

# **Neuartige hydrophile makromolekulare Netzwerke**

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Tim A. Wilhelms  
aus Hamburg

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2002 bis April 2005 am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. W.-M. Kulicke angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. W.-M. Kulicke
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

Tag der letzten Prüfung 27.5.2005

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. W.-M. Kulicke für seine Begleitung und Unterstützung sowie die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. P. Heisig danke ich für die Übernahme des Korreferats, seine anregenden Gesprächen und der Möglichkeit in seinen Räumlichkeiten mikrobiologisch Arbeiten zu können.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich immer unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Kaeßmann und Herrn Dr. med. Bisgwa danke ich für, die anregenden Gespräche bezüglich der Wundheilung und deren Versorgung und letzteren für die kurzzeitige Hospitation im Schwerbrandverletzentrum BGK HH-Boberg.

Des weiteren danke ich folgenden Institutionen und Personen die es mir ermöglicht haben weiterführende Untersuchungen durchzuführen:

Herr Prof. Moritz – Universität Hamburg – Quecksilber-Porosimetrie

Herr Prof. Basler – Universität Hamburg – Raster-Elektronen-Mikroskopie

Frau Dr. S. Wessel – Beiersdorf AG - konfokale Lasermikroskop Aufnahmen

Herr Dr. Peinemann und Herr Carsten Schollens – GKSS Forschungszentrum Geesthacht – Permeationsmessungen

Herr Dr. Schulte und Herr Gührs – TU Hamburg Harburg - Zug-Dehnungs Untersuchungen

Frau Dipl. chem. Anja Jaenschke – Universität Hamburg - Röntgenstrukturuntersuchung

Außerdem danke ich dem gesamten Arbeitskreis für die stetige Diskussionsbereitschaft und das gute Zusammenarbeiten. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. M. Knarr und Dr. C. Clasen.

## **Publikationen**

---

W.-M. Kulicke, T.A. Wilhelms

„Wundauflage“, Patentanmeldung, 102004047115,0, Universität Hamburg,  
27.09.2004

## **Posterbeiträge**

---

T.A. Wilhelms, W.M. Kulicke, C. Tachechi\*, M. Wießler\*

„Neuartige makromolekulare Netzwerke zur Herstellung großflächiger Wundauflagen“  
Universität Hamburg, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg\*  
Hamburger Makromolekulares Symposium, 8. September 2003, Hamburg

T.A. Wilhelms, W.M. Kulicke

„Neuartige makromolekulare Netzwerke zur Herstellung von großflächigen  
Wundauflagen für den Einsatz als Medizinprodukt der Klasse III“  
Membranmaterialien – Anforderungen und Eigenschaften in den verschiedenen  
Anwendungen, 23. März 2004, DECHEMA, Frankfurt am Main

T.A. Wilhelms, Evgenia Grigoryeva, Barno Sultanova, W.M. Kulicke

„Neuartige makromolekulare Netzwerke zur Herstellung von großflächigen  
Wundauflagen für den Einsatz als Medizinprodukt der Klasse Iib-III“  
Makromolekulares Kollogium, 24-26. März 2005, Albert Ludwigs Universität,  
Freiburg im Breisgau

## **Vorträge**

---

T.A. Wilhelms, W.-M. Kulicke

„Neuartige makromolekulare Netzwerke zur Herstellung großflächiger Wundauflagen  
für den Einsatz als medical care products“  
DECHEMA-Haus, Frankfurt am Main, 20. Januar 2004

T.A. Wilhelms, W.M. Kulicke, C. Tachechi\*, M. Wießler\*

„Neuartige makromolekulare Netzwerke zur Herstellung großflächiger Wundauflagen für den Einsatz als medical care products“

Universität Hamburg, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg\*

Projekt: Jugend recherchiert Umwelt –100 Schulen im Dialog, Deutsches

Krebsforschungszentrum Heidelberg, 1. April 2004

T.A. Wilhelms, W.-M. Kulicke

„Neuartige makromolekulare Netzwerke zur Herstellung von großflächigen

Wundauflagen für den Einsatz als Medizinisches Produkt der Klassen IIb-III“

DECHEMA-Arbeitsausschuß Polyreaktionen, (Antrag auf Forschungsförderung zur

Vorlage bei der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen - AIF),

DECHEMA-Haus, Frankfurt am Main, 24.-25. Januar 2005



---

Hydrophile makromolekulare Netzwerke können hinsichtlich ihrer Netzwerkstruktur an ein gegebenes Eigenschaftsprofil angepasst werden. Die Anwendungsgebiete solcher Netzwerke sind vielschichtig und reichen von Hydrogelen (z.B. Ultraschallgele, Frag-Gele) über Superabsorber (z.B. Inkontinezartikel) bis zu Membranen.

Spezielle Membranen werden auch für die Wundabdeckung eingesetzt. Aus medizinischer Sicht besteht ein hoher Bedarf für die Versorgung von Problemwunden wie chronische oder Brandwunden. Nach Angaben der gesetzlichen Krankenkassen (2001) gibt es in Deutschland 2,5 Millionen Patienten mit einer chronischen Wunde (Ulkus cruris). Die kommerziellen Wundaufgaben die das Prinzip der feuchten Wundheilung beinhalten, zeigen meist keine Vorteile bei der Versorgung von Problemwunden, gegenüber der klassischen Wundversorgung.

Ziel dieser Arbeit ist es, Wundaufgaben zu entwickeln, welche die Heilung von Problemwunden fördern. Hierzu werden grundlegende Untersuchungen an neuartigen makromolekularen Netzwerken Bakteriencellulose-, Symplex- und Chitosan-Membranen durchgeführt.

Bakteriencellulose wird biotechnologisch durch das Bakterium der Spezies *Acetobacter xylinum* in einem Nährmedium an der Luftsauerstoffgrenze erzeugt. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen entstehen hochreine Cellulose-Membranen mit einer sehr hohen Molmasse (>1 Mio. g/mol) und einer hohen Feinstrukturierung der Cellulosefibrillen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass z.B. unterschiedliche Stämme von *Acetobacter xylinum* die Qualität der Bakteriencellulose stark beeinflussen.

Des Weiteren wurden verschiedene Techniken zur Herstellung von Chitosanmembranen genutzt und diese hinsichtlich Ihrer Materialeigenschaften modifiziert. So wurde bei diesen Membranen u.a. die Elastizität, Reißfestigkeit, Permeationseigenschaften und die Oberflächenstruktur modifiziert.

Als Symplexmembra bezeichnet man einen Komplex aus entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten, wobei die Wechselwirkungen zwischen den Polymeren hauptsächlich ionischer Natur sind. Diese Art von Membranen weisen eine hohe Selektivität bei gleichzeitig hohem Permeatfluss bei der Trennung von Wasser-Alkoholgemischen auf.

Die Materialeigenschaften der Membranen werden u.a. maßgeblich durch die chemische und makromolekulare Struktur der verwendeten Polymere (Sulfoethylcellulose, Chitosan und Poly-Diallyldimethylammoniumchlorid) beeinflusst. Es wurden daher alle Polymere

umfassend hinsichtlich ihres durchschnittlichen und regiospezifischen Substitutionsgrades mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektroskopie untersucht. Neben der Viskosimetrie konnten, durch eine kombinierte Anlage aus Größenausschlusschromatographie (GPC) bzw. Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF), Vielwinkellaserlichtstreuung (MALLS) und Konzentrationsdetektor (DRI), die absoluten Molmassenverteilungen bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Membraneigenschaften wurden verschiedene *in vitro* Untersuchungen (Permeabilität, Zug-Dehnung, Morphologie, Oszillationsmessungen) durchgeführt. Rheomechanische Oszillationsmessungen im linear viskoelastischen Bereich erlauben die direkte Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter, die die Membraneigenschaften maßgeblich bestimmen. So konnte z.B. die Veränderung der Netzwerkstruktur durch unterschiedliche Weichmacherkonzentrationen, Molmasse, Ladungsdichte oder durch Quellung direkt bestimmt werden. Die ermittelten Netzwerkstrukturparameter einer Chitosanmembran mit unterschiedlichem Weichmacheranteil (Glycerin) sind in der folgenden Tabelle angegeben.

<i>Glycerin</i>	$G'$ [Pa]	$M_e$ [g/mol]	$P_e$	$v_e$ [cm <sup>3</sup> ]	$\xi$ [nm]
0 %	24326	122.600	761	5,91 E+18	5,5
33 %	22254	104.700	650	5,40 E+18	5,7
66 %	16734	111.500	693	4,07 E+18	6,3
100 %	10603	128.600	799	2,58 E+18	7,3

Tabelle:  $G'$  Speichermodul,  $M_e$  Verhängungsmolmasse,  $P_e$  Polymerisationsgrad von  $M_e$ ,  $v_e$  Netzpunktdichte,  $\xi$  Netzpunktabstand.

Es besteht die Möglichkeit weitere Substanzen kovalent an die hergestellten Membranen mit Hilfe der Diels-Alder Reaktion zu binden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die hohe Anzahl von Hydroxyl- oder Amingruppen in den verwendeten hydrophilen Membranen z.B. Furanderivate (als Dien) kovalent über Veresterungen und Amidierungen an die Membranen gekoppelt werden. In einer anschließenden Diels-Alder-Reaktion wurde die mit Dienen (Furan) versehene Membran mit einer Maleinimidverbindung, die als Modellsubstanz für Wirkstoffe dient, (Dienophil) umgesetzt. Es wurde eine Reihe von heterogenen Diels-Alder-Reaktionen an den unterschiedlichen Membranen durchgeführt um zu zeigen, dass eine solche nachträgliche kovalente Anbindung von Substanzen (Wirkstoffe) an den verwendeten Membranen möglich ist. Hierbei zeigen Chitosanmembranen eine Reaktionsfähigkeit von 51 % und Symplexmembranen nur eine 3 % Reaktionsfähigkeit gegenüber der verwendeten Maleinimidverbindung.

---

Hydrophilic macromolecular networks can be adapted to a specified property in regard to their network structure. The range of applications of networks are complex and go from hydro gels (ultrasonic gels, frag-gels) over super absorbers (incontinence article) to membranes.

Specific types of membranes can be used for wound covering. From a medical point of view there is a high demand in medical care products for the treatment of problematic wounds (chronic wounds or burns). According to the compulsory health insurance funds (2001) of Germany there are 2.5 million patients with a chronic wound (ulcus cruris). The commercial available wound care materials, incorporating the principle of moist wound healing, show no advantage for the wound healing process of problematic wounds compared to a „classic“ wound treatment.

Therefore aim of this work is to develop moist wound care products that actively assist the healing process of problematic wounds. For this purpose, basic investigations on a new kind of macromolecular network membranes (Symplex-, Chitosan- and bacterial cellulose-membranes) have been carried out.

Bacterial cellulose membranes were synthesized microbiologically from *Acetobacter xylinum* in form of pellicles at the air/liquid interface of the culture medium in a static culture. Under suitable growth conditions the bacteria produce high-purity cellulose pellicles with a high molecular weight (> 1 mio. g/mol) and a superfine-structure of the cellulose fibrils. We could show that it is possible to modify the bacterial cellulose membranes using different types of culture medium or different types of *Acetobacter xylinum* strains.

Furthermore, we have used different techniques to prepare chitosan membranes to modify material properties of the membranes, as the elasticity, tensile strength, permeability or the surface structure.

Symplex membranes are a complex of opposite charged polyelectrolytes. The polymer chains are cross-linked by electrostatic forces of the different charges through direct and indirect charge compensation. This type of membrane is suitable for the separation of alcohol/water mixtures with a high selectivity and high permeation rates.

The material properties of the membranes are affected amongst other things significantly by the chemical and macromolecular structure of the used polymers (sulfoethylcellulose, chitosane and poly-DADMAC). Therefore a detailed characterization of these precursors was

necessary. The charge density of the substances was determined with  $^1\text{H}$ -  $^{13}\text{C}$ - nuclear magnetic resonance spectroscopy via the degree of deacetylation (DDA) or the degree of substitution (DS) respectively. The molecular parameters of the precursors were characterized in terms of the molar mass and the molar mass distributions (MWD). In addition to viscometry, the analysis of the MWD was carried out using a combined absolute method of size exclusion chromatographic (SEC) or field-flow-fractionation (FFF) with multi-angle laser light scattering (MALLS) and concentration detection via refractive index measurements (RI). The determination of the membrane properties has been carried out utilizing different in vitro investigations (permeability, tensile strain tests, morphologic, rheomechanical oscillatory experiments). Rheomechanical oscillatory measurements in the linear viscoelastic area allow the direct calculation of network parameters, which determine significantly the membrane properties. With these techniques changes of the network parameters due to different concentration of a flexibiliser, molecular mass, charge density or the swelling process could directly determined. The calculated network parameters of a Chitosanmembrane with different concentration of a flexibiliser (Glycerin) are shown in the following schedule.

<i>Glycerin</i>	$G'$ [Pa]	$M_e$ [g/mol]	$P_e$	$\nu_e$ [ $\text{cm}^3$ ]	$\xi$ [nm]
0 %	24326	122.600	761	5,91 E+18	5,5
33 %	22254	104.700	650	5,40 E+18	5,7
66 %	16734	111.500	693	4,07 E+18	6,3
100 %	10603	128.600	799	2,58 E+18	7,3

Schedule:  $G'$  storage modulus,  $M_e$  molar mass between two entanglement points,  $P_e$  degree of polymerisation between two entanglement points,  $\nu_e$  cross-link density,  $\xi$  distance between two entanglement points.

It is possible to link additional substances to the membranes via a Diels-Alder reaction. In this work, the high amount of hydroxyl- or amino- groups in the hydrophilic membranes allowed for example an easy addition of furanderivates (dien) via the corresponding ester and amide formation to the membrane.

