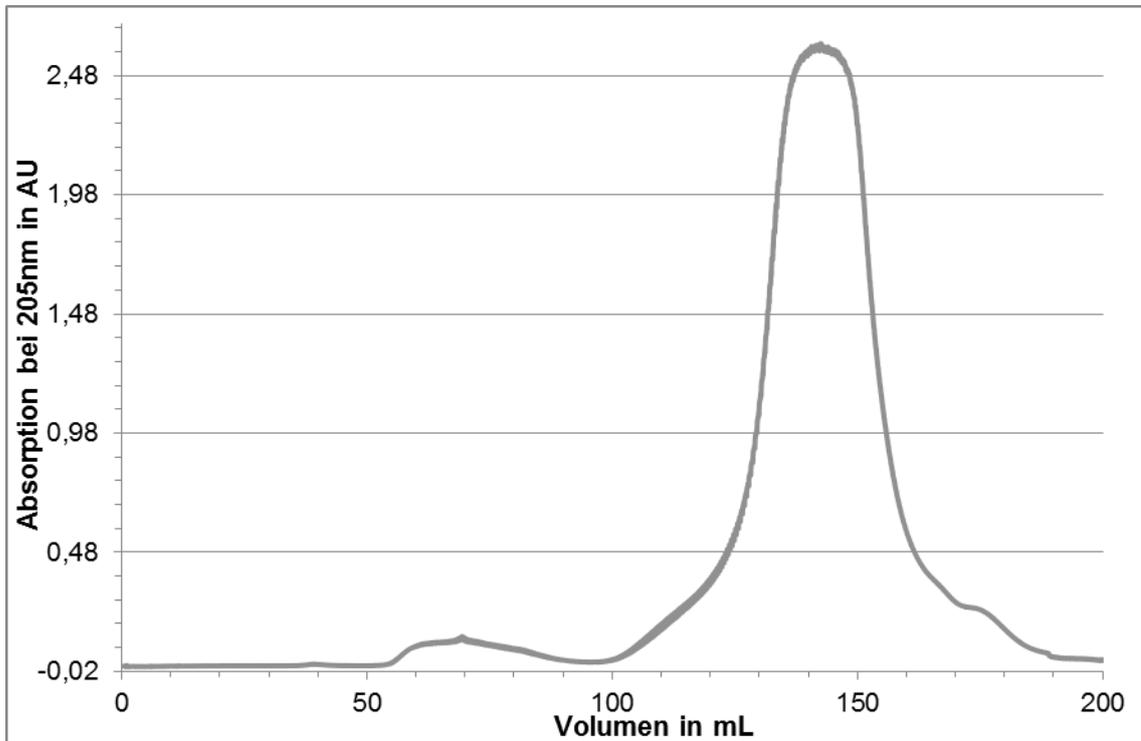


Diagramm 19: Chromatogramm des Fermentationsüberstandes aus der Fermentation mit *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*. Aufgetragen wurden wie bei den HA-Proben 2 mL. Die Flussrate betrug dabei 0,5 mL/min.

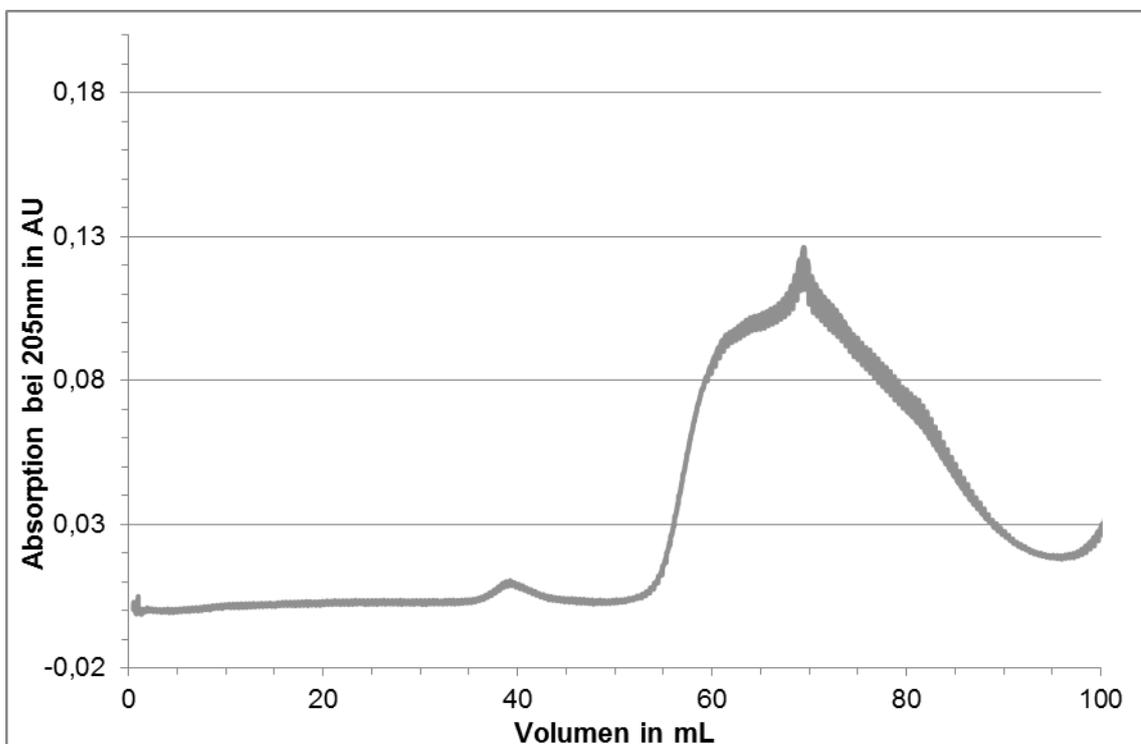


Diagramm 20: Ausschnitt aus Diagramm 19 für das Elutionsvolumen bis 100 Milliliter. Ergebnis der Auftragung des Fermentationsüberstandes bei einer Flussrate von 0,5 mL/min.

In einem weiteren Experiment, zu sehen in Diagramm 21, wurde dem Fermentationsüberstand Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa in einer Konzentration von 3 mg/mL hinzugefügt und diese Lösung anschließend aufgetragen. Die Endkonzentration von HA in der Probe betrug ca. 5,5 mg/mL. Der kleine Peak zwischen 35 und 45 mL ist nicht mehr vorhanden und der Hyaluronsäure-Peak beginnt etwa 5 mL früher. Das würde bedeuten, dass höhermolekulare Hyaluronsäure hinzugefügt wurde, die früher als der Rest eluiert. Der große Peak, der auf einen unbekanntem Medienbestandteil zurückgeht, ist, bedingt durch die Verdünnung, wesentlich verkleinert.

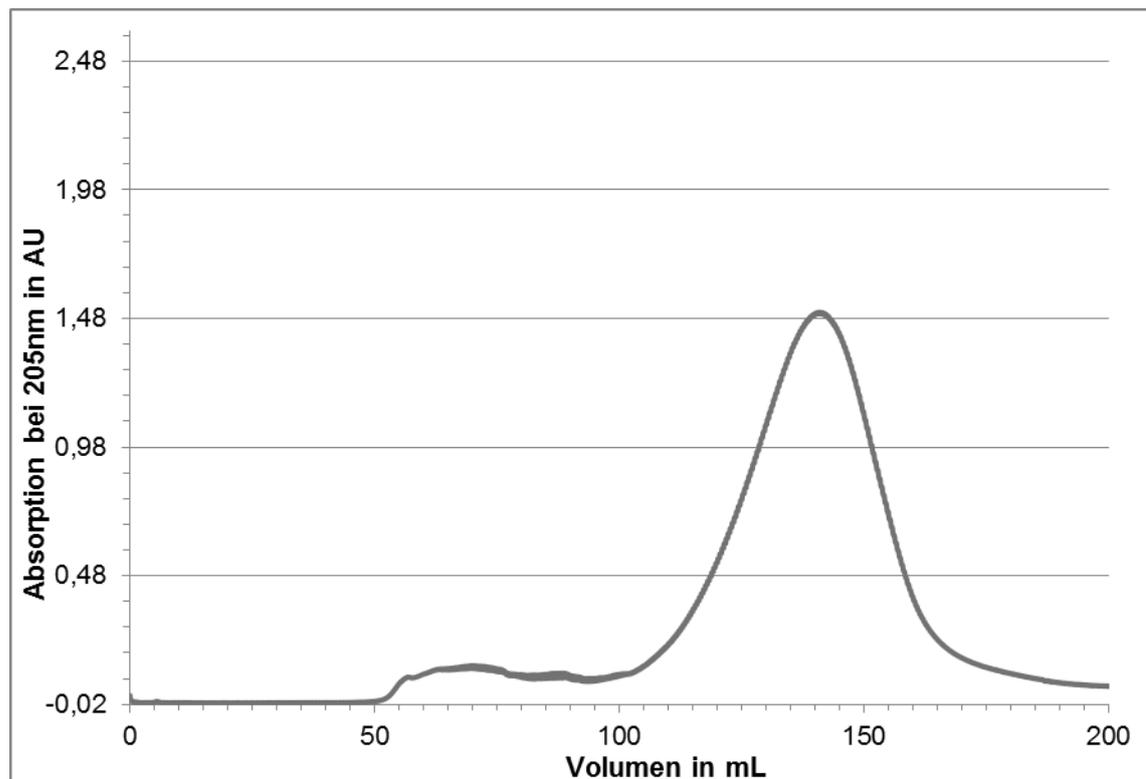


Diagramm 21: Chromatogramm der 1:1-Mischung aus Fermentationsüberstand mit einer HA-Konzentration von ca. 2,5 mg/mL und 2,12 MDa Hyaluronsäure mit einer Konzentration von 3 mg/mL. Die Flussrate betrug dabei 1 mL/min.

Von Diagramm 21 wurde ebenfalls ein Ausschnitt vergrößert, um den ersten Peak besser beurteilen zu können (siehe Diagramm 22). Hier ist zu erkennen, dass der Peak, wie bei allen anderen Proben, bei ca. 50 mL beginnt. Deutlich wird hier auch, dass es keine Basislinientrennung der beiden Peaks mehr gibt, wie sie bei dem Fermentationsüberstand ohne HA-Zusatz (Diagramm 19) nahezu vorhanden war. Die Höhe dieses Peaks von 0,1 AU sowie die Peakfläche mit 2,38 AU·min entsprechen nach den obigen Ergebnissen durchschnittlich einer HA-Konzentration von etwa 1 mg/mL. Die Retentionszeit hingegen kommt der von 2 mg/mL HA am nächsten. Der Peak hat sich insgesamt verbreitert jedoch hat sich die Höhe nicht gesteigert, was bei der oben genannten angenommenen Konzentration eigentlich vermutet wurde.