In a subsequent Diels-Alder-Reaction the dien (Furan) of the membrane was linked to a maleimido compound (model substance for a active agent) on the surface of the membranes. A series of heterogeneous Diels-Alder reactions with different membranes has been carried out to demonstrate the possibility to link in an additional process different substances (active agents) to the membranes. Related to this the Chitosanmembranes show a reactivity of 51 % compared to a reactivity of 3 % of the Symplexmembranes for the used maleimido compound.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	7
2.1	Molmasse, Knäuelgröße sowie deren Verteilungen.....	7
2.1.1	Viskosimetrie.....	9
2.1.2	Lichtstreuung.....	12
2.1.3	Größenausschlußchromatographie.....	21
2.1.4	Asymmetrische-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung.....	23
2.1.5	Gerätekopplung zur Bestimmung der absoluten Molmasse und Molmassenverteilungen.....	27
2.2	Rheologie.....	29
2.2.1	Stationäres Scherfließen.....	30
2.2.2	Oszillationsmessungen.....	31
2.3	Ultraschalldegration.....	36
2.4	NMR-Spektroskopie.....	39
2.5	Quecksilber-Porosimetrie.....	40
2.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	42
2.7	Konvokales Lasermikroskop.....	45
2.7.1	Aufbau.....	45
2.7.2	Theoretische Grundlagen der 3D konfokalen Mikroskopie.....	48
2.8	Prinzip der Wundheilung.....	50
3	Charakterisierung der Ausgangsverbindungen.....	59
3.1	Sulfoethylcellulose.....	59
3.1.1	Verwendete Sulfoethylcellulose Proben.....	59
3.1.2	NMR-Untersuchungen.....	62
3.1.3	Viskosimetrie.....	64
3.1.4	Lichtstreuung.....	66
3.1.5	Lösungsstruktur.....	72
3.2	Chitosan.....	74
3.2.1	Chitosan - Vorkommen und Herstellung.....	74
3.2.2	Verwendete Chitosanproben.....	80
3.2.3	NMR-Untersuchungen.....	82

---

3.2.4	Viskosimetrie.....	86
3.2.5	Lösungsstruktur.....	88
3.3	Poly-Diallyldimethylammoniumchlorid.....	97
3.3.1	Herstellung und molekularer Aufbau.....	97
3.3.2	Viskosimetrie.....	100
4	Membranen.....	102
4.1	Allgemeines.....	102
4.2	Symplexe.....	104
4.3	Kovalente und physikalische Netzwerke.....	112
5	Synthese und Charakterisierung von hydrophilen Membranen.....	117
5.1	Bakteriencellulose.....	117
5.1.1	Herstellung.....	122
5.1.2	Herstellung von dien- und dienophil-modifizierter Bakteriencellulose.....	126
5.1.2.1	3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose.....	127
5.1.2.2	Herstellung von 1,2-5,6-Di-O-isopropyliden-3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose.....	128
5.1.2.3	Herstellung von 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose.....	133
5.1.2.4	3-O-Acrylat-glucopyranose.....	136
5.1.2.5	Herstellung von Di-O-isopropyliden-3-O-(acrylat)- $\alpha$ -D-glucofuranose....	137
5.1.2.6	Herstellung von 3-O-Acrylat-D-glucose.....	139
5.1.2.7	Herstellung modifizierter Bakteriencellulose.....	140
5.1.3	Ultraschallabbau von Bakteriencellulose.....	142
5.1.4	Molmassenbestimmung an Bakteriencellulose.....	144
5.1.5	Quellung.....	145
5.1.6	Netzwerkstruktur.....	146
5.1.7	Permeabilität der Bakteriencellulose-Membranen.....	149
5.1.8	Morphologie der Bakteriencellulosemembranen.....	152
5.1.9	Zusammenfassung.....	153
5.2	Symplexmbranen.....	154
5.2.1	Herstellung.....	155
5.2.2	Symplexbildungsverhalten.....	159
5.2.3	Verstärkung der Symplexmbran .....	161
5.2.4	Herstellung von Dien modifizierten Symplexmbranen.....	162

---

5.2.5	Quellung.....	163
5.2.6	Netzwerkstruktur.....	166
5.2.7	Permeabilität der Symplexmembranen.....	171
5.2.8	Morphologie der Symplexmembranen.....	176
5.2.9	Mechanische Eigenschaften.....	178
5.2.10	Langzeitstabilitätstest der Symplexmembranen.....	180
5.2.11	Diels-Alder Reaktionen an Symplexmembranen.....	180
5.2.12	Zusammenfassung.....	182
5.3	Chitosanmembranen.....	184
5.3.1	Herstellung.....	188
5.3.1.1	Glatte, durchsichtige Chitosanmembranen.....	188
5.3.1.2	Makroporöse Chitosanmembranen.....	189
5.3.1.3	Mikroporöse Chitosanmembranen.....	190
5.3.1.4	Verstärkte Chitosanmembranen.....	191
5.3.1.5	Chitosanmembran Herstellung über Phasenseparation.....	191
5.3.2	Vernetzung von Chitosanmembranen.....	192
5.3.3	Vernetzung mit Dialdehyden - Chitosanhydrogel.....	192
5.3.3.1	Vernetzung mit Epichlorhydrin.....	194
5.3.4	Quellung.....	195
5.3.5	Netzwerkstruktur.....	199
5.3.6	Permeabilität und Flüssigkeitstransport der Chitosanmembranen.....	211
5.3.7	Flüssigkeitstransport.....	217
5.3.8	Morphologie der Chitosanmembranen .....	220
5.3.8.1	Glatte Chitosanmembranen.....	220
5.3.8.2	Chitosanmembran mit Makroporen.....	221
5.3.8.3	Chitosanmembran mit Mikroporen .....	226
5.3.9	Konfokale Lasermikroskop Aufnahmen.....	229
5.3.9.1	Glatte Chitosanmembranen.....	230
5.3.9.2	Makroporöse Chitosanmembranen.....	231
5.3.9.3	Mikroporöse Chitosanmembranen.....	235
5.3.10	Porengrößenverteilung.....	236
5.3.11	Mechanische Eigenschaften.....	241
5.3.12	Langzeitstabilitätsuntersuchungen.....	248

---

5.3.13	Diels-Alder-Reaktionen an Chitosanmembranen.....	250
5.3.14	Zusammenfassung.....	254
6	Fazit und Ausblick.....	256
7	Experimenteller Teil.....	258
7.1	Modifizierung von Chitosan mit Dienen oder Dienophilen.....	258
7.1.1	Homogene Umsetzung.....	258
7.1.2	Heterogene Umsetzung.....	265
7.2	Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter mittels Rheomechanischen Untersuchungen.....	269
7.3	Bestimmung der Permeabilität von Membranen.....	272
7.3.1	Wasserdampfpermeation.....	273
7.3.2	Gaspermeation (Wasserstoff; Sauerstoff; Stickstoff; Kohlendioxid).....	274
7.4	Bestimmung der Zugbelastung.....	275
7.5	Diels-Alder Reaktionen an Membranen.....	275
7.6	Membranmodifizierung.....	278
7.7	Ultraschalldegration.....	279
7.8	Trockengehaltsbestimmungen.....	280
7.9	Viskosimetrie.....	280
7.10	Lichtstreu-Untersuchung mit (GPC - FFF/MALLS/DRI).....	280
7.11	NMR-Spektroskopie.....	282
8	Anhang.....	283
8.1	Sicherheitshinweise.....	283
8.2	Verwendete Chemikalien.....	284
8.3	Fehlerdiskussion.....	285
9	Abkürzungsverzeichnis.....	288
10	Literaturverzeichnis.....	290

# 1 Einleitung und Problemstellung

Hydrogele, wasserquellbare polymere Netzwerke [1], haben in den vergangenen Jahren verschiedene Applikationsgebiete erschlossen [2]. Eine typische Verwendungsmöglichkeit ist beispielsweise der Superabsorber [3]. Hierbei handelt es sich meist um Polyacrylsäure oder Polyacrylcoacrylate die ein sehr hohes Wasseraufnahmevermögen besitzen.

Diese finden Einsatz in Babywindeln, Inkontinenzartikeln und Hygieneartikeln zur Flüssigkeitsaufnahme und Geruchsbindung [4]. Hydrogele werden als Wasserspeicher auf Golfplätzen und in ariden Gebieten, wo sie gespeichertes Wasser langsam an die Wurzeln abgeben, genutzt [5]. Weiterhin werden hydrophile Netzwerke in Elektroden- und Ultraschallgelen, Kosmetik- und Medizin-Produkten sowie in Kontaktlinsen verwendet [6] [7].

Des Weiteren ist es möglich hydrophile Polymermembranen herzustellen, die sich im allgemeinen durch die hohe Polarität insbesondere für Trennprozesse bei wässrigen Systemen eignen. Solche Membranen werden häufig in technischen Prozessen z.B. bei der Mehrwasserentsalzung (Umkehrosmose) eingesetzt. Aufgrund ihrer geringen Kosten gegenüber alternativen Trennverfahren (Rektifikation, Extraktion) haben sich solche Membrantrennverfahren als die dominierenden Verfahren durchgesetzt.

Hydrophile makromolekulare Netzwerke die in Form von Membranen hergestellt werden können, zeigen im allgemeinen folgende Eigenschaften gegenüber wässrigen Systemen:

---

[1] Tanaka T., Gels, Scientific American, Vol. 224, (1981), S. 110-123

[2] Dworschak M., Wunderpulver im Schrumpfpaket, Der Spiegel, Vol. 26, (2002), S. 178

[3] Brannon-Peppas L., Harland R.S., Absorbent Polymer Technology, in Studies in polymer science 8 (Eds. L. Brannon-Peppas, R. S. Harland) Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokio, (1990), S. 123-129

[4] DE 2706135, Verdickungsmittel für ausgeschiedenen Darminhalt und Harn, Barthell E., Schmidt O., (1978)

[5] Kulicke W.-M., Nottelmann H., Preparation, Characterization and Rheological Behavior of Waterswellable Polymer Networks, Polymers as rheology modifiers, ACS-Book Series, Vol. 462 (1991), S. 62

[6] Kulicke W.-M., Eidam D., Kath F., Kix M., Kull A., Hydrocolloids and Rheology: Regulation of Viscoelastic Characterization of Waxy Rice Starch in Mixture with galactomannans., Starch/Stärke, Vol. 48/3 (1996), S. 105-114

[7] von Homeyer A., Kulicke W.-M., Rheo-mechanische Untersuchungen der Netzwerkstruktur von Elektrodenkontaktgelen und HPLC-Methode zur Bestimmung des Restmonomergehalts, Angew. Makromol. Chemie, Vol. 256, (1998), S. 29-37

- Quellfähig (durch Lösungmittelaufnahme)
- hohes Permeationsvermögen gegenüber Wasserdampf
- Flüssigkeitstransport durch die Membran
- Gasdurchlässigkeit (z.B. O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)
- hohe Selektivität gegenüber voluminösen oder unpolaren Substanzen
- bei Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen (z.B. Cellulosederivate) kein Restmonomergehalt innerhalb der Membran.

Diese oben genannten Eigenschaftsprofile - die sich durch Verwendung unterschiedlicher Ausgangsverbindungen stark verändern können - machen hydrophile Membranen insbesondere für die Versorgung von Wunden interessant. Durch ein kontinuierliches „Feuchthalten“ des Wundgrundes kann die Wundheilung gegenüber der herkömmlichen Versorgung durch z.B. Baumwollbandagen beschleunigt werden. Dies ist als Prinzip der feuchten Wundheilung bekannt. Um dies zu erreichen müssen Membranen eingesetzt werden, die u.a. den Wundgrund vor dem Austrocknen schützen, aber auch einen ausreichenden Flüssigkeitstransport nach außen gewährleisten (näheres siehe Prinzip der Wundheilung Kapitel 2.8).

Der Bedarf an solchen hydrophilen Netzwerken ist sehr groß und insbesondere für Problemwunden wie z.B. chronische Wunden oder Brandwunden stehen bis heute keine geeigneten kommerziell erhältlichen Produkte zur Verfügung.

Patienten mit chronischen Wunden verursachten in Deutschland nach Angaben der gesetzlichen Krankenkassen, im Jahr 2001, mehr als 2 Millionen Arbeitsunfähigkeitstage. Die Kosten der Behandlung chronischer Wunden erreicht eine Größenordnung von etwa 2 % der jährlichen gesamteuropäischen Aufwendungen für Medizin und Gesundheitsdienste. 3.000 jährliche Frühverrentungen, 21.000 Extremitätenamputationen, 1,6 Millionen Krankenhaustage und 2,5 Millionen Patienten mit einem Ulcus cruris (Unterschenkelgeschwür) für Deutschland sind weitere Angaben [8] [9]. Patienten mit chronischen Wunden zeichnen sich durch einen deutlichen Verlust an Lebensqualität und einem hohen Leidensdruck aus. Der dadurch verursachte volkswirtschaftliche Schaden ist immens [10].

---

[8] Eggersdorfer M., Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in Energiewirtschaft und Chemie, Spektrum der Wissenschaft, (1999), S. 96-102

[9] Research, Das Bayer Forschungsmagazin, Vol. 11, (1999), S.8

[10] Levenson S.M., Wound Repair and Regeneration, Wound healing: a personal odyssey, Vol. 2. Issue 4 (1994), S.238-259

---

Die Behandlung schwer oder nicht heilender Wunden stellt seit jeher ein Problem dar, das bislang nicht befriedigend gelöst werden konnte. In der Vergangenheit wurde durch Aufbringen unterschiedlichster Substanzen und Stoffgemische versucht, die Wundheilung zu fördern. Die Bandbreite topischer Applikationen reichte von Blut, Serum oder Exkrementen über Schwefel, Pech oder Schwermetallsalze bis hin zu Milch, Zucker oder Honig. Neuartige Wirkstoffe zur topischen Wundbehandlung sind meist körpereigene Substanzen, von denen vermutet wird, dass sie in der chronischen Wunde nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden sind.

Des Weiteren stellen Brandverletzungen - insbesondere schwere großflächige Brandwunden - für den Mediziner eine Herausforderung in der Wundbehandlung dar, die bis jetzt nicht befriedigend gelöst werden konnte.

Nachteile der im Stand der Technik bekannten Wundauflagen sind unter anderem die unzureichende heilungsfördernde Wirkung bei Brandwunden, sowie die o.g. zum Teil gegenteiligen Effekte, die durch unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf Flüssigkeitsaufnahme oder Wasserdampfdurchlässigkeit der Wundauflagen erzielt werden.

Ein weiterer Nachteil besteht in dem hohen Zeitaufwand bei der postoperativen Blutstillung von Spalthautentnahmewunden, die nach dem Stand der Technik im aseptischen Operationssaal durch wechselseitig aufgelegte warme und kalte Umschläge erreicht werden.

Insbesondere bei Spalthautentnahmewunden zeigen kommerziell erhältliche Wundauflagen - die den Prinzip der feuchten Wundheilung folgen - kontraproduktive Effekte. So kommt es häufig zu einer Infektion der Wunde [11].

Hilfreich wäre es daher, Wundauflagen zur Verfügung zu stellen, die sich im besonderen Maße zur Einleitung bzw. Förderung der Heilung von Brandwunden mit unterschiedlichen Schweregraden, Spalthautentnahmewunden und Problemwunden d.h. chronische Wunden eignet.

Die bisher verwendeten Wundauflagen bestehen zum größten Teil aus synthetischen Polymeren (siehe Tabelle 1).

---

[11] Hospitation, Dr. Bisqua, Zentrum für Schwerbrandverletzte, Berufsgenossenschaftliches Krankenhaus Boberg, April 2004

<b>Folienverbände:</b> Biocclusive <sup>®</sup> , Cutfilm <sup>®</sup> , EpiView <sup>®</sup> , OpSite <sup>®</sup> , Tegaderm <sup>®</sup> , ...
<b>Schaumstoffe:</b> Allevyn Standart <sup>®</sup> , - Adhesive <sup>®</sup> , - cavity <sup>®</sup> , Biotain <sup>®</sup> , Mepilex <sup>®</sup> , Cutinova cavity <sup>®</sup> , ...
<b>Hydrokolloide:</b> Algoplaque <sup>®</sup> , Combiderm <sup>®</sup> , Comfeel plus <sup>®</sup> , Cutinova hydro <sup>®</sup> , Variekesive E <sup>®</sup> , Askina transparent <sup>®</sup> , Tegasorb Thin <sup>®</sup> , Urgotül <sup>®</sup> , ...
<b>Alginate:</b> Algiste M <sup>®</sup> , Comfeel <sup>®</sup> , Algosteril <sup>®</sup> , Melgisorb <sup>®</sup> , Sorbsan <sup>®</sup> , Tegagen <sup>®</sup> , ...
<b>Hydrogele:</b> Intrasite Gel <sup>®</sup> , Norml Gel <sup>®</sup> , Nu Gel <sup>®</sup> , PurilonGel <sup>®</sup> , Tegagel <sup>®</sup> , Varirkesive Hydrogel <sup>®</sup> , ..
<b>Kohleverbände:</b> Actisorb Plus <sup>®</sup> , Carboflex <sup>®</sup> , Vliwativ <sup>®</sup> , ...
<b>Klassische Mittel:</b> Schlauchverbände, Vliespflaster, elastische Netzverbände, Kurzzugbinden, Langzugbinden, Kompressionsstrümpfe, ...

*Tabelle 1: Übersicht kommerzieller Wundauflagen*

Alle aufgeführten Wundauflagen verfolgen ausschließlich das Prinzip der feuchten Wundbehandlung, d.h. die Wunde wird vor pathogenen Keimen und vor dem Austrocknen geschützt. Die Auflage wirkt hierbei rein physikalisch [12]. Es gibt seit 2004 eine kommerziell erhältliche Wundauflage (Suprasorb C, Promogran), die zusätzlich in die Wundheilung eingreift. Diese Wundauflagen immobilisieren unselektiv Proteasen aus dem Wundmilieu.

Der größte Teil der bereits verwendeten Wundauflagen besteht aus synthetischen Polymeren auf Basis von Polyurethan (z.B. Wundpflaster Cutinova von Beiersdorf). Hierbei werden z.T. Superabsorber in die synthetischen Auflagen eingebaut um die Aufnahmefähigkeit gegenüber Wundflüssigkeit zu erhöhen. Bei synthetischen Polymeren tritt naturgemäß ein geringer Restmonomergehalt auf, der in die Wunde gelangen kann. Bei den meisten dieser hoch reaktiven Verbindungen handelt es sich um cancerogene Verbindungen die naturgemäß auch in kleinen Konzentrationen nicht in die Wunde entlassen werden sollten.

Die modernen Wundauflagen, die dem Prinzip der feuchten Wundheilung folgen, zeigen

[12] Gretener S.B., Siebenthal D. von, Huber T., Rüede P., Die Lokalthherapie chronischer Wunden: Auswahlhilfe moderner Wundauflagen, Schweizer med. Forum, (8), 2001, S.10-18.

---

meist keine Vorteile bei der Versorgung chronischer Wunden gegenüber der klassischen Wundversorgung. Meist werden erst Heilungserfolge durch zusätzliche Therapiemaßnahmen, wie die Gabe von Medikamenten erreicht. Es handelt sich bei den meisten Wundauflagen nicht um Membranen mit einer definierten Porengrößenverteilung. Diese Wundauflagen sind meist mäßig permeabel für Gase. Die Wundflüssigkeit wird jedoch meist nicht durch die Membran nach außen abgeführt, sondern in das Auflagenmaterial aufgenommen. Hierdurch wird ein häufiger Wechsel notwendig.

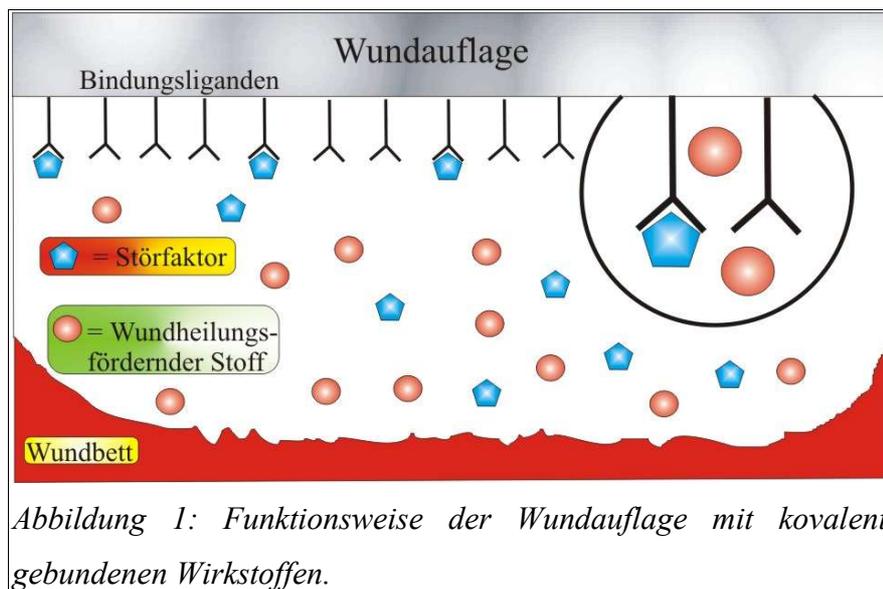
Ziel ist es, aktive alternative Wundauflagen, basierend auf dem Prinzip der feuchten Wundheilung, zu entwickeln, welche die Heilung chronischer Wunden oder Brandwunden gezielt fördern.

Hierzu sollen neuartige hydrophile Netzwerke (Symplex-, Chitosanmembran und Bakteriencellulose) auf Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt werden, die elastisch und formbar sind und eine ausreichende Festigkeit aufweisen. Des Weiteren müssen solche Substanzen eine gute Hautverträglichkeit sowie eine definierte Porengrößenverteilung aufweisen.

Im einem weiterführenden Teil eines Forschungsprojekts in Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ), ist die kovalente Anknüpfung von pharmakologisch wirksamen Stoffen an die Oberfläche von diesen Membranen durch eine Diels-Alder-Reaktion vorgesehen, so dass diese Substanzen nicht in die Wunde gelangen. Verfahrensgrundlagen zur Einfügung von kovalent gebundenen, pharmakologisch wirksamen Wirkstoffen sind im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wießler im DKFZ vorhanden [13]. So können Wirkstoffe jeglicher Struktur, sofern sie eine dienophil- oder dien-fähige Gruppe tragen, von der eine heilungsfördernde Wirkung erwartet wird, auf der Wundaufgabe verankert werden. Hierdurch sollen die Störfaktoren der Wundflüssigkeit insbesondere bei chronischen Wunden selektiv abgefangen und die wundheilungsfördernden Stoffe unbeeinflusst gelassen werden (siehe Abbildung 1).

---

[13] DP 10041221.1, Wießler M., Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher Sacharidkonjugaten und Sacharidmimetika durch Diels-Alder-Reaktion und ihre Verwendung als Therapeutika oder Diagnostika, (2000)



Ansatzmöglichkeiten wären z.B. das Abfangen bzw. Komplexieren von Fe-Ionen, Radikalen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Proteasen [14].

Der Vorteil einer solchen Diels-Alder-Reaktion ist, dass sie bei moderaten Temperaturen und Wasser als Lösungsmittel eine kovalente C-C Verknüpfung ausbilden. Im Idealfall ist die Diels-Alder-Reaktion hinsichtlich ihrer Reaktivität unabhängig von den verwendeten medizinischen Wirkstoffen an dem Maleinimidderivat. Das bedeutet, dass nicht für jeden denkbaren Wirkstoff eine gesonderte Synthese entwickelt werden muss, sondern nur das Maleinimidderivat modifiziert werden muss, da die eigentliche Anbindung an die Membran über die Diels-Alder-Reaktion erfolgt.

Das Wirkprinzip der Wundauflagen soll dabei rein physikalischer Natur sein, d.h. die aktiven Gruppen sollen irreversibel auf der Hydrogelmatrix verbleiben. Durch die kovalente Bindung der pharmakologisch wirksamen Substanzen an eine Wundauflage, können diese nicht an den Organismus abgegeben werden und gelten nach den aktuellen Zulassungsbestimmungen nicht als Arzneimittel. Dies ermöglicht den Einsatz der Produkte in der Klasse, der nicht von der Arzneimittel-Zulassung betroffenen „Medizinprodukte“. Eine mit kovalent gebundenen Wirkstoffen versehene Wundauflage wird innerhalb der Europäischen Union mindestens als ein Medizinprodukt der Klasse IIb eingestuft.

[14] DE 19813663.3, Beiersdorf AG, Wundauflagen zur Entfernung von Störauflagen aus Wundflüssigkeit, (1999)

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Molmasse, Knäuelgröße sowie deren Verteilungen

Polymere entstehen synthesebedingt nur in Form einer Molmassenverteilung. Eines der wenigen Polymeren das eine monomodale Molmassenverteilung aufweist ist die Desoxyribonukleinsäure und biochemisch erzeugte Polymere. Auf dem Gebiet der makromolekularen Chemie ist die Kenntnis der Molmasse eines Polymeres von großer Bedeutung, da hierdurch die Materialeigenschaften entscheidend bestimmt werden. Bei den meisten technischen Polymer-Reaktionen ergibt sich eine Molmassenverteilung, die mit der Schulz-Flory-Verteilung beschrieben werden kann (siehe Abbildung 2).

Zur Charakterisierung von Makromolekülen werden häufig Molmassenmittelwerte angegeben. Diese unterscheiden sich in ihrem Wert je nach der Bestimmungsmethode, die zur Charakterisierung des Polymers angewandt wird. Die Uneinheitlichkeit der Kettenlänge von Polymeren lässt sich anhand der Molmassenverteilung beschreiben, welche in den meisten Fällen asymmetrisch ist [15].

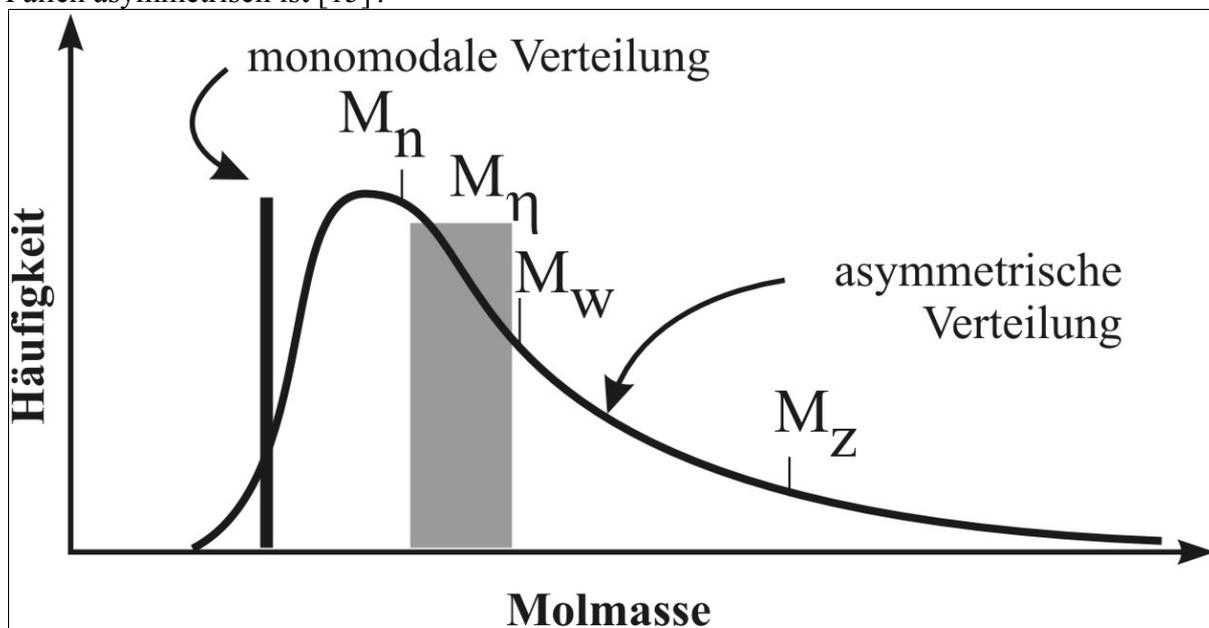


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Molmasse und der Molmassenverteilung von einer monomodalen Verteilung und einer asymmetrischen Verteilung einer polydispersen Substanz mit Lage der Molmassenmittelwerte.