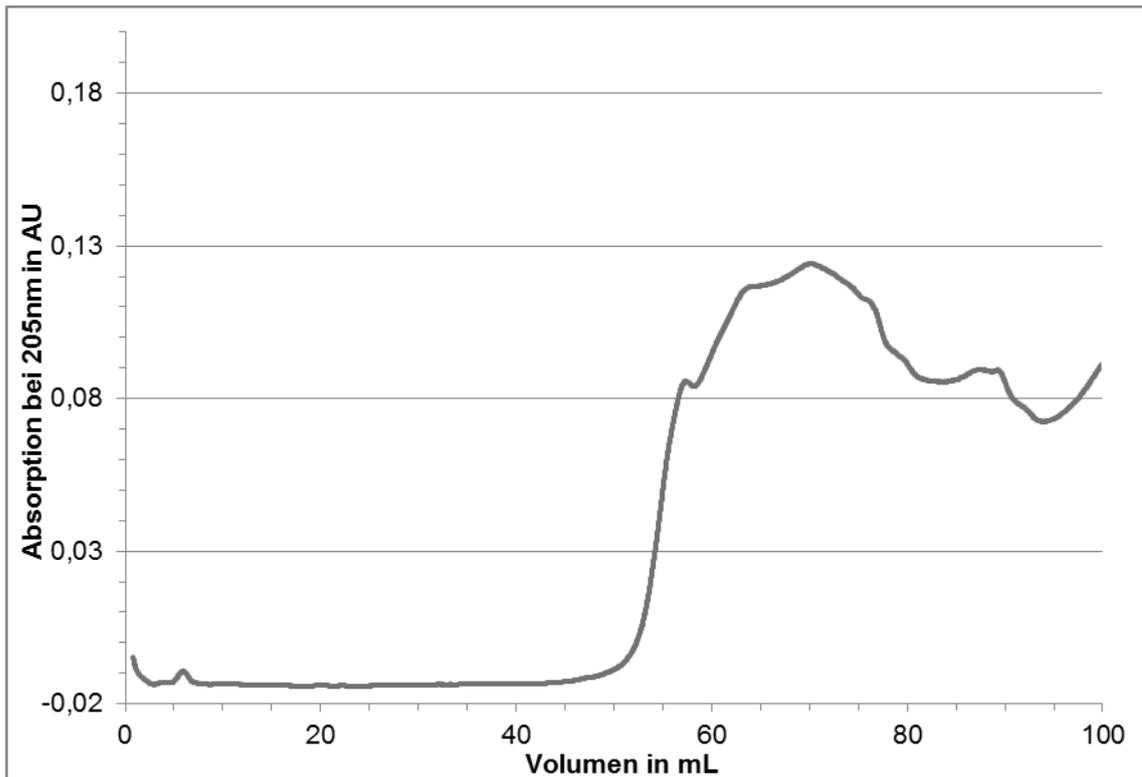


Diagramm 22: Ausschnitt aus Diagramm 21 für das Elutionsvolumen bis 100 Milliliter. Der Fermentationsüberstand mit einer HA-Konzentration von ca. 2,5 mg/mL wurde 1:1 mit Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa und einer Konzentration von 3mg/mL gemischt und aufgetragen. Die Flussrate betrug dabei 1 mL/min.

4.3.8 Mögliche Alternativen und Erweiterungen der Methode

Die SEC ist eine Relativmethode, welche eine Kalibrierung mit Standards benötigt. Das Fehlen von Hyaluronsäure-Standards stellt hier ein großes Problem dar. Mittlerweile sind zwar die früheren Limitierungen bei Säulenmaterialien für große Ausschlussvolumina ausgemerzt. Jedoch gibt es immer noch Schwierigkeiten, diese auch zu kalibrieren.

Es gibt existieren verschiedene Möglichkeiten, eine SEC-Säule zu kalibrieren. Darunter befinden sich die universelle Kalibrierung sowie eine lineare und exponentielle Hamielec-Kalibrierung, bei der die Kalibrierung mit polydispersen Standards erfolgen kann (Striegel et al., 2009). Eine weitere Methode zur Kalibrierung der SEC bestünde darin, zusätzlich die Viskosität jeder Probe zu messen. Dadurch wäre dann theoretisch durch Messen der intrinsischen Viskosität über die Beziehung $\log([\eta]M) = f(V_E)$ eine universelle Kalibrierung möglich (Lechner et al., 2010). Des Weiteren könnte eine universelle Kalibrierung über die Viskosität mit der Mark-Houwink-Gleichung ($[\eta] = K \cdot M^a$) auch für polydisperse Proben erfolgen. Bei der Viskositätsmessung sind allerdings die Messbedingungen sehr wichtig. Alle Proben müssen in der gleichen Phase gelöst sein und bei gleicher konstanter Temperatur vermessen werden. Benötigt wird

nicht unbedingt ein On-line-Viskositätsdetektor. Möglich ist die Messung der intrinsischen Viskosität laut Jagadeeswara Reddy et al. 2013 und Armstrong et al. 1995 auch mit einem Ubbelohde-Viskosimeter. Hierfür ist z.B. ein Wasserbad erforderlich. Allerdings ist dies fragwürdig, da solche Kapillarviskosimeter eigentlich nur für newtonsche Flüssigkeiten geeignet sind und nicht für Flüssigkeiten mit nicht-newtonschem Verhalten, wie dies bei Hyaluronsäure der Fall ist. Gegebenenfalls müssten die Messungen durch Berechnungen korrigiert werden oder in dem Bereich stattfinden, in dem die HA sich wie eine newtonsche Flüssigkeit verhält (Wohlrab et al., 2004; Kogan et al., 2007; Mendichi et al., 1998). Jedoch scheiden all diese Möglichkeiten aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von Standards für das verwendete Säulenmaterial aus. Das Material hat nach oben hin einen Ausschluss von 20 MDa und in dieser Größenordnung gibt es keine verfügbaren Standard-Substanzen für eine wässrige SEC. Dies macht es fast unmöglich selbst mit breiten Standards zu kalibrieren. Des Weiteren gibt es, selbst wenn eine Kalibrierung erfolgen könnte, häufig Schwierigkeiten, hochmolekulare Hyaluronsäure zu analysieren (Armstrong et al., 1995; Balke et al., 1969; Mendichi et al., 2002).

Eine vorgeschaltete SEC ist unerlässlich, da eine Auftrennung nach Gewicht und Größe der Proben notwendig ist. Aufgrund der bislang nicht lösbaren Probleme mit der Kalibrierung scheint es jedoch notwendig zu sein, einen weiteren Detektor in Kombination mit der UV-Detektion einzusetzen. Hier würde sich eine absolute Detektionsmethode wie die Lichtstreuung (LS) eignen. Über die Verwendung eines Lichtstreu-Detektors könnte man sich eine Kalibrierung ersparen, weshalb die Kombination von SEC-UV-LS eine sehr gute Alternative zu sein scheint. Auch weil der LS-Detektor, ebenso wie der Viskositätsdetektor, große Molekülmassen bevorzugt, jedoch kleine im Rauschen verschwinden lässt. Beim RI- und UV-Detektor ist das Messsignal direkt proportional zur Konzentration der Probe, dies bedeutet, dass alle Molekülmassen mit gleicher Auflösung detektiert werden. (Lechner et al., 2010). Allerdings benötigt man zur Bestimmung von Molekülmassen mit einem LS-Detektor den $\frac{dn}{dc}$ -Wert. Häufig wird deshalb bei der SEC auch von der Dreifachdetektion mittels LS, Viskosität und RI gesprochen, wenn Polysaccharide auf ihre Molekülmasse analysiert werden sollen. Der RID liefert den notwendigen $\frac{dn}{dc}$ -Wert und über die Viskosität können dann auch die Strukturen und hydrodynamische Radien bestimmt werden (Heinzmann et al., 2007; Kogan et al., 2007).

Da bei der UV-Detektion das Problem besteht, dass nahe bei 200 nm viele Verbindungen und, wie in Diagramm 4 zu erkennen ist, eben auch die NaCl-Lösung absorbiert,

sollte der Einsatz dieses Detektionsverfahrens überdacht werden. Die mobile Phase sollte eigentlich eine viel niedrigere Absorption als die Probe haben, weshalb der Einsatz des RI-Detektors, eine gute Temperierung vorausgesetzt, besser wäre. Der Wechsel der mobilen Phase wäre an dieser Stelle nicht zweckmäßig, da hierdurch wegen der polyanionischen Eigenschaft der HA ionische Wechselwirkungen mit der stationären Phase unterdrückt werden.

Mit der Wahl einer anderen bzw. weiteren Detektion ist es jedoch in diesem Fall wahrscheinlich nicht getan. Es hat sich im Laufe der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche gezeigt, dass mit dem verwendeten Säulenmaterial Sephacryl S-500 HR in Kombination mit der Säule keine Trennung der Proben mit hohen Molekülmassen voneinander möglich war. Die verwendete Kronlab-Säule ist von den Dimensionen her eher für die präparative Chromatographie geeignet. Sie kann also z.B. zur Aufreinigung des Fermentationsüberstandes verwendet werden, ist jedoch zum analytischen Auftrennen von HA mit unterschiedlichen Molekülmassen wenig geeignet. Joeng et al., 2014 haben das Säulenmaterial jedoch beispielsweise zur präparativen Fraktionierung von Hyaluronsäure verwendet. Das Säulenmaterial könnte daher grundsätzlich für eine analytische Trennung geeignet sein. Zum Auftrennen für analytische Zwecke wäre jedoch eine kürzere und schmalere Säule von ca. 0,7-1 cm Durchmesser besser geeignet. Dann könnte es eventuell auch mit dem Sephacryl-Material zu einer besseren Trennung kommen. Die Änderung der Säulendimensionen würde zusätzlich die Laufzeit verkürzen.

Eventuell könnte die schlechte Trennung auch daran liegen, dass die Säule nicht kompakt und homogen gepackt war, und z.B. Kanäle entstanden sind. Ein weiterer Faktor könnte sein, dass die Säulenpackung möglicherweise durch teilweise zu hohe Drücke, während der Injektion der Probe, Schaden genommen und dadurch seine Kompaktheit und Homogenität verloren hat. Dies würde allerdings bedeuten, dass eine andere Säulenpackung benötigt würde, da mit dieser Methode fermentierte HA mit noch höheren Molekülmassen von bis zu 10 MDa aufzutrennen und die Dispersität und Molekülmasse zu bestimmen wären. Diese HA-Proben würden auch höhere Viskositäten aufweisen und durch ihr dadurch bedingtes verringertes Fließverhalten noch höhere Drücke im System verursachen. Die alternative Säulenpackung sollte dann auch etwas druckstabiler und eventuell schon in eine geeignete analytische Säule vorgepackt sein.