[15] Kratochvil P., Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Jenkins, A. D. (Hrsg.), Polymer Science Library Ed.5, Elsevier, (1987), S. 58-67

Die Molmassenmittelwerte lassen sich je nach Bestimmungsmethode als Zahlenmittel  $M_n$ , Gewichtsmittel  $M_w$  und z-statistisches Mittel (auch Zentrifugenmittel genannt)  $M_z$  angeben. Die Beträge dieser Größen nehmen in dieser Reihenfolge zu. Die einzelnen Molmassenmittelwerte  $M_\beta$  ergeben sich mit der Häufigkeit  $n_i$  der Molmasse  $M_i$  nach Gleichung 1 zu:

$$M_\beta = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \cdot M_i^{\beta+1}}{\sum_{i=1}^k n_i \cdot M_i^\beta}$$

*Gleichung 1*

$\beta = 0 : M_n$  Zahlenmittel  
 $\beta = 1 : M_w$  Gewichtsmittel  
 $\beta = 2 : M_z$  Zentrifugenmittel

Das Viskositätsmittel  $M_\eta$  variiert in seinem Mittelwert in Abhängigkeit vom Exponenten  $a$  der Mark-Houwink-Beziehung und kann Werte zwischen  $M_n$  und  $M_w$  annehmen.

Zur Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung der Ausgangssubstanzen werden verschiedene Methoden herangezogen. Das Zahlenmittel  $M_n$ , das beispielsweise mittels Osmometrie oder Endgruppenbestimmung zugänglich ist, berücksichtigt insbesondere die kurzkettigen Moleküle der Verteilung. Demgegenüber gehen die hochmolekularen Anteile beim Gewichtsmittel  $M_w$ , welches sich u.a. aus Lichtstreuungsmessungen ermitteln lässt, und beim z-statistischen Mittel  $M_z$ , das durch Ultrazentrifugation bestimmbar ist, wesentlich stärker in die Molmassen ein. Durch den Quotienten des Gewichtsmittel mit dem Zahlenmittel erhält man ein Maß für die molekulare Verteilungsbreite  $M_w/M_n$  der betreffenden Polymeren. Die ebenfalls oft verwendete Uneinheitlichkeit ergibt sich aus dem Quotienten von Gewichts- und Zahlenmittel minus eins ( $M_w/M_n - 1$ ). Ist der Quotient, d.h. die Polydispersität eins, liegt keine Verteilung vor und die Probe ist monodispers.

Die Bestimmung der Molmasse kann mit verschiedenen Verfahren erfolgen. Es werden hierbei unabhängig vom verwendeten Gerät drei Methoden unterschieden: Relativ-, Äquivalent- und Absolutmethoden.

Relativmethoden benötigen Kalibrierbeziehungen, mit deren Hilfe von einer bekannten Substanz auf die Molmasse der Probe geschlossen werden kann. Gemessen werden physikalische Eigenschaften, welche die Molmasse indirekt beeinflussen. Dabei werden verschiedene Voraussetzungen gemacht, wie etwa sehr ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften von Kalibrier- und Probensubstanz. Die Größenausschlußchromatographie

stellt für sich genommen eine Relativmethode zur Bestimmung der Molmasse dar, ebenso die Viskosimetrie.

Äquivalentmethoden, wie beispielsweise die Endgruppenbestimmung, setzen die Kenntnis der chemischen Struktur voraus.

Im Falle der Absolutmethoden müssen keine Annahmen über die zu untersuchende Substanz gemacht werden. Die gewünschten Werte lassen sich aus den Messgrößen direkt berechnen. Zu den Absolutmethoden zählen die Membranosmometrie, die Lichtstreuung und die Ultrazentrifugation. Die nachfolgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Verfahren zur Molmassenbestimmung und den sich hieraus ergebenden Molmassenwerten.

Methoden	Bestimmungsart	Molmassenmittelwerte
Relativmethode	Viskosimetrie	$M_{\eta}$
	Größenausschlusschromatographie	$M_{SEC}$
Äquivalentmethode	Endgruppenbestimmung	$M_n$
Absolutmethode	Osmometrie	$M_n$
	Streulichtmessung	$M_w$
	Ultrazentrifugation	$M_z$

Tabelle 2: Methoden zur Molmassenbestimmung mit den Molmassenmittelwerten

### 2.1.1 Viskosimetrie

Bei der Viskosimetrie handelt es sich um eine Relativmethode. Für das zu untersuchende System muss vorher mit einer Absolutmethode z.B. statistischer Lichtstreuung die Konstanten der Mark-Houwink- Beziehung bestimmt werden. Der Vorteil der Viskosimetrie liegt in der schnellen und einfachen Durchführung der Messung für bekannte Systeme. Als Ergebnis der viskosimetrischen Messungen erhält man Viskositäten, aus denen sich der Staudinger-Index  $[\eta]$ , eine für das jeweilige Polymer-Lösungsmittel-System charakteristische Größe, ermitteln lässt. Mit Hilfe der Mark-Houwink-Beziehung kann aus dem Staudinger-Index die Molmasse des untersuchten Polymers berechnet werden [16].

Linear aufgebaute Polymere, nehmen in verdünnten Lösungen die Form eines statistischen Knäuels ein.

[16] C. Clasen, W.-M. Kulicke, Viskosimetrie of Polymers and Polyelektrolytes, Springer Verlag, Heidelberg, (2004)

Gegenüber dem reinen Lösungsmittel wird die Viskosität einer Polymerlösung durch die innere Reibung der Polymerknäuel erhöht. Dieser Viskositätsanstieg wird durch die relative Viskosität  $\eta_{rel}$  beschrieben.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{Lsg}}{\eta_{Lömi}} = 2,5 \cdot \Phi + 1$$

Gleichung 2

$$\Phi = \frac{V_{gel. Makromolekül}}{V_{Lösung}} = \frac{m}{V \cdot \rho} = \frac{c}{\rho}$$

Gleichung 3

$\Phi$  = Volumenanteil der Polymerknäuel,  $m$  = Masse des Polymerfadens,  $\rho$  = Dichte der leeren Polymerknäuel ohne Lösungsmittel,  $m/V$  = Polymermasse pro Volumenelement,  $c$  = Polymerkonzentration (Masse/Volumen)

Die Gleichung 2 und Gleichung 3 geben eine Näherung wieder die Einstein für dispergierte Vollkugeln ermittelte.

Die spezifische Viskosität ist mit der relativen Viskosität folgendermaßen verknüpft:

$$\eta_{spez} = \eta_{rel} - 1$$

Gleichung 4

Diese Gleichungen gelten nur, wenn sich die gelösten Teilchen gegenseitig nicht behindern ( $c = 0$ ). Zusätzlich ist die Viskosität oftmals von der Schergeschwindigkeit  $[g]$  abhängig, deshalb gelten die Gleichungen streng genommen nur für sehr kleine Schergeschwindigkeiten ( $g \rightarrow 0$ ). Dieser Grenzwert wird als Staudinger-Index bezeichnet:

$$\lim_{c \rightarrow 0, \dot{\gamma} \rightarrow 0} = \frac{\eta_{spez}}{c} = [\eta]$$

Gleichung 5

Die Schergeschwindigkeit  $g$  hängt nach dem Newtonschen Gesetz für laminare Strömungen von der Schubspannung  $\sigma_{12}$  folgendermaßen ab:

$$\sigma_{12} = \frac{h \cdot g \cdot R \cdot \rho_{Lösung}}{2} l = \eta \cdot g_{max}$$

Gleichung 6

Im Bereich kleiner Konzentrationen besteht in der Regel ein linearer Zusammenhang zwischen  $\eta_{spez}/c$  und  $c$ . Die Steigung lässt sich in vielen Fällen durch eine von Huggins oder Schulz-Blaschke theoretisch abgeleitete Potenzreihe beschreiben:

$$\frac{\eta_{spez}}{c} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot c \quad \text{Gleichung 7 Huggins}$$

$$\frac{\eta_{spez}}{c} = [\eta] + k_{SB} \cdot [\eta] \cdot \eta_{spez} \quad \text{Gleichung 8 Schulz-Blaschke}$$

Diese Gleichungen gestatten, bei Kenntnis der Konstanten  $k_H$  bzw.  $k_{SB}$ , die Bestimmung des Staudinger-Index aus einer einzigen Messung.

Aus dem Staudinger-Index kann mit der Mark-Houwink-Beziehung die Molmasse des gelösten Polymeres bestimmt werden:

$$[\eta] = K_\eta \cdot M^a \quad \text{Gleichung 9}$$

Weder die Zahlenwerte der Konstanten  $K_\eta$  noch die des Exponenten  $a$  lassen sich theoretisch ableiten, sie müssen experimentell bestimmt werden. Hierzu bietet sich z.B. die Lichtstreuung insbesondere in Kombination mit der Größenausschußchromatographie oder der Feld-Fluss Fraktionierung als Trennmethode an. Zur sicheren Bestimmung der Molmasse und deren Verteilungen muss bei unbekanntem Polymeren, die Konzentration jeder Fraktion mit einem Konzentrationsdetektor (z.B. Brechungsindex-Inkrement) bestimmt werden. Hierbei müssen unterschiedliche gewichtsmittlere Molmassen eines chemisch identischen Polymers mit gleicher Molmassenverteilung in Korrelation gesetzt werden. Zum Erzeugen chemisch identischer Polymere unterschiedlicher Molmasse bietet sich insbesondere das Eintragen von Ultraschallenergie in eine Polymerlösung an.

Mit Hilfe des ermittelten Staudinger-Index lassen sich, wie in den folgenden Formeln aufgeführt, die Knäueldimensionen berechnen:

$$\rho_{\ddot{a}qu} = \frac{2,5}{\eta} = \frac{m}{V} = \frac{6 \cdot M}{N_L \cdot \pi \cdot d_{\ddot{a}qu}^3}$$

$$\text{Gleichung 10 Knäuel-dichte [g/cm}^3\text{]}$$

$$d_{\text{äqu}} = \left( \frac{6 \cdot M \cdot [\eta]}{2,5 \cdot \pi \cdot N_L} \right)^{1/3}$$

Gleichung 11 Knäueldurchmesser [cm]

$$V_{\text{Knäuel}} = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d_{\text{äqu}}^3$$

Gleichung 12 Knäuelvolumen [cm<sup>3</sup>]

$$c^*_{[\eta]} = \rho_{\text{äqu}} \cdot 100$$

Gleichung 13

Gleichung 13 gibt die viskosimetrisch ermittelte kritische Polymerkonzentration  $c^*_{[\eta]}$  [%] an. Ist diese 100 %, ist das gesamte Lösungsmittel mit Polymerknäulen ausgefüllt. Oberhalb der kritischen Konzentration berühren sich die Makromoleküle. Die kritische Polymerkonzentration kann auch durch Lichtstremessungen bestimmt werden  $c^*_{\text{LS}}$ . Da die aus viskosimetrischen Messungen (basierend auf dem EINSTEIN'schen Gesetz) ermittelte kritische Polymerkonzentration modellbehafet ist, stimmt diese meist nicht mit den Ergebnissen der Lichtstremessungen überein. Es hat sich in zahlreichen Fällen gezeigt, dass die kritische Konzentration aus viskosimetrischen Messungen etwa um den Faktor 10 über den aus Lichtstremessungen bestimmten Konzentrationen liegt.

### 2.1.2 Lichtstreuung

Bei der Lichtstreuung handelt es sich um eine von mehreren Wechselwirkungen von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Im täglichen Leben ist sie u.a. als das Phänomen des blauen Himmels bekannt. Dabei wird kurzwelliges, blaues Licht stärker gestreut als der übrige Bereich des sichtbaren Lichtes und lässt den Himmel blau erscheinen. Am Morgen und Abend tritt durch die größere Entfernung zwischen zurückgelegter Wegstrecke des Lichtes in

der Atmosphäre und dem Beobachter die Streuung des Lichtes höherer Wellenlänge, das Morgen bzw. Abendrot in den Vordergrund. Diese Naturereignisse sind allerdings nur sichtbar, da die Atmosphäre kleine Teilchen, z.B. sogenannte Streuzentren, enthält. Ohne diese wäre der Himmel schwarz, wie es z.B. bei Planeten ohne Atmosphäre oder dem Mond der Fall ist. Ein weiteres Beispiel sind glitzernde Staubteilchen im Sonnenlicht. Dabei ist das zu beobachtende Glitzern auf die Streuung des Lichtes an den Staubteilchen zurückzuführen (Tyndall-Effekt). Hierbei wird die Energie der Strahlung nicht von der Materie aufgenommen, wie es bei der Absorption der Fall ist, sondern er wird von seiner ursprünglichen Richtung abgelenkt (Streuung).

Die Lichtstreuung ist eine der wenigen Absolutmethoden zur Bestimmung von Molmassen und Teilchendimensionen, die die Messung über einen weiten Größenbereich zulässt. Die Grundzüge der Theorie lassen sich auf Arbeiten von Rayleigh [17], Smoluchowski und Einstein [18], zurückführen, welche die Streustrahlung kleiner Teilchen behandeln. Für die Polymeranalytik wurde die Methode durch die Arbeiten von Raman [19], Debye [20], und Zimm [21], die sich mit der theoretischen Beschreibung der Streuphänomene gelöster Polymere und Suspensionen auseinandersetzen, nutzbar gemacht.

Streulichtmessungen (LS) werden seit ungefähr 20 Jahren verstärkt in der Polymeranalytik eingesetzt. Die Lichtstreuung hat auf dem Gebiet der Polymeranalytik, insbesondere an verdünnten Polymerlösungen, große Bedeutung. Sie ist eine - streng theoretisch ableitbare - Absolutmethode zur Ermittlung der Molmasse, wobei Massen im Bereich von  $10^3$  bis  $10^9$  g/mol bestimmbar sind [22]. Einer der wichtigsten Gründe hierfür ist, dass die gemessene Streustrahlung nur eine Funktion der Molmassen und der Gyrationradien ist. Neben der Erfassung der Moleküldimensionen (im Bereich von  $\sim 10$  bis 500 nm) ohne Kenntnis der Molekülform ermöglicht sie darüber hinaus auch die Bestimmung des zweiten Virialkoeffizienten  $A_2$ . Dieser beschreibt die Wechselwirkungen des Polymers mit dem Lösungsmittel.

Es sind keine Vorkenntnisse über die chemische und sterische Struktur erforderlich. Im

---

[17] Rayleigh J., Strutt, J. W., On James Bernoulli's theorem in probabilities, Philosophical Magazine, Vol 47/5, (1899), S. 246-251

[18] Smoluchowski, Ann. Phys. **25**, (1908), S. 205

[19] Raman C.V., A new radiation, Indian J. Phys., 2, (1927), S.387

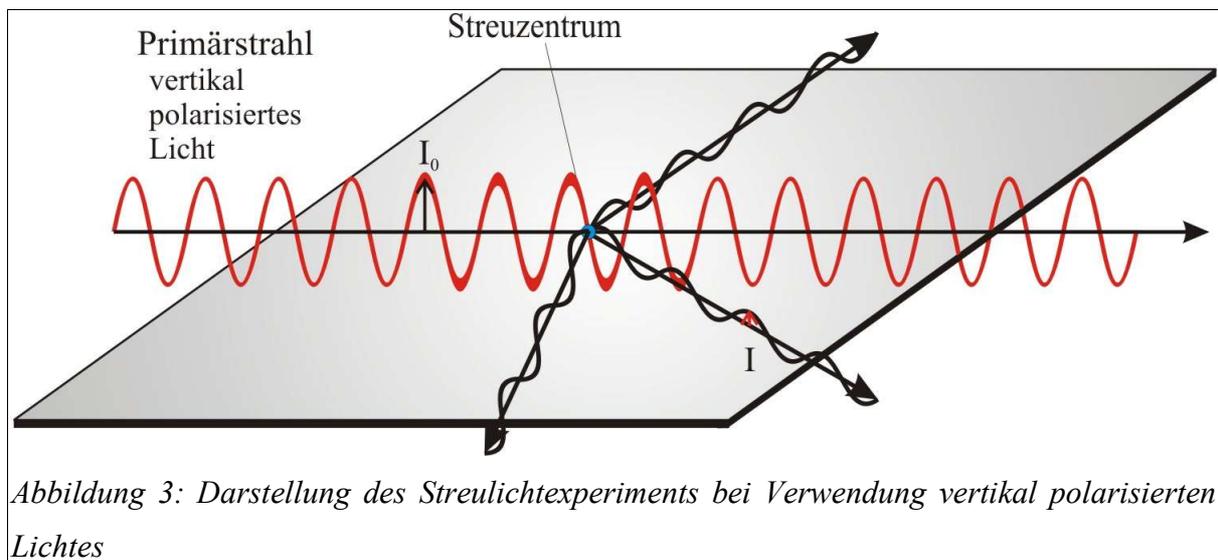
[20] Debye P., Light Scattering in Solutions, J.Appl. Phys., Vol. 15, (1944), S.338-342

[21] Zimm B.H., J. Chem. Phys., 13, (1945), S.141

[22] Wyatt Technology, Produktbroschüre zum DAWN EOS, (1999)

Gegensatz dazu ist bei den relativen Messmethoden (z.B. Viskosimetrie) ein vorheriges Kalibrieren mit Modellsubstanzen erforderlich. Da insbesondere bei Polymeren kaum Modellsubstanzen verfügbar sind, liefern diese Methoden bei solchen Polymeren oftmals keine richtigen Ergebnisse.

Das Prinzip aller Streumethoden beruht auf der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Das elektrische Feld der vertikal zur Beobachtungsebene polarisierten Welle bewirkt eine Ladungsverschiebung und induziert damit ein Dipolmoment. Da sich das elektromagnetische Erregerfeld mit der Zeit periodisch ändert, wird das Dipolmoment zu einer Schwingung gezwungen. Die beschleunigte bewegte Ladung, als die der oszillierende Dipol angesehen werden kann, emittiert nach den Vorstellungen der klassischen Elektrodynamik eine Streustrahlung. Diese Streustrahlung ist das Streulicht, dessen Intensität bei der klassischen Lichtstreuung gemessen wird. Die Intensität des Streulichtes beträgt dabei nur das  $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6}$  fache der Intensität des Primärlichtes (siehe Abbildung 3).



Die Lichtstreuung lässt sich in verschiedene Bereiche untergliedern [23].

Das Verhältnis des Teilchendurchmessers  $d$  zur Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichtes führt zu unterschiedlichen Streubildern. Man unterscheidet daher drei Fälle:

1. Rayleigh-Streuung mit  $d < \lambda/20$
2. Debye-Streuung mit  $\lambda/20 < d < \lambda$
3. Mie-Streuung mit  $\lambda < d$ .

[23] Kratochvil P., Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Elsevier, New York, 1987, S. 48-93

Aufgrund der Bedeutung für diese Arbeit werden die Rayleigh- und Debye-Streuung im folgenden ausführlicher beschrieben.

### Rayleigh-Streuung

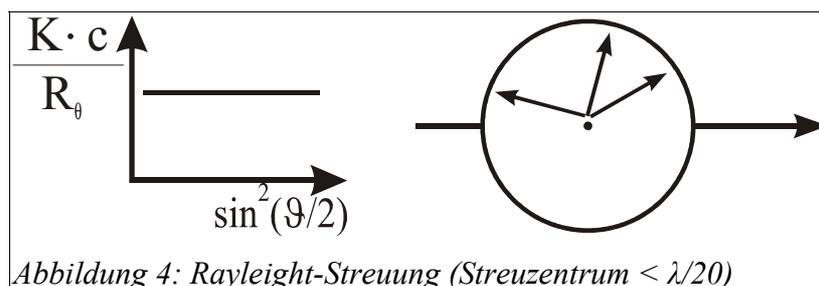
Rayleigh untersuchte Gase, bei denen die Durchmesser der wechselwirkenden Moleküle klein im Verhältnis zur Wellenlänge des eingestrahlt Lichts sind. Bei Teilchen mit einem Durchmesser  $d$ , der kleiner als  $\lambda/20$  der Wellenlänge  $\lambda$  des Primärstrahles ist, wirkt jedes Teilchen als genau ein Streuzentrum. Trifft unter diesen Bedingungen ein vertikal polarisierter Lichtstrahl das Teilchen, so wird ein oszillierender Dipol induziert, von dem die Sekundärstrahlung mit gleicher Wellenlänge, also gleicher Frequenz und Energie wie der Ausgangsstrahl ausgesendet wird.

Die Intensität der Streuung  $I_{\vartheta}$  im Abstand  $r$  vom Detektor unter dem Winkel  $\vartheta$  hängt von der Intensität  $I_0$  und der Wellenlänge  $\lambda_0$  des Primärstrahles und der Polarisierbarkeit  $\alpha$  des streuenden Teilchen ab. In Gleichung 14 sind diese Abhängigkeiten dargestellt.

$$I_{\vartheta} = \frac{I_0 \cdot 16 \cdot \pi^4 \cdot \alpha^2}{\lambda_0^4 \cot^2 r^2} \cdot \left( \frac{1 + \cos^2 \vartheta}{2} \right)$$

Gleichung 14

Bei der sog. Rayleigh-Streuung tritt nur isotrope Streuung auf, d.h. die Intensität der Streustrahlung ist bei Verwendung von vertikal polarisiertem Licht in der horizontalen Ebene unter allen Beobachtungswinkeln gleich und direkt proportional der Konzentration  $c$  und der Molmassen  $M$  der Teilchen. Es tritt daher eine kugelsymmetrische Streustrahlung auf (siehe Abbildung 4). Hierzu müssen die Partikel oder Polymerknäule kleiner als ein zwanzigstel der Wellenlänge des Primärlichtes sein.



Hierdurch kann der winkelabhängige Term aus Gleichung 14 gleich eins gesetzt werden und die Gleichung 14 vereinfacht sich zu Gleichung 15:

$$I_g = \frac{I_0 \cdot 16 \cdot \pi^4 \cdot \alpha^2}{\lambda_0^4 \cot^2 r^2}$$

Gleichung 15

Die Streuintensität ist demnach nur von der Polarisierbarkeit der Teilchen abhängig. Diese ist wiederum über die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  mit dem Brechungsindex  $n$  der Polymerlösung verknüpft und lässt sich unter Berücksichtigung von  $\epsilon = n^2$  wie folgt darstellen.

$$\alpha = \frac{n_0}{2\pi} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right) \cdot \frac{c \cdot V_s}{N}$$

Gleichung 16

( $dn/dc$ : Brechungsindexinkrement,  $V_s$ : Streuvolumen,  $N$ : Avogadro-Zahl,  $n_0$ : Brechungsindex des Lösungsmittel).

Wird für  $\alpha$  in Gleichung 15 das Ergebnis aus Gleichung 16 eingesetzt folgt für die Streuintensität einer verdünnten Lösung.

$$I_g = \frac{I_0 \cdot V_s \cdot n_0^2 \cdot 4\pi^2}{r^2 \cdot N_A \cdot \lambda_0^4} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \cdot c \cdot M$$

Gleichung 17

Die so erhaltene Streuintensität  $I_g$  ist von den Gerätekonstanten abhängig. Um eine Unabhängigkeit vom Messaufbau zu erreichen, wird die Streulichtintensität  $I_g$  pro detektiertes Streuvolumen  $V_s$  mit dem Abstandquadrat  $r^2$  (vom Detektor) multipliziert und auf die Primärlichtintensität  $I_0$  bezogen. Die erhaltene Größe wird als Exzeß-Rayleigh-Verhältnis  $R_g$  bezeichnet. Hierbei bedeutet  $M$  in Gleichung 17 eine noch nicht näher spezifizierte Molmasse.

$$R_g = \frac{I_g}{I_0} \cdot \frac{r^2}{V_s}$$

Gleichung 18

Zur Vereinfachung des Ausdrucks werden die Konstanten aus Gleichung 18 in der sogenannten optischen Konstanten  $K$  zusammengefasst.

$$K = \frac{n_0^2 \cdot 4 \pi^2}{N_A \cdot \lambda_0^4} \cdot \left( \frac{dn}{dc} \right)^2$$

Gleichung 19

Somit vereinfacht sich Gleichung 18 unter Verwendung der optischen Konstante  $K$  (Gleichung 19) zu dem Ausdruck in Gleichung 20.

$$I_9 = I_0 \cdot \frac{V_s}{r^2} \cdot K \cdot c \cdot M$$

Gleichung 20

Setzt man das Exzeß-Rayleigh-Verhältnis aus Gleichung 18 in Gleichung 20 ein, erhält man streng genommen für eine unendliche Verdünnung isotroper Streuer, in der Praxis jedoch auch in guter Näherung für kleine Konzentrationen  $c$ , die allgemeine Lichtstreu-Gleichung.

$$\frac{K \cdot c}{R_9} = \frac{1}{M}$$

Gleichung 21

Im Bereich größerer Konzentration können inter- und intramolekulare Wechselwirkungen auftreten, so dass die Streuintensität nicht mehr direkt proportional zur Konzentration der gelösten Moleküle ist, sondern über eine Potenzreihe beschrieben werden muss (siehe Gleichung 22).

$$\frac{K \cdot c}{R_9} = \frac{1}{M_w} + 2 \cdot A_2 \cdot c + \dots$$

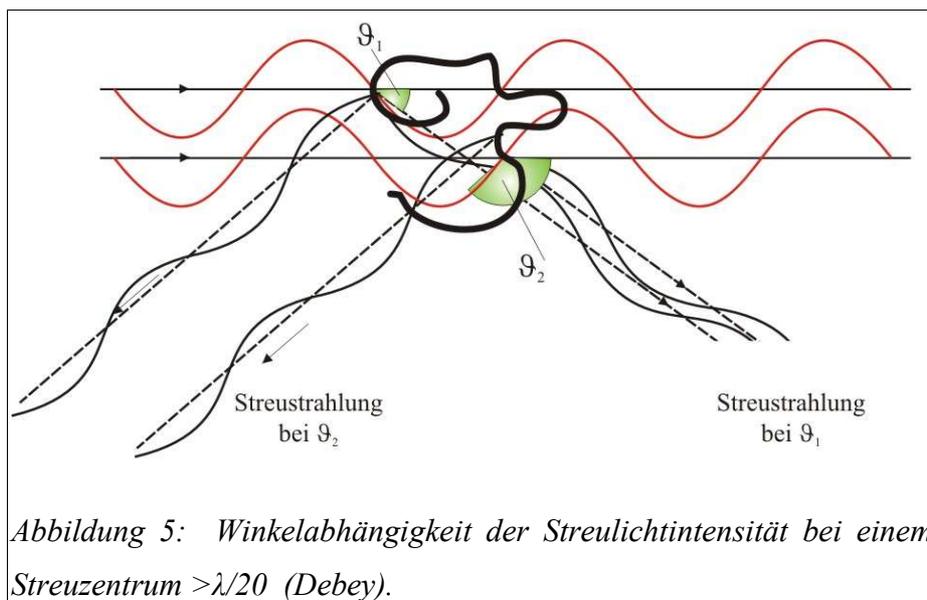
Gleichung 22

Die gewichtsmittlere Molmasse lässt sich hierbei durch Auftragung von  $K \cdot c / R_9$  gegen  $c$  durch eine Extrapolation auf  $c = 0$  aus dem Ordinatenabschnitt ermitteln. Die Steigung der Geraden entspricht  $2 \cdot A_2$ . Der zweite Virialkoeffizient  $A_2$  ist ein Maß für die

thermodynamische Güte eines Lösungsmittels, d.h. er beschreibt die Wechselwirkungen des Polymers mit dem Lösungsmittel.