Tabelle 8: Verschiedene kommerziell erhältliche alternative Säulenmaterialien im Vergleich zum verwendeten Säulenmaterial Sephacryl S-500 HR. Diese Materialien wurden von anderen Autoren als zur Molekülmassenbestimmung von Hyaluronsäure geeignet beschrieben. Quellen sind [1] (Mendichi et al., 2002), [2] (Joeng et al., 2014), [3] (Armstrong et al., 1995), [4] (Hokputsa et al., 2003), [5] (Showa Denko K.K., 2015), [6] (TOSOH Bioscience, 2015), [7] (Agilent Technologies, 2014), [8] (Waters, 2015) und [9] (GE Healthcare, 2007).

Säulen(-material)	Ausschluss (kDa)	Partikelgröße (µm)	Porengröße (µm)	Länge	∅	Material	Quelle
GE-Healthcare Sephacryl S-500 HR	40- 20.000	25-75	-	-	-	Allyl Dextran und N,N'-Methylene Bisacrylamide	[2], [9]
Shodex OH-pak SB-806 HQ	20.000	13	Max. 1,5	300	8	Polyhydroxy- methacrylate	[1], [2], [3], [5]
Shodex OH-pak SB-805 HQ	4.000	13	0,7	300	8		[1], [5]
Tosoh Bioscience TSKgel G 6000PW	8.000	17	> 0,1	300		Polymethacrylate	[1], [4], [6]
Tosoh Bioscience TSKgel G 5000PW	1.000	17	0,1	300			
Agilent Technologies PL aquagel-OH 60	200- 10.000	15	-	300	7,5	Makroporöse Copolymer Beads	[1], [7]
Waters Ultrahydrogel 2000	500- 10.000	12	0,2	300	7,8	Sphärisches Polymer	[1], [8]

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass Hyaluronsäure sehr kettensteif ist und deshalb zur Trennung Säulenmaterialien mit sehr großen Poren (> 0,4) und großen Partikeln (20 µm) benötigt werden (Wohlrab et al., 2004; Mendichi et al., 2002). Die Retention einer Probe hängt nämlich von der Partikelgröße und teilweise von der Porengröße ab. Bei sehr hohen Molekülmassen, gerade wenn die Größe der Moleküle die der Poren erreicht, vermindert sich die Auflösung und die Peaks verbreitern sich, wodurch bei jedem Elutionsvolumen eine Inhomogenität der Molekülmasse entsteht. Bisher kommerziell erhältliche Säulenmaterialien für die wässrige SEC sind nicht für den Einsatz zur Trennung hochmolekularer Hyaluronsäure optimiert (Mendichi et al., 2002). In Tabelle 8 sind neben dem hier verwendeten Säulenmaterial (Sephacryl S-500 HR) kommerziell erhältliche Säulen(-materialien) aufgelistet, die andere Autoren zur Bestimmung der Molekülmasse von Hyaluronsäure verwendet haben. Es handelt sich in allen Fällen um Materialien die für die wässrige SEC geeignet sind. Diese könnten also potentiell an Stelle von Sephacryl S-500 HR verwendet werden. Es wurden meistens zwei Säulen hintereinander geschaltet, die beide ein unterschiedliches Ausschlussvolu-

men besaßen. Bei Mendichi et al. 2002 wurden vier verschiedene Säulen-Kombinationen getestet. Selbst bei der größten Partikelgröße konnte jedoch keine gute Trennung der ultra-hochmolekularen HA erreicht werden. Alle anderen in der Literatur beschriebenen Materialien besitzen eine geringere Partikelgröße als Sephacryl S-500 HR, dafür sind meistens vom Hersteller auch Porengrößen angegeben. Die Porengröße ist bei der Wahl eines Säulenmaterials für die SEC ein wichtiges Entscheidungsmerkmal. Mit den beiden Tosoh-Säulen in Kombination könnte man beispielweise keine sehr hochmolekulare HA von über 8 MDa auftrennen, da diese vom Material aufgrund von dessen geringer Porengröße ausgeschlossen würden.

4.4 AGE

Es wurden Agarose-Gele zur Trennung von Hyaluronsäure-Proben angefertigt. In diesem Abschnitt sind zwei der aufgenommenen Agarose-Gele (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) dargestellt. Dabei handelt es sich um 0,5%ige Agarose-Gele. Diese Konzentration ist zur Auftrennung für die Anzahl Basenpaare der DNA-Ladder geeignet, und sollte daher auch für die Molekülmassen der HA einsetzbar sein. Es wurden dieselben Proben aufgetragen, die auch bei der SEC Anwendung fanden. Die Agarose-Gel-Elektrophorese diente neben der SEC dazu, über ein Verfahren zur Analyse der HA-Proben zu verfügen. Diese Methode konnte jedoch wegen mangelnder Standardsubstanzen keine genauen Ergebnisse zu den Molekülmassen der HA-Proben liefern.

Mit dem Gel in Abbildung 12, bei dem verschiedene Konzentrationen (1, 2 und 3 mg/mL) einer HA mit 2,12 MDa und der Fermentationsüberstand aufgetrennt wurden, konnte schnell festgestellt werden, welche Molekülmasse der Fermentationsüberstand (FÜ) ungefähr aufweist. Vergleicht man die größte Verteilung des FÜ in Abbildung 12 mit den Banden des als HA-Standard eingesetzten Select-HA-HiLadders, liegt diese ca. bei 1,5 MDa, da die oberste Bande laut Herstellerangabe diese Molekülmasse aufweist. Aus diesem Gel lässt sich anhand der mitgelaufenen DNA-Standards auch entnehmen, welche DNA-Bande in etwa der Molekülmasse von 0,5 MDa und 1,5 MDa entspricht, so dass bei weiteren Gelen auf die teuren und schlecht verfügbaren HA-Standards verzichtet wurde, obwohl die DNA-Standards nur bedingt geeignet sind. Das mittlere Molekulargewicht von einem DNA-Basenpaar (1 bp) entspricht ungefähr 650 Da. Demnach müsste ein DNA-Standard, welcher einen Bereich bis zu 10.000 bp abdeckt, zur Molekülmassenbestimmung der HA geeignet sein, da hiermit Molekülmassen bis zu 6,5 MDa abgedeckt sein müssten. Wie Abbildung 12 zeigt, stimmte diese einfache Kor-

relation in diesem Fall nicht. Hier liegt die 10.000 bp-Bande, die danach 6,5 MDa entsprechen sollte, eher in Höhe der 1,5 MDa-Bande des HA-Standards. Brauchbar sind von dem GeneRuler-DNA-Ladder-Mix nur die Banden von 1500-10.000 bp, alle anderen liegen außerhalb des polydispersen Bereichs der HA-Proben. Dieser Effekt begründet sich wohl darin, dass DNA negativer geladen ist als die Hyaluronsäure und somit schneller durch das Gel läuft. Deswegen würde hier ebenfalls ein weiterer HA-Standard mit höherer Molekülmasse benötigt, um den DNA-Standard mit diesem vergleichen zu können.

In Abbildung 13 sind alle verschiedenen Hyaluronsäure-Proben aufgetragen, um sie vergleichen zu können. Man erkennt deutlich, dass die Probe mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa wesentlich schneller durch das Gel wanderte als die anderen Proben mit höherer Molekülmasse. Jedoch war die Trennung der anderen Proben nicht zufriedenstellend, da keine signifikante Trennung der großen Molekülmassen zu erkennen war. Besonders HA mit 1,2 MDa sollte theoretisch wesentlich schneller durch das Gel wandern, als sie es getan hat. Hier könnte es bei der Probenvorbereitung von den hochmolekularen Proben mit 1,67 MDa und 2,12 MDa, wie oben angesprochen, eventuell zu Degradation gekommen sein. Es gäbe einerseits die Möglichkeit die Agarose-Konzentration noch weiter herunter zu setzen, z.B. auf 0,4%, wodurch das Gel jedoch noch instabiler werden würde. Andererseits könnte man versuchen, durch einen längeren Lauf von über zwei Stunden die Auftrennung der hochmolekularen HA-Proben zu verbessern. Die Beurteilung der HA-Proben in den Agarose-Gelen ist jedoch ohnehin erschwert, da die Verteilung der Molekülmassen nur an der Stärke der Färbung bzw. der Breite des Streifens beurteilt werden kann. Schwierig war zudem der Nachweis von HA im Fermentationsüberstand, da das in großen Mengen enthaltene SDS die Färbung mit Stains-All störte.