### Debye-Streuung

Für Teilchen mit einem Durchmesser  $d > \lambda/20$  besteht auch für vertikal polarisiertes Licht eine Winkelabhängigkeit der Streuintensität  $I_\vartheta$ . Diese größeren Teilchen weisen im Gegensatz zu den kleinen isotropen Streuern, die nur ein Streuzentrum pro Molekül aufweisen, mehrere Streuzentren pro Molekül auf. Dabei weisen die in einem Molekül an unterschiedlichen Streuzentren gestreuten Wellen einen Gangunterschied auf, der proportional zu  $\cos \vartheta$  ist (siehe Abbildung 5).



Bei größeren Teilchen wird zunehmend intramolekulare Interferenz beobachtet, d.h. die Streustrahlung wird in Abhängigkeit vom Beobachtungswinkel  $\vartheta$  mit dem Faktor  $P(\vartheta)$  abgeschwächt (siehe Abbildung 6). Dieser Bereich, die Debye-Streuung erstreckt sich bis zum ersten Interferenzminimum bzw. bis die Dimension der Teilchen in die Größenordnung des eingestrahnten Lichtes kommt.

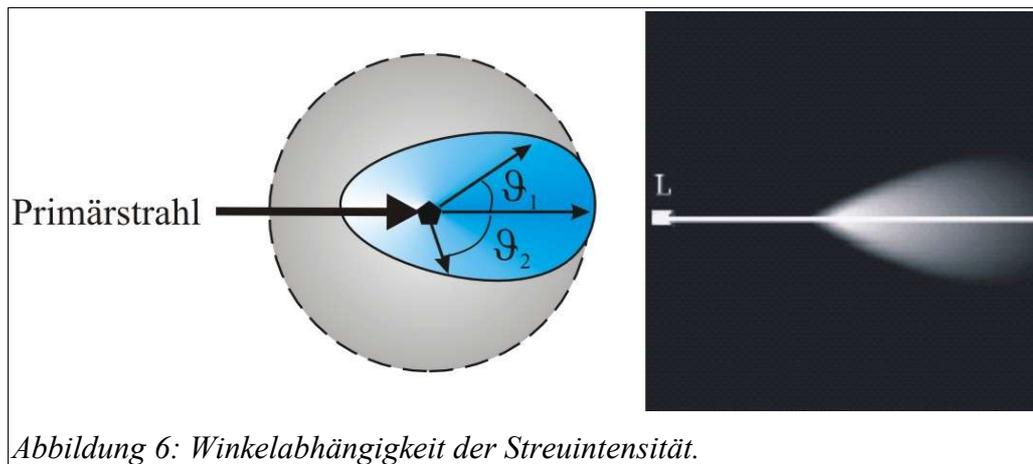


Abbildung 6: Winkelabhängigkeit der Streuintensität.

Diese Abschwächung der Streustrahlung wird durch die Streufunktion  $P_{(\vartheta)}$  ausgedrückt. Es gilt  $P_{(\vartheta)} = 1$  für  $\vartheta = 0^\circ$ . Die Streufunktion gibt das Verhältnis der Streuintensität  $R_{\vartheta}$  zur Streuintensität  $R_{0^\circ}$  an.

$$P_{(\vartheta)} = \frac{R_{\vartheta}}{R_{0^\circ}}$$

Gleichung 23

Nach Debye ist die Streufunktion  $P_{(\vartheta)}$ , neben dem Streuwinkel auch von der Größe und der Geometrie des Moleküls abhängig. Hierbei wird insbesondere der Abstand zweier Streuzentren  $r_{ij}$  berücksichtigt. Für die Streufunktion gilt unabhängig von der Molekülform unter Berücksichtigung der Anzahl der Streuzentren  $N$  (siehe Gleichung 24).

$$P_{\vartheta} = \frac{1}{N^2} \cdot \sum_i \sum_j \sin \frac{(q \cdot r_{ij})}{q \cdot r_{ij}}$$

Gleichung 24

In die Gleichung 24 geht der Abstand  $r_{ij}$  der verschiedenen Streuzentren eines Makromoleküls und der Streuvektor  $q$  ein, der die Winkelabhängigkeit der Partikelstrefunktion beschreibt. Im Fall kleiner  $q r_{ij}$  kann unabhängig von der Teilchenform durch eine Reihenentwicklung nach Gleichung 25 die reziproke Form für  $P_{(\vartheta)}$  abgeleitet werden.

$$\frac{1}{P_{(\vartheta)}} = 1 + \frac{1}{3} \cdot q^2 \cdot \langle R_G^2 \rangle_z$$

Gleichung 25

In die Gleichung geht der Streuvektor  $q$ , der die Winkelabhängigkeit der Partikelstreuung beschreibt, mit ein. Der Streuvektor  $q$  lässt sich mathematisch nach Gleichung 26 beschreiben.

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n_0}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\vartheta}{2}\right)$$

Gleichung 26

Daraus ergibt sich die allgemeine Lichtstreu-Gleichung unter Berücksichtigung der Streufunktion  $P_{(\vartheta)}$  zu:

$$\frac{K \cdot c}{R_\vartheta} = \frac{1}{P_\vartheta} \cdot \left( \frac{1}{M} + 2 A_2 \cdot c + \dots \right)$$

Gleichung 27

Setzt man in Gleichung 27 die Streufunktion  $P_{(\vartheta)}$  aus Gleichung 25 ein, erhält man für die allgemeine Streulicht-Gleichung folgenden Zusammenhang.

$$\frac{K \cdot c}{P_\vartheta} = \frac{1}{M_w} + \frac{1}{3} \cdot M_w \cdot \left( \frac{4 \cdot \pi \cdot n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \langle R_G^2 \rangle \cdot \sin^2 \frac{\vartheta}{2} + 2 A_2 \cdot c$$

Gleichung 28

Die Gleichung 28 gestattet es für die betrachteten Teilchen mit dem Durchmesser  $\lambda/20 < d < \lambda$  die Molmasse  $M_w$ , den Trägheitsradius  $R_G$  und den zweiten Virialkoeffizienten  $A_2$  zu ermitteln. Hierzu wird das doppelte Extrapolationsverfahren nach Zimm angewendet. In einem Zimmdiagramm wird  $K \cdot c / R_\vartheta$  gegen  $\sin^2(\vartheta/2) + kc$  aufgetragen. Aufgrund der sehr kleinen Konzentrationen wird zur Datenauftragung die willkürliche Konstante  $k$  eingeführt. Diese dient nur zur Aufweitung und damit zur besseren Visualisierung der Auftragung.

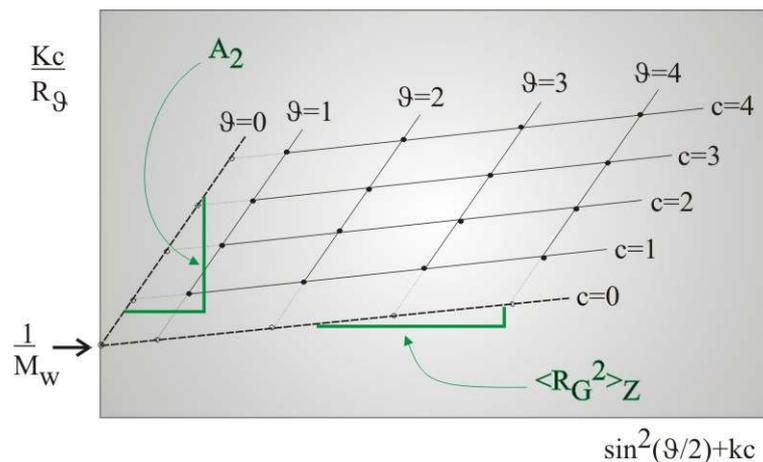


Abbildung 7: Doppelte Extrapolation nach Zimm mit den hieraus bestimmbaren Größen.

Durch doppelte Extrapolation auf die Konzentration  $c = 0$  und dem Winkel  $\vartheta = 0$  erhält man zwei Geraden (Abbildung 7). Aus dem Schnittpunkt der y-Achse wird die reziproke gewichtsmittleren Molmasse  $M_w^{-1}$  erhalten. Aus den Steigungen der extrapolierten Geraden lassen sich der zweite Virialkoeffizient  $A_2$  (Winkelabhängige Extrapolationsgerade  $\vartheta = 0$ ) und das Quadrat des z-mittleren Gyrationradius  $\langle R_G^2 \rangle_Z$  (Konzentrationsabhängige Extrapolationsgerade  $c = 0$ ) bestimmen.

Neben der Debye- und der Rayleigh-Streuung gibt es einen weiteren Bereich, für Teilchen, die größer oder gleich der verwendeten Wellenlänge des Lichtes sind, die Mie-Streuung [24].

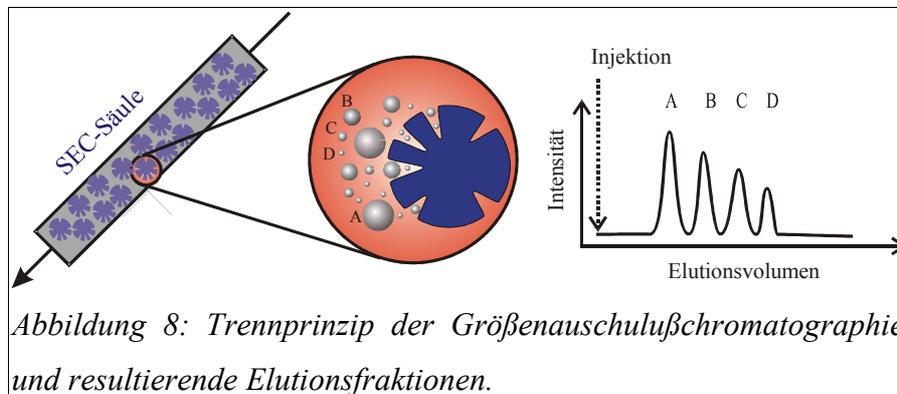
Ab einer Teilchengröße im Bereich von  $\lambda$  kommt es neben destruktiver auch zu konstruktiver Interferenz zwischen den Streuzentren. Die Winkelabhängigkeit der Streuintensität ist noch komplexer als bei der Rayleigh-Streuung, da die Streulichtverteilung Maxima und Minima um das Streuzentrum aufweisen. In dem Bereich der Mie-Streuung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gearbeitet, weshalb darauf nicht näher eingegangen wird.

### 2.1.3 Größenausschlußchromatographie

Bei der Größenausschlußchromatographie (GPC) (engl: size exclusion chromatographie – SEC) handelt es sich um eine chromatographische Methode, bei der die Teilchen nach ihrem hydrodynamischen Volumen, das näherungsweise mit ihrer Molmassen einhergeht, getrennt werden.

[24] Mie, G., Beiträge zur Optik trüber Medien spezieller kolloidaler Metalllösungen, Annalen der Physik, Vol. 25, (1908), S. 377-445

Die gelöste Probe wird auf eine Säule mit einem porösen Füllmaterial gegeben, in dessen Poren die gelösten Teilchen je nach Größe mehr oder weniger weit hineindiffundieren. Das Lösungsmittel fließt als mobile Phase an dem Füllmaterial vorbei und transportiert die Probe durch die Säule. In den Poren stagniert das Lösungsmittel und verhält sich so analog zu der stationären Phase und es kommt zu einer Auftrennung der Probe. Die größeren Partikel, die nicht in die Poren eindringen können, fließen an dem porösen Füllmaterial vorbei und werden deshalb zuerst eluiert. Kleine Partikel können in Abhängigkeit ihrer Größe verschieden weit in die Poren hineindiffundieren und eluieren mit einer Verzögerung, die um so größer ist, je kleiner die Teilchen sind.



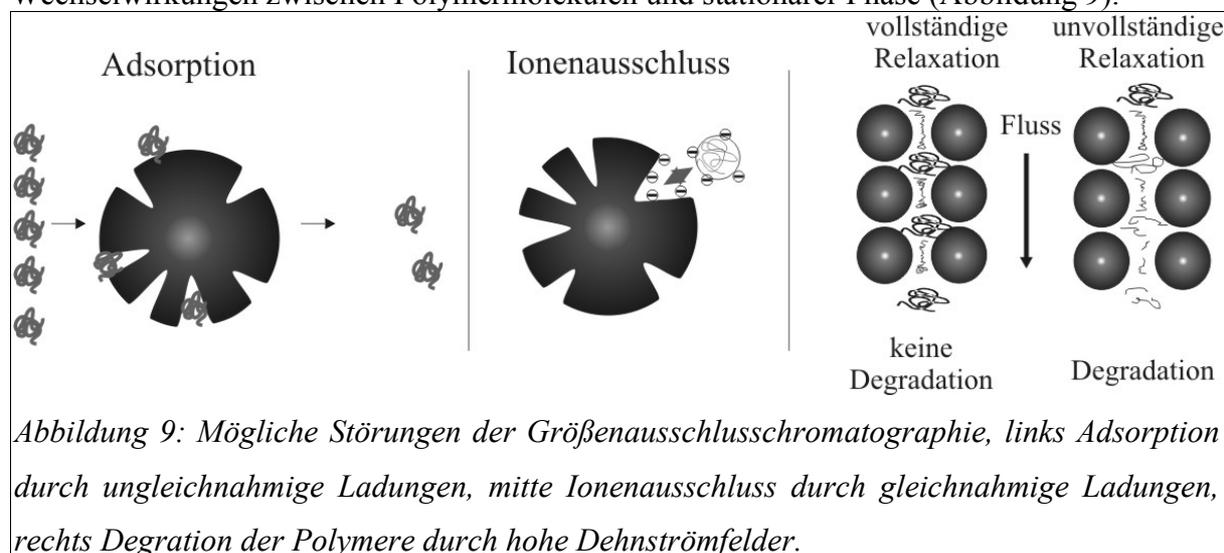
Je kleiner demnach das hydrodynamische Volumen der Teilchen ist, desto größer ist das zur Verfügung stehende Porenvolumen und desto später eluiert die Probe (Abbildung 8). Unter idealen Bedingungen resultiert ein Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen  $V_e$  und der Molmasse  $M$  unter Einbeziehung der Porenvolumens  $V_0$  und des Verteilungskoeffizienten  $K$  (Gleichung 29).

$$V_e = V_0 + K \cdot \log(M)$$

*Gleichung 29*

Um einen Bezug zwischen Elutionszeitpunkt und Molmasse herstellen zu können, bedarf es entweder einer relativen Kalibrierung mit engverteilten Standards bekannter Molmassen oder die Kopplung mit einer Methode wie der Lichtstreuung, die eine Absolutbestimmung der Molmassen zulässt.

Bei realen Trennprozessen können verschiedene Störungen auftreten. Sie resultieren aus Wechselwirkungen zwischen Polymermolekülen und stationärer Phase (Abbildung 9).



So behindern gleichsinnige Ladungen an dem Polymermolekül und der Matrix die Diffusion der Moleküle in die Poren. Die Folge ist, dass Moleküle ausgeschlossen werden und somit nicht fraktioniert werden können. Weisen die Polymermoleküle und die Matrix unterschiedliche Polarisierung auf, kann die Substanz an dem Säulenmaterial adsorbieren [25]. Eine weitere Störung des Trennprozesses tritt durch die Wirkung von Dehnströmungen auf das Makromolekül auf. In Partikelschüttungen wie dem Säulenfüllmaterial erfolgt eine Dehnung der Moleküle zwischen den Partikeln des Säulenfüllmaterials. Ist zwischen den aufeinander folgenden Dehnprozessen keine vollständige Relaxation mehr möglich, kommt es zu einer Degratation des Moleküls [26].

#### 2.1.4 Asymmetrische-Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Unter dem Oberbegriff Feld-Fluss Fraktionierung (engl. field-flow fractionation, FFF) versteht man Trennmethode, bei denen die Trennung in einem Kanal mit parabolischen Strömungsprofil durch ein senkrecht zum Kanalfloss angelegtes Kraftfeld erfolgt [27] [28]

[25] Barth H.G., Water Soluble Polymers, Adv. in Chemistry Series, Vol. 213, (1986), S. 31-55

[26] Kulicke W.-M., Böse N., Coll. Polym. Sci., Vol. 262, (1984), S. 197

[27] Giddings, J. C., A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities, Sep. Sci., Vol. 1, 1966, S. 123

[28] Giddings, J. C., Graff, K. A., Caldwell, K. D., Myers, M. N., „Field-Flow Fractionation: Promising approach for the separation and characterization of macromolecules“, ACS Advances in Chemistry Series, No. 203, Craver, C. D. (Hrsg.), (1983), S. 257

[29]. Man unterscheidet die einzelnen Methoden der Feld-Fluss Fraktionierung aufgrund des angelegten Kraftfeldes, das entweder hydrodynamischer, thermischer, gravitativer oder elektrischer Natur sein kann [30][31][32].

Der Vorteil der FFF gegenüber anderen Trennmethoden liegt in dem großen Anwendungsbereich. Die Trennung kann in wässriger oder organischer Lösung erfolgen. Die Fraktionierung ist hinsichtlich eines breiten Molmassenspektrums von  $10^3$  bis  $10^9$  g/mol möglich, wobei insbesondere der hochmolekulare Bereich für die Polymeranalytik interessant ist. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der FFF gegenüber der SEC ist, dass bei der FFF keine stationäre Phase erforderlich ist. Damit werden Wechselwirkungen, die zur Adsorption oder Degradation führen, annähernd ausgeschlossen.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fluss-Feld-Fluss- Fraktionierung ( $F^4$ ) stellt die vielseitigste Methode innerhalb der FFF-Gruppe dar [33][34]. So bietet sie über einen großen Molmassenbereich eine gute Auflösung. Die Trennung erfolgt in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D$ , der wiederum vom Radius eines Teilchens abhängig ist.

Die Trennung der Polymere mit Hilfe der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung ( $aF^4$ ) erfolgt, mit Hilfe eines Plexiglas Kanals, der an der Unterseite mit einer semipermeablen Membran verschlossen ist, nach ihrem hydrodynamischen Volumen, das näherungsweise mit ihrer Molmasse einhergeht. In Abbildung 10 ist eine schematische Zeichnung des verwendeten Kanals abgebildet. Hierbei ist der Kanal, in der die Trennung der Polymere erfolgt, stark vergrößert abgebildet.

---

[29] Janca, J., „Field-Flow Fractionation: Analysis of Macromolecules and Particles“, Chromatographic Science-Series, Vol. 39, (1988), S. 336

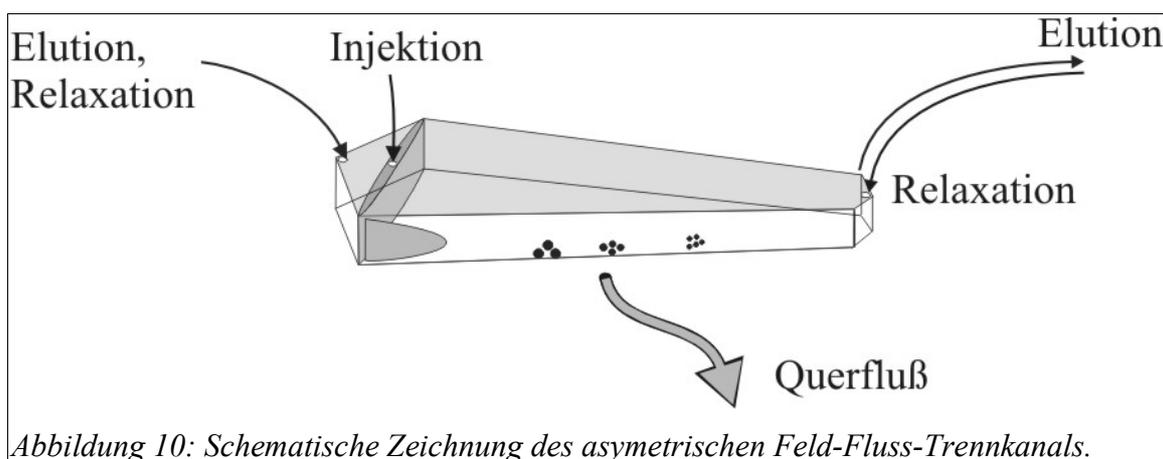
[30] Myers, M. N., „Overview of Field-Flow Fractionation“, J. Microcolumn Sep., Vol. 9, (1997), S. 151

[31] Schimpf, M. E., „Characterization of Polymers by thermal field-flow fractionation“, J. Chrom., Vol. 517, (1990), S. 405

[32] Cölfen, H., Antonietti, M., „Field-Flow Fractionation Techniques for Polymer and Colloid Analysis“, Adv. Polym. Sci. Vol. 150, (1999), S. 67

[33] Giddings, J. C., Yang, F. J., Myers, M. N., „Theoretical and Experimental Characterization of Flow Field-Flow Fractionation“, Anal. Chem., Vol. 48, (1976), S. 1126

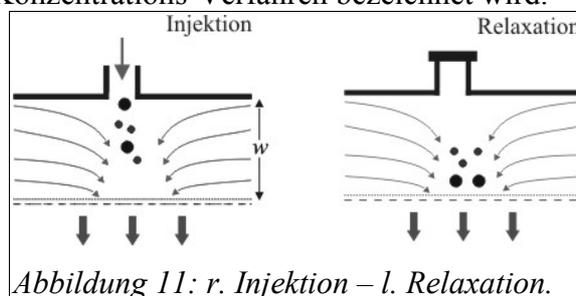
[34] Lee, H.-L., Reis, J. F. K., Dohner, J., Lightfoot, E. N., „Single-phase chromatography: solute retardation by ultrafiltration and electrophoresis“, AIChE J., Vol. 20, (1974), S. 776



Die asymmetrische Form des Trennkanals stellt eine von Wahlund und Giddings durchgeführte Weiterentwicklung der symmetrischen  $F^4$  dar [35] [36].

Bei dieser Bauform der  $F^4$  ist in dem oberen Kanaldeckel keine Fritte eingelassen. Das senkrechte Kraftfeld wird nur durch den Austritt von Lösungsmittel durch eine semipermeablen Membran in der Kanalunterseite bewirkt. Die auf der linken Seite in den Kanal hineinfließende Flüssigkeit kann nun zum einen den Kanal durch die semipermeable Membran verlassen - durch die ein Querfluss innerhalb des Kanals entsteht - zum andern kann die Flüssigkeit den Kanal durch einen Auslass auf der rechten Seite verlassen. Hierdurch entsteht ein axiales Strömungsprofil innerhalb des Kanals. Durch geeignete Ventilsysteme kann der Elutionstrom und der Querfluss variiert werden, hierdurch kann der Kanal- und Querfluss unabhängig voneinander geregelt werden.

Ein Vorteil gegenüber der symmetrischen  $F^4$  ist im Fokussierungsmodus die Möglichkeit einer Aufkonzentrierung der Probe an einer gewünschten Startposition (Abbildung 11), was als Injektions-Relaxations-Konzentrations-Verfahren bezeichnet wird.



[35] Wahlund, K.-G., Giddings, J. C., „Properties of an Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall“, Anal. Chem., Vol. 59, (1987), S. 1332

[36] Wahlund, K.-G., Litzén, A., Application of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel to the Separation and Characterization of Proteins, Plasmids, Plasmid Fragments, Polysaccharides and Unicellular Algae, J. Chromatogr., Vol. 461, (1989), S. 73

Durch einen angelegten Querfluss, wird die Probe schon während der Injektionsphase in die Gleichgewichtsposition gebracht. So kann die injizierte Polymerlösung durch die Fokussierung an der Startposition effizienter aufgetrennt werden, da keine axiale Wegstrecke zur Gleichgewichtseinstellung der Polymerknäule für die Trennung verloren geht.

Der Kanal wird von einem Fluss mit parabolischen Profil durchflossen. Senkrecht zu diesen wird ein zweiter Fluss (Querfluss) in den Kanal gegeben, der das trennende Kraftfeld erzeugt. In der Injektionsphase wird wie oben beschrieben die Probe auf die Membran, die sogenannten Akkumulationswand, gedrückt. Nach Probeneingabe wird der Kanalfluss wieder hinzugeschaltet und die Teilchen sind beiden Flüssen ausgesetzt. Die Diffusionskoeffizienten der Polymerknäule wirken entgegen dem Querfluss. Aufgrund ihrer Diffusionskoeffizienten, die in der Regel mit steigendem Radius kleiner werden, „lösen“ sich die Teilchen von der Akkumulationswand.

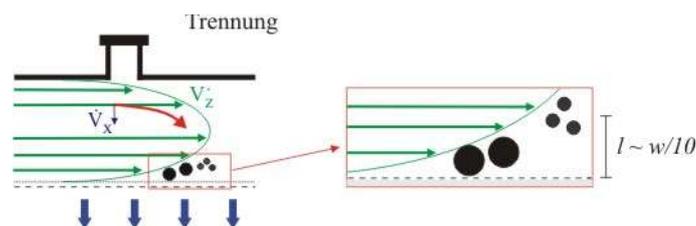


Abbildung 12 Trennprinzip der  $F^4$  (kleine Teile werden zuerst eluiert)

In Abhängigkeit ihres Diffusionskoeffizienten kommen die Teilchen in unterschiedliche Kanalhöhen, wo aufgrund des parabolischen Geschwindigkeitsprofils unterschiedlich schnelle Flussgeschwindigkeiten vorliegen. Die Flussgeschwindigkeit nimmt ausgehend von der Akkumulationswand bis zur Kanalmitte zu. Die Trennung der Probenbestandteile findet dabei im unteren Bereich, ca. ein Fünftel über der Akkumulationswand des Kanals statt. Die kleinen Teilchen, mit dem größeren Diffusionskoeffizienten, gelangen in Bereiche höherer Flussgeschwindigkeiten und werden schneller aus dem Kanal ausgetragen als die größeren Teilchen. Somit liegt die Elutionsreihenfolge umgekehrt wie im Fall der GPC vor, die kleinen Teilchen eluieren vor den großen.