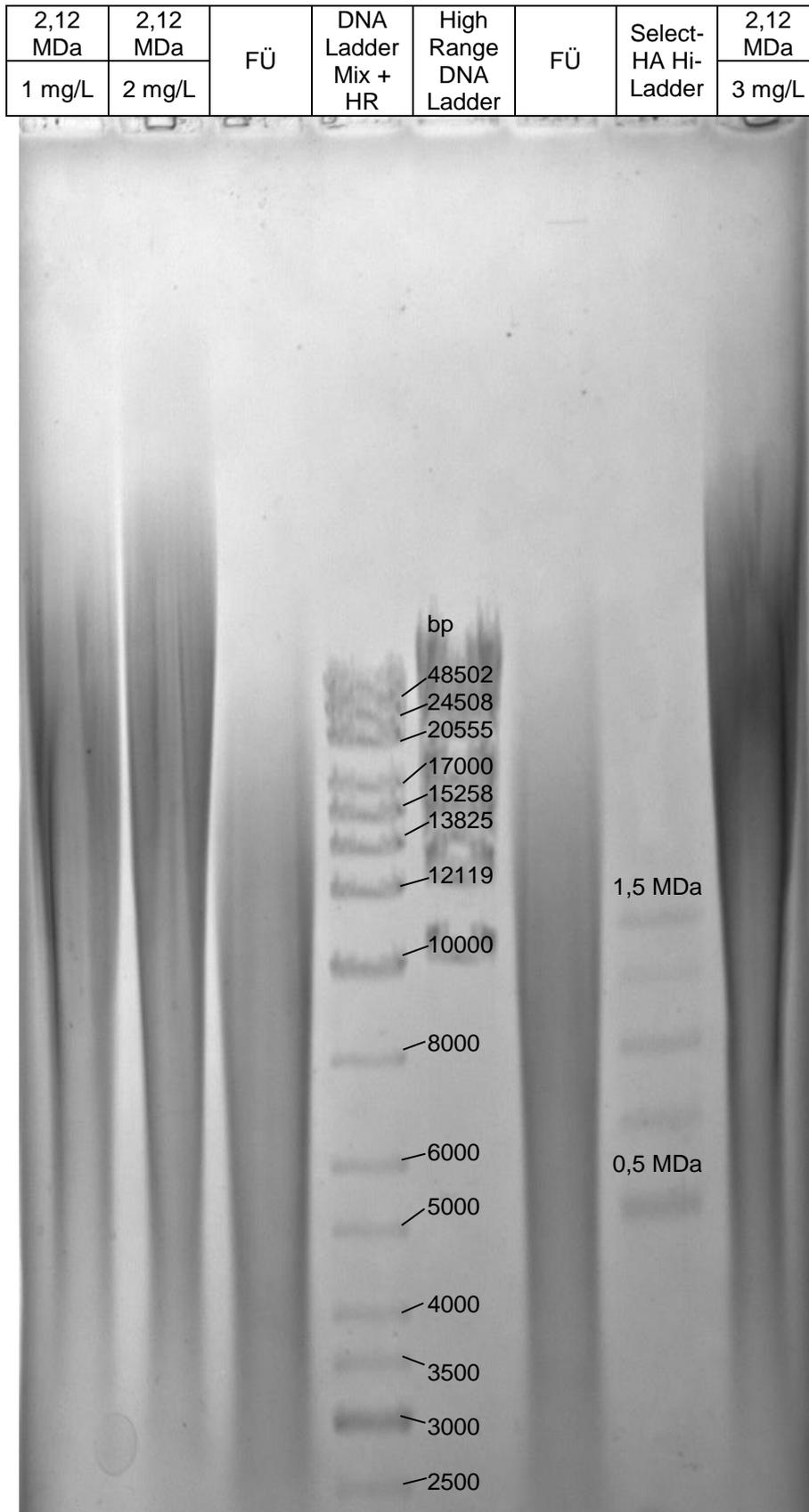


Abbildung 12: Aufnahme des 0,5%igen Agarose-Gels mit Dunkelhaube und Transilluminator. In der Tabelle oben ist angegeben, welche Probe in welche Geltasche pipettiert wurde. Ergänzt wurden Angaben dazu, welcher Molekülmasse die DNA-Ladder entsprechen. Aufgetragen wurden 2,12 MDa Hyaluronsäure-Proben, der Fermentationsüberstand, die DNA-Standards und der Hyaluronsäure-Standard Select-HA HiLadder. Die Hyaluronsäure wurde in den üblichen Konzentrationen aufgetragen, die auch bei der SEC Anwendung fanden. Das Gel wurde über 4 h mit 0,005 %

Stains-All in 50 % Ethanol im Dunkeln gefärbt und über Nacht in destilliertem Wasser im Dunkeln entfärbt. (FÜ = Fermentationsüberstand, HR = High Range)

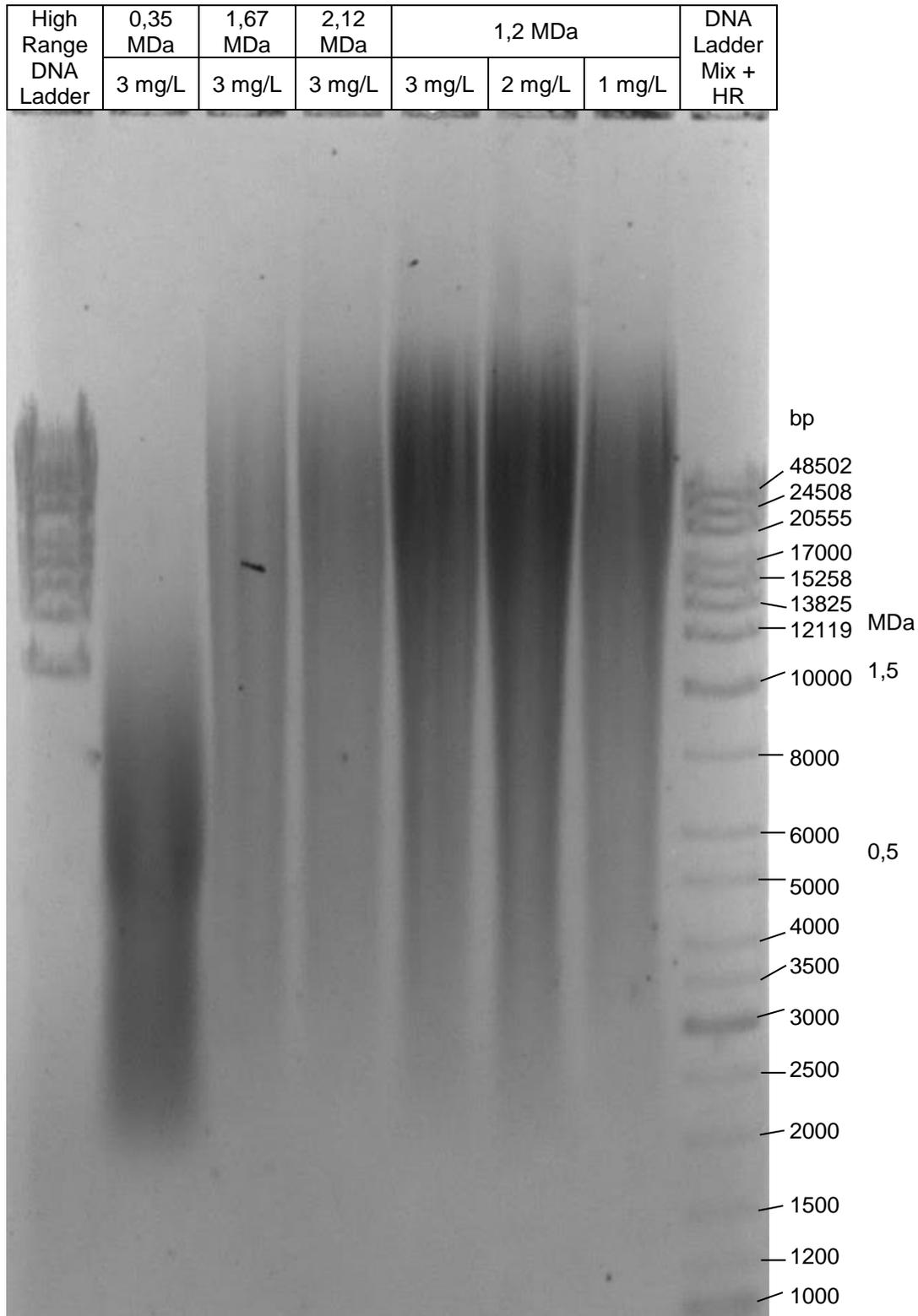


Abbildung 13: Aufnahme des Gels mit Dunkelhaube. In der Tabelle oben ist wiedergegeben, welche Probe in welche Geltasche pipettiert wurde. An der Seite ist zu sehen, welche Bande wie viele Basenpaare darstellt und wie viel MDa dies laut vorherigen Versuchen in etwa entspricht. Es handelt sich um ein 0,5%iges Agarose-Gel mit einer Länge von ca. 10 cm. Aufgetragen wurden Hyaluronsäure-Proben aller Molekülmassen und die DNA-Standards. Sie wurden in den üblichen Konzentrationen aufgetragen, die auch bei der SEC Anwendung fanden. (HR = High Range)

5 Schlussfolgerung

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit welcher die Molekülmasse sowie die Dispersität von Hyaluronsäure aus einer Fermentation präzise bestimmt werden können. Diese Methode sollte auf der SEC basieren. In dieser Arbeit wurden zwei mögliche Detektionsverfahren und ein Säulenmaterial getestet.

Der Ansatz bestand darin, mittels SEC zunächst eine Auftrennung einer Hyaluronsäure-Probe nach Molekülmasse vorzunehmen und anschließend mittels eines geeigneten Detektionsverfahrens auf die Molekülmasse und Dispersität schließen zu können. Es zeigte sich, dass mit der verwendeten Kombination aus Säulenmaterial/-design und Detektionsverfahren zwar grundsätzlich die Bestimmung der HA-Konzentration der Proben möglich war, jedoch diese Verfahren nicht ausreichen, um das obige Ziel zu erreichen.

Erstens konnte mangels eines funktionierenden Standardisierungsverfahrens, im Wesentlichen bedingt durch einen Mangel an geeigneten HA-Standards, mit der eingesetzten Geräte-/Detektionskonstellation keine präzise Molekülmassenbestimmung vorgenommen werden. Durch die Wahl einer Kombination aus Brechungsindex-Detektor und Lichtstreu-Detektor, wodurch auf eine Kalibrierung der Säule verzichtet werden könnte, da hier absolute Molmassenmittelwerte erhalten werden, könnte dieses Problem gegebenenfalls umgangen werden. Alternativ könnte zusätzlich die Viskosität jeder Probe gemessen werden, um über diese die Säule kalibrieren zu können. Die erste Methode würde sich im Zusammenhang mit der verwendeten Kronlab-Säule und dem Sephacryl S-500 HR Material eignen, da hier aufgrund der fehlenden Standards keine Kalibrierung vorgenommen werden kann.

Zweitens konnte, obwohl das verwendete Säulenmaterial die für die Trennung, von hochmolekularen Proben erforderlichen großen Partikel aufwies, mit der verwendeten Säule keine Auftrennung von Hyaluronsäuren mit Molekülmassen von 1,2 MDa, 1,67 MDa und 2,12 MDa erreicht werden. Mögliche Gründe hierfür konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht werden. Jedoch wird angenommen, dass das eigentlich für präparative Zwecke gedachte Säulendesign bzw. die Kombination aus Säulendesign und -material hierfür verantwortlich waren. Bei Einsatz einer schmaleren und kürzeren Säule, gegebenenfalls in Kombination mit einer geringeren Flussrate, wäre möglicherweise auch mit diesem Material eine Auftrennung hochmolekularer und sogar ultra-hochmolekularer HA erreichbar. Sollte dies nicht funktionieren,

könnte es stattdessen ausschließlich zur Trennung der fermentierten Hyaluronsäure von den restlichen Bestandteilen des Fermentationsüberstandes dienen, indem die HA-Fraktion aufgefangen würde.

Bei Verwendung eines alternativen Säulenmaterials, welches einen geringeren Ausschlussbereich nach oben hin aufweist, könnten hierfür eventuell kommerzielle Standards erworben werden, wodurch auch eine Kalibrierung durch die Viskositätsmessung ermöglicht werden könnte. Es würde dann der UV- oder RI-Detektor ausreichen, wenn zusätzlich die Viskosität bestimmt würde. Sinnvoller erscheint jedoch die Dreifachdetektion, bei der im Anschluss an die Säule der Brechungsindex bestimmt wird, die Viskosität gemessen und absolute Molekülmassen über die Lichtstreuung erhalten werden, da hiermit alle notwendigen Parameter für die Charakterisierung der Hyaluronsäure erfasst würden. Man könnte über die Molekülmassenmittelwerte die Dispersität der Probe berechnen und zusätzlich Kenntnis über die Struktur erlangen. Hiermit würde man auch das Problem lösen, das bei der UV-Detektion um 200 nm herum auftritt. Bei der Messung der Brechungsindex-Differenz zwischen Probe und mobiler Phase stört es nicht, dass beide sehr ähnliche UV-Spektren aufweisen. Jedoch müsste hier das Problem mit der Basisliniendrift durch Halten der Temperatur auf einem konstanten Wert unter Kontrolle gebracht werden.

Insgesamt zeigte sich, dass bis zur Entwicklung eines funktionstüchtigen Verfahrens zur Analyse von Hyaluronsäure-haltigen Proben noch zahlreiche Hürden zu überwinden wären. Mit den im Rahmen der Arbeit eingesetzten Methoden und Materialien war keine für analytische Zwecke befriedigende Trennung von Hyaluronsäure-Proben möglich. Die Bestimmung der Molekülmasse sowie der Dispersität von Hyaluronsäure war dadurch nicht möglich. Es ließen sich aber Möglichkeiten aufzeigen, dieses Ziel zu erreichen.

Literaturverzeichnis

- Agilent Technologies.** 2014. *chem.agilent.com.* [Online] 2014. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/GPC-SEC/PL-aquagel-OH-SEC-Analytical/Pages/default.aspx>.
- AMS Biotechnology Limited.** Amsbio. [Online] [Zitat vom: 11. September 2014.] <http://www.amsbio.com/search-results.aspx?value=HYA-&type=0>.
- AppliChem, [Hrsg.].** 2009. Agarose-Gel-Elektrophorese. 2009.
- Armstrong, D. C. und Johns, M. R.** 1995. Improved molecular weight analysis of streptococcal hyaluronic acid by size exclusion chromatography. *Biotechnology Techniques.* 9, 1995, 7, S. 491-496.
- Balke, S. T., et al.** 1969. Gel Permeation Chromatography. *I & E C Product Research and Development.* 8, 1969, 1, pp. 54-57.
- Boeriu, C. G., et al.** 2013. Review Article - Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry.* 2013, Vol. 2013, 2013. Article ID 64967.
- Bothner, H., Waaler, T. und Wik, O.** 1988. Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation. *Int. J. Biol. Macromol.* 10, 1988, October, S. 287-291.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.** 1995. Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung der Streptococcus equi subsp. zooepidemicus imm-Mutante D181 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten. 1995.
- Cammann, K., [Hrsg.].** 2001. *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung.* Heidelberg; Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001.
- Chong, B. F., et al.** 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2005, Vol. 66, 4, pp. 341-351.
- Cowman, M. K., et al.** 2011. Improved agarose gel electrophoresis method and molecular mass calculation for high molecular mass hyaluronan. *Analytical Biochemistry.* 2011, Vol. 417, 1, pp. 50-56.
- Dahlberg, A. E., Dingman, C. W. and Peacock, A. C.** 1969. Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agarose-acrylamide composite gels. *Journal of Molecular Biology.* 1969, Vol. 41, 1, pp. 139-146.
- DeAngelis, P. L. and Jing, W.** 2004. Synchronized Chemoenzymatic Synthesis of Monodisperse Hyaluronan Polymers. *Journal of Biological Chemistry.* 2004, Vol. 279, 40, pp. 42345-42349.
- Deutsches Institut für Normung e.V.** 1984. DIN 5031 - Teil 7. *Strahlungsphysik im optischen Bereich und Lichttechnik; Benennung der Wellenlängenbereiche.* Berlin : Beuth Verlag GmbH, Januar 1984.

- Engelhardt, H. und Rohrschneider, L. 1995.** Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur. s.l. : Gesellschaft Deutscher Chemiker Arbeitskreis Chromatographie, 1995.
- Fraser, J. R. E., Laurent, T. C. and Laurent, U. B. G. 1997.** Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, Vol. 242, 1, pp. 27-33.
- Garg, H. G. and Hales, C. A. 2004.** *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. s.l. : Elsevier Science, 2004.
- GE Healthcare. 2007.** Gel Filtration - Principles and Methods. [Handbuch]. 2007.
- Gey, M. H. 2008.** *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin Heidelberg : Springer, 2008. Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen.
- Gottwald, W. und Heinrich, K. H. 1998.** *UV-Vis-Spektroskopie für Anwender*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH, 1998.
- Hardingham, T.E., Gribbon, P. and Heng, B.C. 2000.** The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Journal of Biochemistry*. 2000, Vol. 350, pp. 329-335.
- Harris, D. C. 2011.** *Lehrbuch der quantitativen Analyse*. [Übers.] G. Werner und T. Werner. 8. New York : Springer, 2011.
- Hein, H. und Kunze, W. 2004.** *Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie*. 3. Auflage. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- Heinzmann, G. 2010.** Hyaluronsäure - Untersuchung einer komplexen Polysaccharidprobe mit der GPC/SEC. [Hrsg.] Malvern Instruments GmbH. 2010, GPC/SEC mit Dreifachdetektion: Tipps & Tricks Nr. 34.
- Heinzmann, G. und Tartsch, B. 2007.** Hyaluronsäure: Die Verbindung von Thixotropie und Gelpermeationschromatographie. [Hrsg.] Malvern Instruments GmbH. *Analytik News*. 4. Juli 2007, Application Note: Hyaluronsäure.
- Hokputsa, S., et al. 2003.** A comparison of molecular mass determination of hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation equilibrium. *Eur Biophys J*. 32, 2003, S. 450-456.
- Hyalose, L.L.C.** Hyalose - Products. [Online] [Zitat vom: 11. September 2014.] <http://www.hyalose.com/products/index.html>.
- Jagadeeswara Reddy, K. and Karunakaran, K. T. 2013.** Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7. *Journal of Bioscience and Biotechnology*. 2013, Vol. 2, 3, pp. 173-179.
- Jansohn, M. und Rothhämel, S. 2012.** *Gentechnische Methoden*. 5. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2012.

- Joeng, E., Shim, W.Y. and Kim, J.H. 2014.** Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* for Production of Hyaluronic Acid with High Molecular Weight. *Journal of Biotechnology*. May 2014.
- Kazakevich, Y.** The refractive index detector. [Online] [Cited: Februar 13, 2014.] http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_ri.html.
- Kogan, G., et al. 2007.** Hyaluronic Acid: A Biopolymer With Versatile Physio-Chemical And Biological Properties. [ed.] R. A. Pethrick, A. Ballada and G. E. Zaikov. *Handbook of Polymer Research: Monomers, Oligomers, Polymers and Composites*. New York : Nova Science Publishers, Inc., 2007, 31, pp. 393-439.
- Köhler, W. 2007.** The present state of species within the genera of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007, Vol. 297, pp. 133-150.
- Koltzenburg, S., Maskos, M. und Nuyken, O. 2014.** *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*. Heidelberg : Springer Science+Business Media, 2014. S. 43-96.
- Lancefield, R. C. 1933.** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *Streptococci*. *The Journal of Experimental Medicine*. März 1933, Vol. 57, 4, pp. 571-595.
- Laurent, T. C. and Fraser, J. R. E. 1992.** Hyaluronan. *FASEB Journal*. 1992, Vol. 6, 7, pp. 2397-2404.
- Laurent, T. C., Laurent, U. B. G. and Fraser, J. R. E. 1995.** Functions of Hyaluronan. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1995, Vol. 54, 5, pp. 429-432.
- Lechner, M. D., Gehrke, K. und Nordmeier, E. H., [Hrsg.]. 2010.** *Makromolekulare Chemie*. 4. Basel : Birkhäuser Verlag, 2010. S. 2-15, 241-341.
- Lee, H. G. and Cowman, M. K. 1994.** An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. *Analytical Biochemistry*. 1994, Vol. 219, 2, pp. 278-287.
- Liu, Y., et al. 2011.** Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges and perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2011, Vol. 10, 99.
- Mendichi, R. and Giacometti Schieron, A. 2002.** Fractionation and characterization of ultra-high molar mass hyaluronan: 2. On-line size exclusion chromatography methods. *Polymer*. 43, 2002, pp. 6115-6121.
- Mendichi, R., et al. 1998.** Characterization of ultra-high molar mass hyaluronan: 1. Off-line static methods. *Polymer*. 1998, Vol. 39, 25, pp. 6611-6620.
- Mendichi, R., Soltes, L. und Giacometti Schieron, A. 2003.** Evaluation of Radius of Gyration and Intrinsic Viscosity Molar Mass Dependence and Stiffness of Hyaluronan. *Biomacromolecules*. 4, 2003, 6, S. 1805-1810.
- Meyer, K. und Palmer, J. W. 1934.** The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *Journal of Biological Chemistry*. 107, 1934, 3, S. 629-634.

Milas, M., et al. 2001. Comparative Rheological Behavior of Hyaluronan from Bacterial and Animal Sources with Cross-Linked Hyaluronan (Hylan) in Aqueous Solution. *Biopolymers*. 59, 2001, pp. 191-204.

Mülhardt, C. 2013. *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. 7. Berlin Heidelberg : Springer, 2013.

Necas, J., et al. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 8, 2008, 53, S. 397-411.

Nielsen, L. K., et al. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, Vol. 66, 4, pp. 341-351.

O'Regan, M., et al. 1994. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. Dezember 1994, Vol. 16, 6, pp. 283-286.

Prestwich, G. D. 2001. Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan. *Glycoforum*. [Online] 2001. [Zitat vom: 8. September 2014.] <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18.pdf>.

Russell Publishing Ltd. European Pharmaceutical Review. [Online] Russell Publishing Ltd. [Zitat vom: 29. September 2014.] <http://media.europeanpharmaceuticalreview.com/wp-content/uploads/Novozymes-hyaluronic-acid-HA.jpg>.

Schiraldi, C., La Gatta, A. and De Rosa, M. 2010. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. [book auth.] M. Elnashar. *Biopolymers*. s.l. : INTECH Open Access Publisher, 2010, 20.

Schwedt, G. und Vogt, C. 2010. *Analytische Trennmethode*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

Showa Denko K.K. 2015. *shodex.com*. [Online] 2015. <http://www.shodex.com/en/da1/06/01/02.html>.

Stevens, D. L. and Kaplan, E. L. 2000. Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Mikrobiology and Molecular Pathogenesis. New York : Oxford University Press, Inc., 2000, pp. 238-243.

Strepto, R. F. T. 2009. Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendations 2009). [ed.] IUPAC. *Pure and Applied Chemistry*. Januar 2009, Vol. 81, 2, pp. 351-353.

Striegel, A. M., et al. 2009. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 2. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2009.

TOSOH Bioscience. 2015. *separations.eu.tosohbioscience.com*. [Online] 2015. http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/50628A87-A204-4053-8B02-4BF793DD579D/0/B12L15A_SEC_Brochure.pdf.

Waters. 2015. *Waters.com*. [Online] 2015. <http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=WAT011540>.

Widner, B., et al. 2005. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, Vol. 71, 7, pp. 3747-3752.

Wohlrab, J., Wohlrab, W. und Neubert, R.R.H. 2004. *Trends in Clinical and Experimental Dermatology*. 3. Aachen : Shaker Verlag, 2004. Bde. 3 - Hyaluronsäure und Haut.

Anhang

A Certificates of Analysis (COA)

Analysenzertifikat mit Spezifikationen und Resultaten des Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa:



Stanford Chemicals Company

360 Goddard, Irvine, CA 92618, USA

Tel: (949) 468-0555 Fax: (949) 812-6690

Certificate of Analysis

Product Name:	Sodium Hyaluronate	Origin:	Fermentation
Batch No.:	SCC2014112001	Manufacturing Date:	11/15/2014
Analysis Date:	11/20/2014	Retest Date:	11/20/2016
Batch Quantity:	161kg	Grade:	Cosmetics Grade

<u>Items</u>	<u>Specifications</u>	<u>Results</u>
Appearance	White or almost white powder	White powder
Sodium Hyaluronate	≥95%	95.02%
Glucuronic acid	≥42%	46.12%
pH(0.1% solution)	6.0-8.0	6.79
Molecular weight	1.0-1.3×10 ⁶ Da	1.2×10 ⁶ Da
Loss on drying	<10%	5.79%
Heavy metal	≤20ppm	Complies
Arsenic	≤2ppm	Complies
Bacterial counts	<500cfu/g	Complies
Mold and Yeast	<100cfu/g	Complies
Escherichia coli	Cannot be checkout	Complies
Salmonella	Cannot be checkout	Complies

Conclusion

Qualified

Stored: Stored in an airtight container at a cool place.

Stanford Chemicals Company

Analysenzertifikat mit Spezifikationen und Resultaten des Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa:

GfN[®]

ZEF18888

certificate of analysis

product	Hyaluronic Acid Na-Salt HMW
batch	30331303
producer	Contipro Biotech s.r.o.; Czech Republic
batch of producer	211013-A
manufacturing date	21.10.2013
date of analysis	18.11.2013
expire date	21.10.2015

test	method	specification	result
origin		biotechnological processing	pass
appearance	206.1.1-012	white powder or granules	pass
appearance of 0,5 % aqueous solution	206.1.1-008	clear to slightly opalescent, colourless, viscous solution	pass
clarity of 5% aqueous solution (660 nm, 1 cm)	206.1.1-008	< 0,010	< 0,001
residue on drying	206.1.1-002	> 90,0 %	93,0 %
molecular weight (SEC-MALS)	206.1.1-254	>= 2,00 MDa	2,12 MDa
pH of 0,5 % aqueous solution	206.1.1-220	5,0 - 8,0	6,4
protein *	206.1.1-227	<= 0,1 %	0,1 %
microbial contamination	206.1.1-800	< 100 CFU / g	< 5 CFU / g
uronic acid - UA *	206.1.1-005	> 45,0 %	49,6 %
sodium hyaluronate - UA x 2,067 *	206.1.1-005	> 93,0 %	102,5 %
ash *	206.1.1-014	< 10,0 %	7,8 %
preservative		none	pass

* calc. on dry basis

remarks

Result: This product is conform to specification.

The above identified product conforms to the agreed standard in all requirements. All data as mentioned have been copied from supplier's certificate and therefore are in complete accordance with those data received from the supplier. Above information do not relieve the purchaser from controlling the product on delivery.

date 25.11.2013

This certificate of analysis was printed automatically and is valid without signature.

GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH
Straßburg 16
69483 Wald-Michelbach / Germany
VAT-No. DE111632589

Phone +49 6207 922 80
Fax +49 6207 922 810
info@gfn-selco.de
www.gfn-selco.de

Managing Director: Michèle Lindner
Commercial Register:
AG Darmstadt HRB 40409
Tax No. 007 234 11074

CA_3033_e043.dtf
Rev e04
18.06.13 /as

Analysenzertifikat mit Spezifikationen und Resultaten des Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa:



certificate of analysis

product	Hyaluronic Acid Na-salt
batch	30101308
producer	Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouc, Czech Republic
batch of producer	240913-E2
manufacturing date	24.09.2013
date of analysis	29.10.2013
expire date	19.06.2015

test	method	specification	result
origin		biotechnological processing	pass
appearance	206.1.1-012	white powder or granules	pass
appearance of 0,5 % aqueous solution	206.1.1-008	clear to slightly opalescent colourless, viscous solution	pass
clarity of 1% aqueous solution	206.1.1-008	< 0,010	0,004
residue on drying	206.1.1-002	> 90,0 %	94,5 %
molecular weight (MDa)	206.1.1-013	1,50 - 1,80 MDa	1,67 MDa
kinematic viscosity of 0,05 % solution	206.1.1-003	1,96 - 2,46 cSt	2,23 cSt
pH of 0,5 % aqueous solution	206.1.1-220	5,0 - 8,0	6,3
protein content *	206.1.1-227	<= 0,1 %	0,1 %
total microbial count	206.1.1-800	< 100 CFU / g	10 CFU / g
uronic acid - UA *	206.1.1-005	> 45,0 %	48,4 %
sodium hyaluronate - UA x 2,067 *	206.1.1-005	> 93,0 %	100,0 %
ash *	206.1.1-014	< 10,0 %	7,9 %
preservative		none	pass

* calc. on dry basis

remarks

Result: This product is conform to specification.

The above identified product conforms to the agreed standard in all requirements. All data as mentioned have been copied from supplier's certificate and therefore are in complete accordance with those data received from the supplier. Above information do not relieve the purchaser from controlling the product on delivery.

date 20.11.2014

This certificate of analysis was printed automatically and is valid without signature.

GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH
Straßburg 16
69483 Wald-Michelbach / Germany
VAT-No. DE111632589

Phone +49 6207 922 80
Fax +49 6207 922 810
info@gfn-selco.de
www.gfn-selco.de

Managing Director: Michèle Lindner
Commercial Register:
AG Darmstadt HRB 40409

CA_3010_e06.dtf
Rev e06
04.12.12 / as

Analysenzertifikat mit Spezifikationen und Resultaten des Hyaluronsäure-Natriumsalz mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa:



certificate of analysis

product	Hyaluronic Acid Na-Salt LMW (HySilk, powder)
batch	30121401
producer	Contipro Biotech s.r.o., Dolni Dobrouc, Czech Republic
batch of producer	171213-E1
manufacturing date	17.12.2013
date of analysis	10.02.2014
expire date	20.11.2015

test	method	specification	result
origin		biotechnological processing	pass
appearance	206.1.1-012	white to slightly yellow powder or granules	pass
smell	206.1.1-010	none	pass
appearance of 0,5 % aqueous solution	206.1.1-008	clear to slightly opalescent, colourless solution	pass
clarity of 1% aqueous solution (660 nm, 1 cm)	206.1.1-008	< 0,010	0,001
residue on drying	206.1.1-002	> 90,0 %	98,2 %
molecular weight (SEC-MALS)	206.1.1-254	0,25 - 0,45 MDa	0,35 MDa
pH of 0,5 % aqueous solution	206.1.1-220	5,0 - 8,0	6,4
protein content *	206.1.1-227	< 0,20 %	0,13 %
total microbial count	206.1.1-800	< 100 CFU / g	< 5 CFU / g
uronic acid - UA*	206.1.1-005	> 45,0 %	49,0 %
sodium hyaluronate - UA x 2,067 *	206.1.1-005	> 93,0 %	101,3 %
ash *	206.1.1-014	< 10,0 %	8,6 %
preservative		none	pass

* calc. on dry basis

remarks

Result: This product is conform to specification.

The above identified product conforms to the agreed standard in all requirements. All data as mentioned have been copied from supplier's certificate and therefore are in complete accordance with those data received from the supplier. Above information do not relieve the purchaser from controlling the product on delivery.

date 20.11.2014

This certificate of analysis was printed automatically and is valid without signature.

GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH
Straßburg 16
69483 Wald-Michelbach / Germany
VAT-No. DE111632589

Phone +49 6207 922 80
Fax +49 6207 922 810
info@gfn-selco.de
www.gfn-selco.de

Managing Director: Michèle Lindner
Commercial Register:
AG Darmstadt HRB 40409

CA_3012_e04.dtf
Rev e04
18.09.07 /as

B Materialien und Daten

Tabelle 9: Während der Versuche verwendete Chemikalien, Reagenzien und anderes

Bezeichnung	Informationen														
VE-Wasser	Vollentsalztes oder demineralisiertes Wasser Salze wurden durch Ionenaustauscher entfernt														
Natriumchlorid	VWR International GmbH CAS-Nr.: 7647-14-5 Reinheit: 99,9 % Molekülmasse: 58,44 g/mol														
Ethanol absolute Ph. Eur.	VWR International GmbH CAS-Nr.: 64-17-5 Molekülmasse: 46,07 g/mol														
Hyaluronsäure- Natriumsalz	[→4)-β-Natrium-D-Glucuronsäure-(1→3)-β-N-Acetylglucosamin-(1→)n CAS-Nr.: 9067-32-7 Verkäufer: GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH Produzent: Contipro Biotech s.r.o. aus der Fermentation mit <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> mittlere Molekülmasse: 2,12 MDa; 350 kDa und 1,67 MDa Verkäufer: Stanford Chemicals Company Produzent: Jiangsu Haihua Bio-Technology Co., Ltd aus der Fermentation mit <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> mittlere Molekülmasse: 1,2 MDa														
Fermentations- überstand	850 mL Überstand aus der Fermentation mit <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> ATCC 35246 Das Medium (500 mL) bestand aus: <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Pepton aus Casein</td> <td>5 g/L</td> </tr> <tr> <td>Soja-Pepton</td> <td>5 g/L</td> </tr> <tr> <td>Brain-Heart-infusion broth</td> <td>5 g/L</td> </tr> <tr> <td>Hefeextrakt</td> <td>2,5 g/L</td> </tr> <tr> <td>Ascorbinsäure</td> <td>0,5 g/L</td> </tr> <tr> <td>Magnesiumsulfat x 7 H₂O</td> <td>0,5 g/L</td> </tr> <tr> <td>β-Glycerophosphat x 5 H₂O</td> <td>25,5 g/L</td> </tr> </table> Zur Abtrennung der Hyaluronsäure von den Zellen wurden 500 mL 0,1%iges SDS hinzugegeben.	Pepton aus Casein	5 g/L	Soja-Pepton	5 g/L	Brain-Heart-infusion broth	5 g/L	Hefeextrakt	2,5 g/L	Ascorbinsäure	0,5 g/L	Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g/L	β-Glycerophosphat x 5 H ₂ O	25,5 g/L
Pepton aus Casein	5 g/L														
Soja-Pepton	5 g/L														
Brain-Heart-infusion broth	5 g/L														
Hefeextrakt	2,5 g/L														
Ascorbinsäure	0,5 g/L														
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g/L														
β-Glycerophosphat x 5 H ₂ O	25,5 g/L														
Stains-All	Thermo Fisher Scientific Inc. CAS-Nr.: 7423-31-6 Molekülmasse: 559,6 g/mol														

Bezeichnung	Informationen
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG CAS-Nr.: 9012-36-6 Agarose Broad Range, Roti [®] garose BioScience-Grade
Bromphenol-Blau Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG CAS-Nr.: 34725-61-6 Molekülmasse: 691,9 g/mol wasserlöslich
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG CAS-Nr.: 51-50-1 Molekülmasse: 342,3 g/mol
Tris-Base	Merck Millipore Corporation CAS-Nr.: 77-86-1 Reinheit: >99% Molekülmasse: 121,1 g/mol
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG CAS-Nr.: 6381-92-6 Reinheit: >99% Molekülmasse: 372,24 g/mol
Essigsäure Ph. Eur.	VWR International GmbH CAS-Nr.: 64-19-7 Molekülmasse: 60,05 g/mol

Tabelle 10: Während der Versuche verwendete Materialien

Material	Informationen
Säulenpackung	GE Healthcare GmbH Sephacryl S-500 High Resolution quervernetzte Copolymere aus Allyl Dextran und N,N'-Methylene Bisacrylamid Partikelgröße 25 – 75 µm (Ø 47 µm) Ausschlussbereich der Poren: 40 – 20.000 kDa softes organisches Gel, empfindlich gegen hohe Drücke
Labor-Zentrifugen- Röhrchen	Sarstedt AG & Co 50 mL, Polypropylen, steril
Spritzen	Henke-Sass, Wolf GmbH NORM-JECT [®] Einmal-Spritzen Luer, steril, 2 mL (3 mL)

Material	Informationen
Filter	<p>Membranfilter Sartorius Stedim Biotech GmbH Porengröße: 0,2 µm, Cellulose-Acetat Verwendung: Entgasen, Sterilfiltrierung der Puffer</p> <p>Einmal-Spritzenfilter CHROMAFIL® Xtra RC-20/25 Macherey-Nagel GmbH & Co. KG Porengröße: 0,2 µm, regenerierte Cellulose Verwendung: Sterilfiltrierung der Proben und Standards</p>
Küvette	<p>Eppendorf AG µCuvette G1.0 Hydrophobe Oberflächenbeschichtung Schichtdicke: 1 mm Wellenlängenbereich: 180 nm – 2.000 nm Küvettenleerwert: ≤ 0,05 AU bei 260 nm</p>

Tabelle 11: Für die Versuche verwendete Geräte und Programme

Gerät, Software	Informationen
Säule	<p>Kronlab GmbH YMC Europe GmbH ECO 15 Aus Borosilikatglas Dimensionen: 88 x 1,5 cm CV: 115 mL</p>
BioCAD® SPRINT™	<p>Perseptive Biosystems, Inc. UV/Vis-Detektor Fließzellenvolumen (Analytische Zelle): 9 µL pH-Meter Fließzellenvolumen 50 µL Leitfähigkeitsdetektor Fließzellenvolumen 7 µL Scout Column Selector/Injektionsventil Online Degassing System 2000 von Alltech Vakuumentgaser Injektionsschleife Volumen: 2 mL</p>
Vakuumpumpe	<p>KNF Neuberger GmbH Membran-Vakuumpumpe mit Doppelkolben Typ: N 726.3FT.18</p>

Gerät, Software	Informationen
Smartline RI Detektor 2400	Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH Messwinkel: 15° Kapillaren-Innendurchmesser: 1 mm Messung bei Wellenlänge $\lambda = 950 \pm 30$ nm Messzellenvolumen: 9 μ L Messbereich: $\pm 2 \times 10^{-3}$ RIU Brechungsindexbereich: 1,00-1,75 RIU Signalmaximum: 1000 mV (full-scale-Ausschlag) Änderung je Grad Kelvin für reines Wasser beträgt $\sim 1 \times 10^{-4}$ RIU und für übliche organische Lösungsmittel $\sim 5 \times 10^{-4}$ RIU
Präzisionswaagen	A&D Instruments Ltd. GX-2000 Wägebereich: bis 2100 g Ablesbarkeit: 0,01 g, $\pm 0,02$ g Sartorius AG CPA225D Wägebereich: bis 220 g Ablesbarkeit: 0,0001 g, $\pm 0,0001$ g
Rotierender Mischer	DYNAL Sample Mixer Model MXICI
Spektralphotometer	Eppendorf AG BioSpectrometer basic Software: 3.4.3.0 Absorptions-Einstrahlphotometer mit Referenzstrahl Messbereich: 0 AU – 3 AU (260 nm) Wellenlängenbereich: 200 – 830 nm, Schrittweite: 1 nm Systematische Messabweichung: ± 1 % bei AU = 1 Messabweichung: $\leq 0,005$ (0,5 %) bei AU = 1 Lichtquelle: Xenon-Blitzlampe Strahlempfänger: CMOS-Photodiodenarray
Dunkelhaube	Biostep GmbH Dark Hood DH-40/50 mit weißem Oberlicht, Transilluminator UST-30M-8R, UV-Converter-Screen WY32 (Wellenlänge 312 nm) und Schiebetisch
Mikrowelle	Mio Star DMR-704

Gerät, Software	Informationen
Elektrophorese-Zubehör	Gelgießer: Gel Caster von BioRad Laboratories, Inc. Stromversorgung: Electrophoresis Power Supply 3501 XL von Amershan Pharmacia Biotech Zelle: Minicell® von EC Apparatus Co.
BioCAD®	Software der BioCAD® SPRINT™ Anlage
Microsoft® Excel	Tabellenkalkulations-Programm zur Auswertung der Daten
Argus X1	Biostep GmbH PC-Software zur Steuerung der Kamera der Dunkelhaube

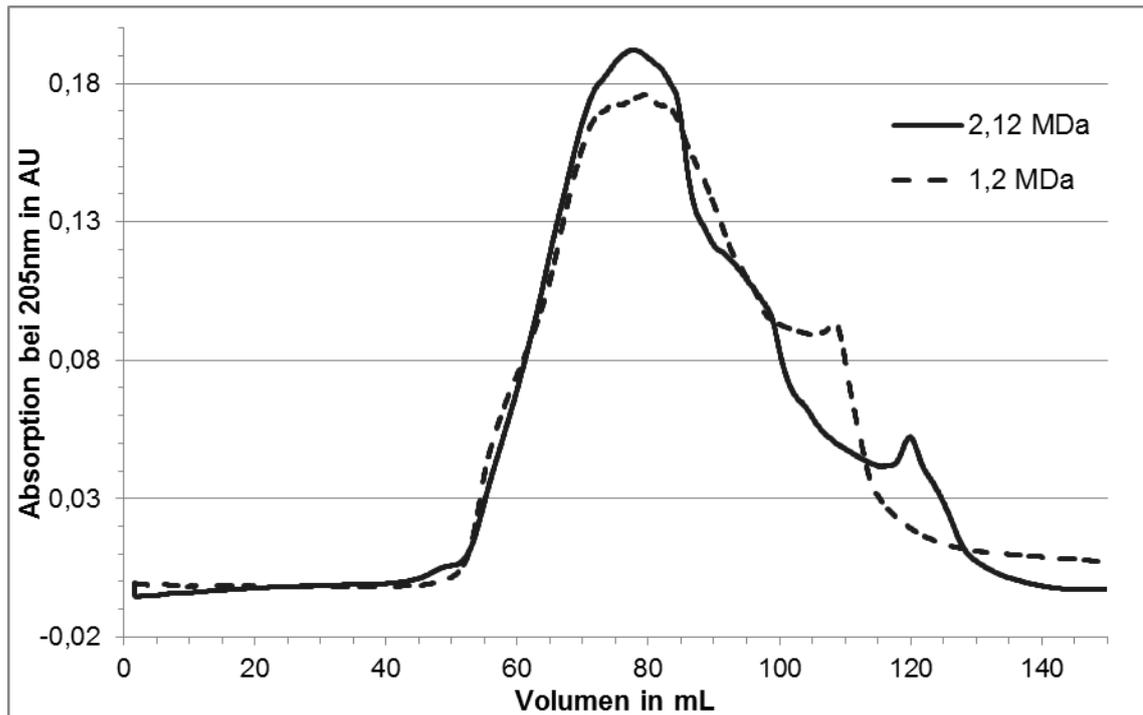


Diagramm 23: Vergleich der beiden Chromatogramme des zweiten Laufs von HA mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1 mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.

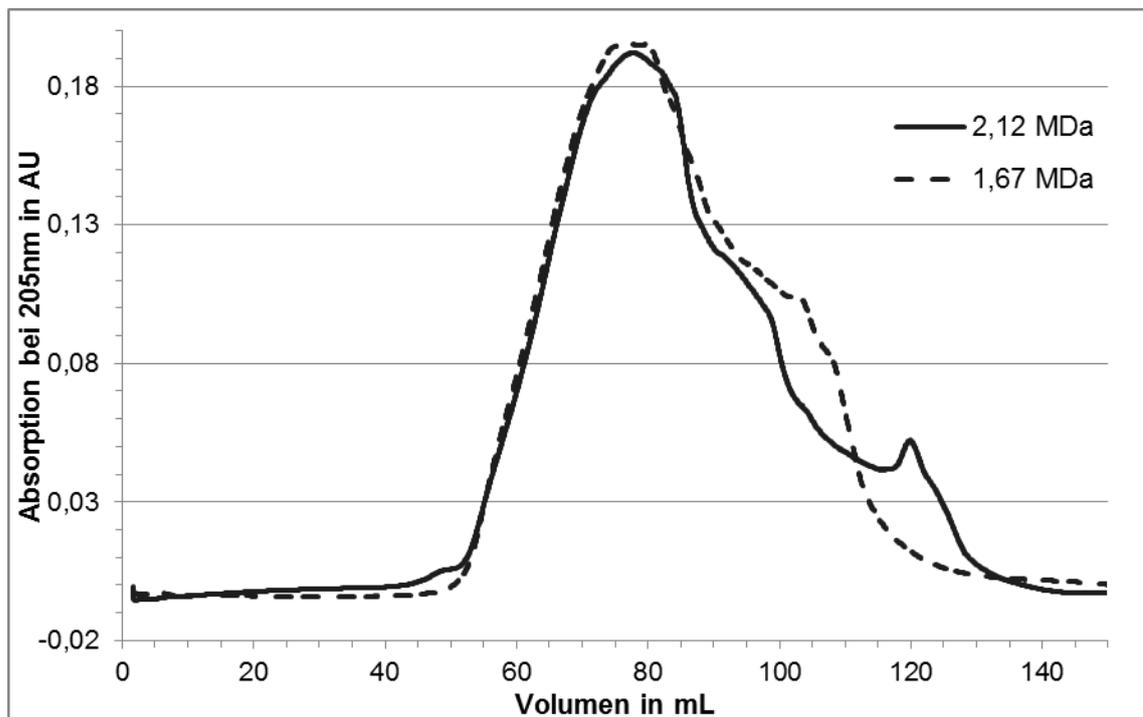


Diagramm 24: Vergleich der beiden Chromatogramme des ersten Laufs von HA mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 2,12 MDa bei einer Konzentration von 3 mg/mL und einer Flussrate von 1 mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.

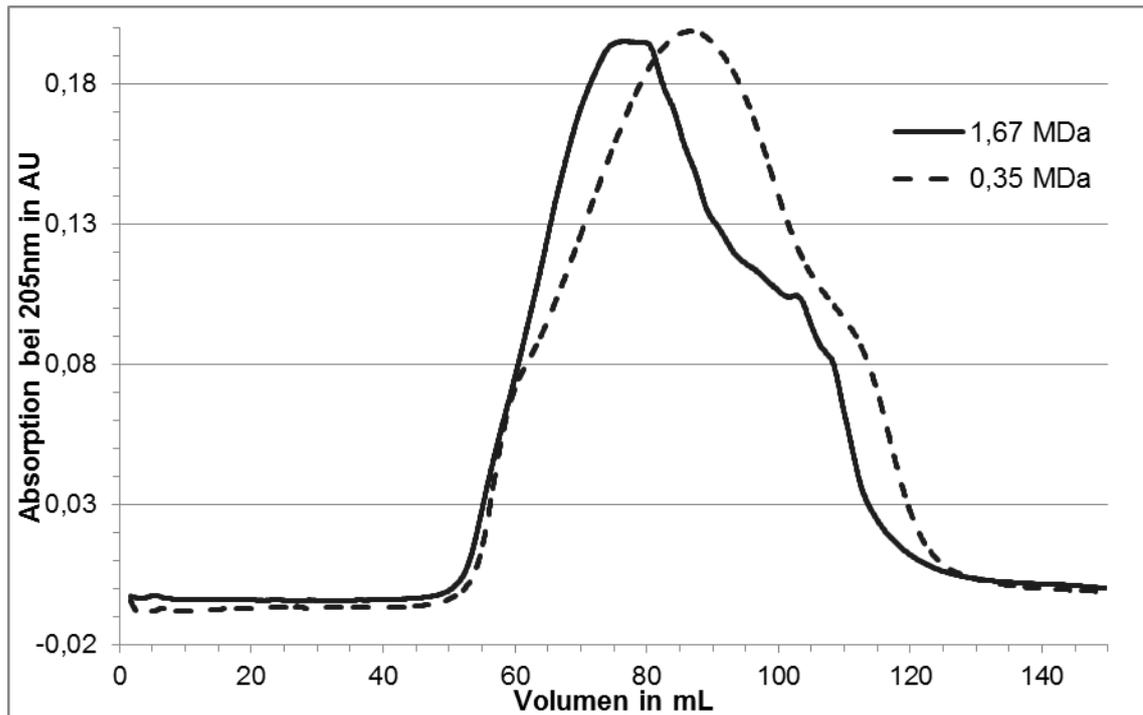


Diagramm 25: Vergleich der beiden Chromatogramme des ersten Laufs von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,67 MDa mit dem ersten Lauf von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3mg/mL und einer Flussrate von 1mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.

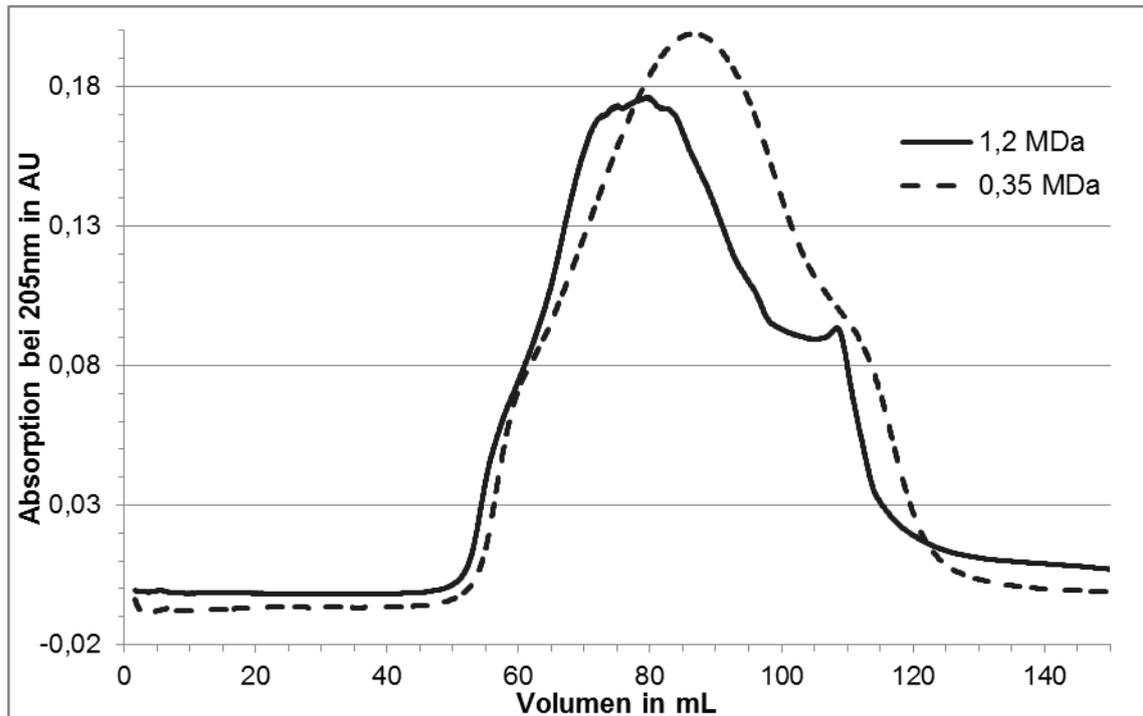


Diagramm 26: Vergleich der beiden Chromatogramme des zweiten Laufs von Hyaluronsäure mit einer Molekülmasse von 1,2 MDa mit dem ersten Lauf von HA mit einer Molekülmasse von 0,35 MDa bei einer Konzentration von 3mg/mL und einer Flussrate von 1mL/min. Daten wie Höhe, Fläche und Retentionszeiten der Peaks können Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Daten zur Fläche und Höhe einiger aufgenommenen Chromatogramme bei der jeweiligen Flussrate mit Angaben zur Hyaluronsäure-Probe, sowie Molekülmasse und Konzentration.

Lauf- Nummer	Molekül- masse in MDa	Konzen- tration in mg/mL	Fluss- rate in mL/min	Fläche in μAU-s	Höhe in μAU	Fläche in AU·Min	Ø	Höhe in AU	Ø	Retent- ionszeit in Min	Ø		
1	0,35	3	0,5	981000000	208849,76	16,35	-	0,209	-	175,15	-		
1			540000000	208095,46	9,00	-	0,208	-	85,23	-			
2			520000000	204239,23	8,67	8,84	0,204	0,21	85,45	85,61			
3			531000000	207313,34	8,85	-	0,207	-	86,14	-			
1	1,67	3	0,5	1030000000	206829,55	17,17	-	0,207	-	161,67	-		
1			450000000	203113,71	7,50	-	0,203	-	79,49	-			
2			465000000	187107,06	7,75	7,59	0,187	0,19	70,35	76,10			
3			451000000	189318,32	7,52	-	0,189	-	78,45	-			
1	1,2	1	0,5	345000000	110876,86	5,75	-	0,111	-	133,96	-		
1			140000000	111786,68	2,33	-	0,112	-	63,89	-			
2			146000000	117004,56	2,43	2,36	0,117	0,11	66,25	65,51			
3			139000000	114950,01	2,32	-	0,115	-	66,40	-			
1		2	1	0,5	669000000	160806,33	11,15	-	0,161	-	144,03	-	
1				282000000	158895,47	4,70	-	0,159	-	73,26	-		
2				282000000	148895,03	4,70	4,57	0,149	0,15	68,86	70,69		
3		258000000	142401,87	4,30	-	0,142	-	69,95	-				
1		3	1	0,5	992000000	180274,18	16,53	-	0,180	-	164,80	-	
1				414000000	186092,87	6,90	-	0,186	-	76,79	-		
2				411000000	176847,20	6,85	6,91	0,177	0,18	78,82	78,15		
3		419000000	191312,04	6,98	-	0,191	-	78,85	-				
1	2,12	1	0,5	362000000	117562,91	6,03	5,99	0,118	0,12	130,07	131,65		
2			357000000	112770,34	5,95	0,113		133,23					
1			341000000	166668,18	5,68	-	0,167	-	42,55	-			
1			145000000	111609,72	2,42	-	0,112	-	63,03	-			
2			147000000	113228,51	2,45	2,42	0,113	0,11	64,18	63,85			
3			143000000	93577,33	2,38	-	0,094	-	64,33	-			
1			2	1	0,5	701000000	157100,22	11,68	11,52	0,157	0,16	144,22	145,37
2					681000000	167929,97	11,35	0,168		146,52			
1		388000000			163411,49	6,47	6,32	0,163	0,16	80,75	85,68		
2		370000000			161211,91	6,17		0,161		90,61			
1		307000000		161171,73	5,12	-	0,161	-	72,20	-			
2		275000000		158045,63	4,58	4,79	0,158	0,16	70,09	71,41			
3		280000000		161984,35	4,67	-	0,162	-	71,95	-			
1		3		1	0,5	1040000000	188752,35	17,33	17,25	0,189	0,19	157,55	160,74
2			1030000000		199675,48	17,17	0,200	163,93					
1			560000000		207586,70	9,33	9,44	0,208	0,20	102,43	102,94		
2			573000000		196568,49	9,55		0,197		103,44			
1			443000000	199056,63	7,38	-	0,199	-	77,60	-			
2			397000000	177700,98	6,62	7,07	0,178	0,19	75,08	78,12			
3			432000000	193405,02	7,20	-	0,193	-	81,67	-			
1			FÜ	2,5	0,5	2581822	6522,43	0,04	-	0,007	-	77,97	-
		272000000			114511,68	4,53	-	0,115	-	138,35	-		
		879000000			259000,00	146,50	-	2,590	-	284,49	-		
1		FÜ+2,12	2,5+3	1	143000000	101707,36	2,38	-	0,102	-	69,75	-	
	273000000			144000,00	45,50	-	1,440	-	141,14	-			