Mögliche Limitierungen oder Störungen bei der  $F^4$  kann durch sehr große Teilchen ( $d > 1\mu\text{m}$ ) oder durch die verwendete Membran auftreten. So können an der Membran wie bei der GPC insbesondere geladene Polymere an der Membran adsorbieren und so die Trennung der Polymere verfälschen.

## 2.1.5 Gerätekopplung zur Bestimmung der absoluten Molmasse und Molmassenverteilungen

Die Größenausschlusschromatographie und auch die Feld-Fluss-Fraktionierung als Trennmethode ist eine relative Methode, die auf eine Kalibrierung angewiesen ist. Durch eine Kombination der Trennmethode mit z.B. einem Lichtstreuophotometer zur Bestimmung der Molmasse jeder Fraktion, erhält man eine Absolutmethode zur Polymercharakterisierung.

Um dies zu erreichen wurde die Größenausschlusschromatographie bzw. die Feld-Fluss-Fraktionierung mit einem Vielwinkel-Laser-Lichtstreuophotometer (Multi-Angel-Laser-Light-Scattering MALLS) und einem Konzentrationsdetektor (DRI) gekoppelt (Dualdetektorsystem). Der schematische Aufbau der Anlage für die Trennung und Bestimmung der Polymere ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

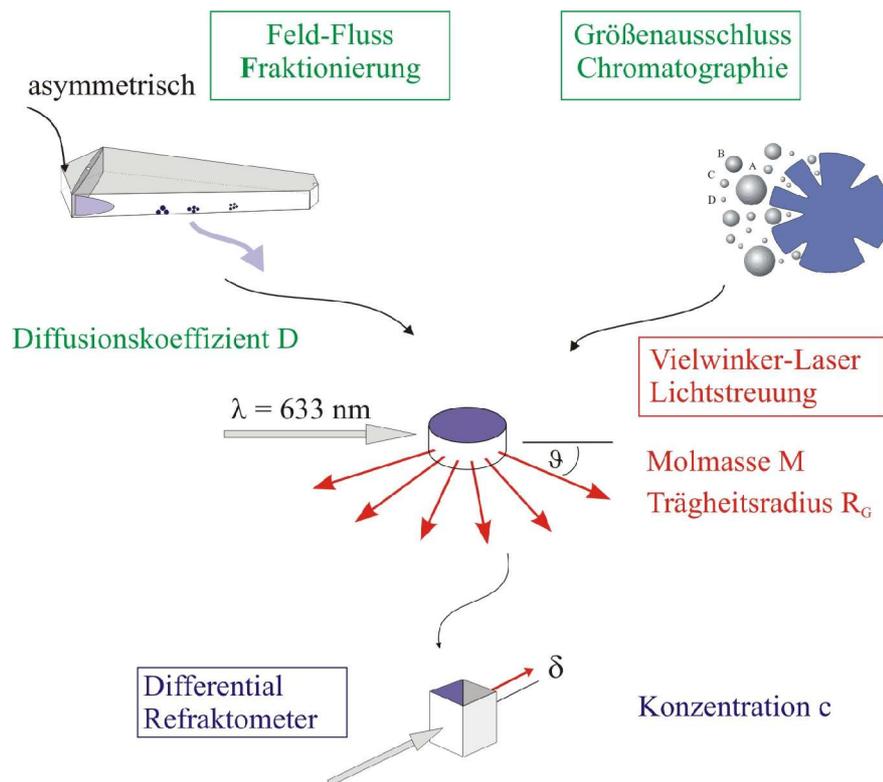


Abbildung 13: Schematischer Aufbau einer gekoppelten Anlage zur Bestimmung der Molmasse, Teilchengröße und deren Verteilungen

Dabei wird über eine HPLC-Pumpe für einen konstanten Lösungsmittelfluss durch die Anlage gesorgt. Hierbei wird das Elutionsmittel aus einem Vorratsbehälter entnommen und durch die Anlage gefördert. Ein Degaser entzieht durch Unterdruck gelöste Gase aus dem Eluenten, da

auch schon kleinste Gasblasen die Trennung oder die empfindlichen Detektoren massiv stören. Nach der Pumpe folgt ein Pulsationsdämpfer. Durch den Ausgleich von Druck- und Volumen-Schwankungen entsteht ein laminares Stömungsprofil. Dies ist insbesondere bei der Verwendung der Feld-Fluss-Fraktionierung als Trennmethode ein sehr wichtiges Kriterium zur Erreichung hoher Trennfaktoren. Über einen Autosampler werden die Probenlösungen injiziert und gelangen zu den verwendeten Trennsystemen. Nach der Fraktionierung durchläuft die Probenlösung die Detektorkombination aus dem Vielwinkel-Laser-Lichtstreuphotometer und dem Konzentrationsdetektor. Hierbei wird für jede Fraktion die Konzentration und die Molmasse ermittelt und on-line an einen Computer weitergeleitet. Es sind aber auch andere Detektoren oder Detektorkombinationen (Mono-, Dual- und Multidetektorsystem) möglich. So sind verschiedene Detektoren für die Molmasse wie z.B. verschiedene Formen von Massenspektrometern [37] [38] [39] , Viskosimeter [40] und dynamische Lichtstreuphotometer [41] in der Literatur beschrieben. Für die Bestimmung der Konzentration der Polymerlösung können z.B. Chemiluminescent Nitrogen Detektoren, Dichtedetektoren und Flammionisationsdetektor (FID) [42] dienen.

---

[37] Casartelli, E. A.; Miekeley, N., Determination of thorium and light rare-earth elements in soil water and its high molecular mass organic fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry and on-line-coupled size-exclusion chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 377, Issue 1, (2003) S. 58-64

[38] Koplík, R.; Pavelkova, H.; Cincibuchova, J.; Mestek, O.; Kvasnicka, F.; Suchanek, M., Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Vol. 770, Issue 1-2, (2002), S. 261-273

[39] Jacobs, A., Dahlmann, O., Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Biomacromolecules*, Vol. 2, (2001), S. 894-905

[40] Kaivez, A.; Gallez, X. A.; Daoust, D.; Devaux, J.; Godard, P., Molecular structure characterization of linear and branched polystyrene blends by size exclusion chromatography coupled with viscometry, *Polymer*, Vol. 43, Issue 11, (2002), S. 3181-3190

[41] Mrkvičková, L., Porsch, B., Sundelöf, L.-O., Study of Poly(methylmethacrylate) Stereocomplexes by Size Exclusion Chromatography and Dynamic Light Scattering, *Macromolecules*, Vol. 32, (1999), S. 1189-1193

[42] Barth, H. G., Boyes, B. E., Jackson, C., Size Exclusion Chromatography and Related Separation Techniques, *Anal. Chem.*, Vol. 70, (1998), S. 251R-278R

---

## 2.2 Rheologie

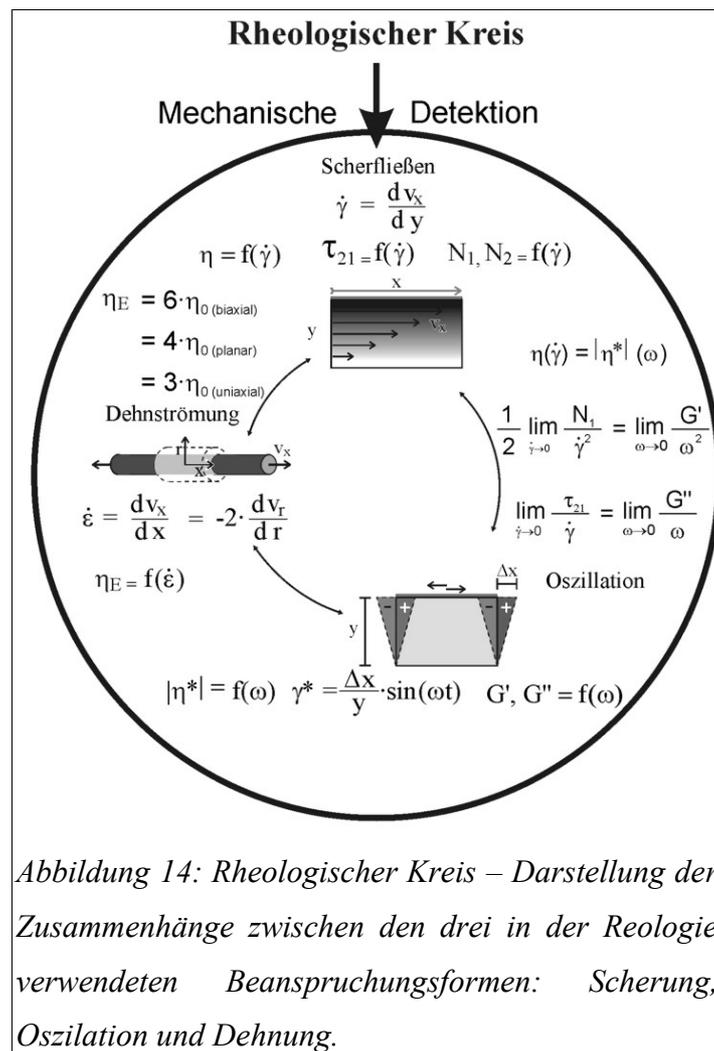
Die in den technischen Prozessen verarbeitenden Stoffe besitzen häufig ein komplexes mechanisches Verhalten.

Auch wenn diese Stoffe technisch als zusammenhängende Materie (Kontinuum) zu behandeln sind, reichen die klassischen Materialhypothesen - wie das Hooksche-Gesetz - für den Festkörper oder das newtonsche Gesetz für die Flüssigkeiten nicht aus, das komplexe mechanische Verhalten zu beschreiben. Reale Stoffe zeigen vielfach ein nicht-lineares Verhalten zwischen den Beanspruchungsgrößen (Spannung) und den Deformationsgrößen.

Aus diesen unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften ergab sich die Notwendigkeit eines neuen Wissenschaftszweiges, von dessen griechischer Bedeutung *rheo* (fließen) sich der Begriff Rheologie ableitet.

Die Aufgabenstellung der Rheologie ist die Deduktion von Deformationen und Veränderungen der Materialien unter der Einwirkung von definierten Kräften. Hierbei kennzeichnen sich einfache Fluide wie z.B. Wasser oder Öl, durch eine von der Deformationsart und Deformationsgeschwindigkeit unabhängige Viskosität, während insbesondere Polymerlösungen ein differenziertes Fliessverhalten aufweisen. Gelöste makromolekulare Stoffe zeigen Viskositäten, die zum einen von der Beanspruchungsform abhängig sind und zeichnen sich des weiteren durch das Auftreten von elastischen Phänomenen, wie dem WEISENBERG-Effekt aus.

Mit Hilfe rheo-mechanischer Messmethoden lassen sich Aussagen über das Fliessverhalten und die viskoelastischen Eigenschaften von Stoffen treffen. Die Proben werden in verschiedenen Experimenten unterschiedlichen Belastungsformen ausgesetzt.



Die im „Rheologischen Kreis“ gezeigten Materialfunktionen (Abbildung 14), wie z.B. Viskosität, Schub- und Normalspannung, Dehnviskosität sowie Speicher- und Verlustmodul, lassen sich aus dem Reaktionsverhalten der Probe in Abhängigkeit von der Stärke der Beanspruchung ermitteln [43].

Auf die Materialfunktionen der Dehnströmung wird hier nicht näher eingegangen, da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

### 2.2.1 Stationäres Scherfließen

Das stationäre Scherfließen ist die einfachste und am häufigsten verwendete Beanspruchungsform für flüssige Systeme. Hier wird ein laminares Strömungsgeschwindig-

[43] Kulicke W.-M., Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen, Hüthing & Wepf Verlag, (1986).  
 Mezger, T., Das Rheologie-Handbuch, Vincentz Verlag, Hannover, (2000)

keitsgefälle über eine Geschwindigkeitsdifferenz zweier paralleler Platten in der Probe induziert.

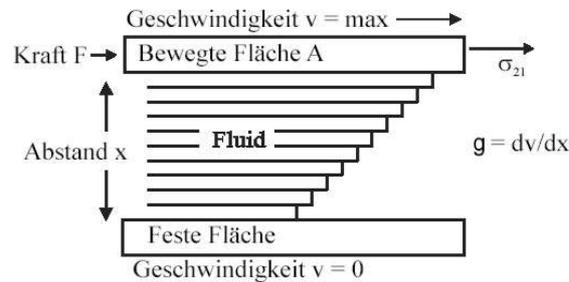


Abbildung 15: Darstellung des Scherfließens. Die Probe befindet sich zwischen zwei parallelen Platten. Die bewegte Fläche übt eine Schubspannung  $\sigma_{21}$  auf die Lösung auf. Dadurch baut sich ein Schergeschwindigkeitsgefälle auf, dass der angelegten Schubspannung proportional ist. Der Proportionalitätsfaktor ist die Viskosität  $\eta$ .

Die an der einen Platte zur Aufrechterhaltung des Geschwindigkeitsgefälles angelegte Kraft wird hierbei zum Teil über die Flüssigkeit auf die andere Platte übertragen (Abbildung 15). Hierbei gibt es zwei Rheometertypen. Bei einem schubspannungskontrollierten („controlled stress“, CS) Rheometer wird eine Kraft vorgegeben, während beim schergeschwindigkeitskontrolliertem Typ eine Deformation pro Zeit („controlled rate“, CR) angelegt wird [44]. Nach dem Newton'schen Gesetz ist die Schubspannung proportional zur angelegten Schergeschwindigkeit, der Proportionalitätsfaktor ist die Scherviskosität.

## 2.2.2 Oszillationsmessungen

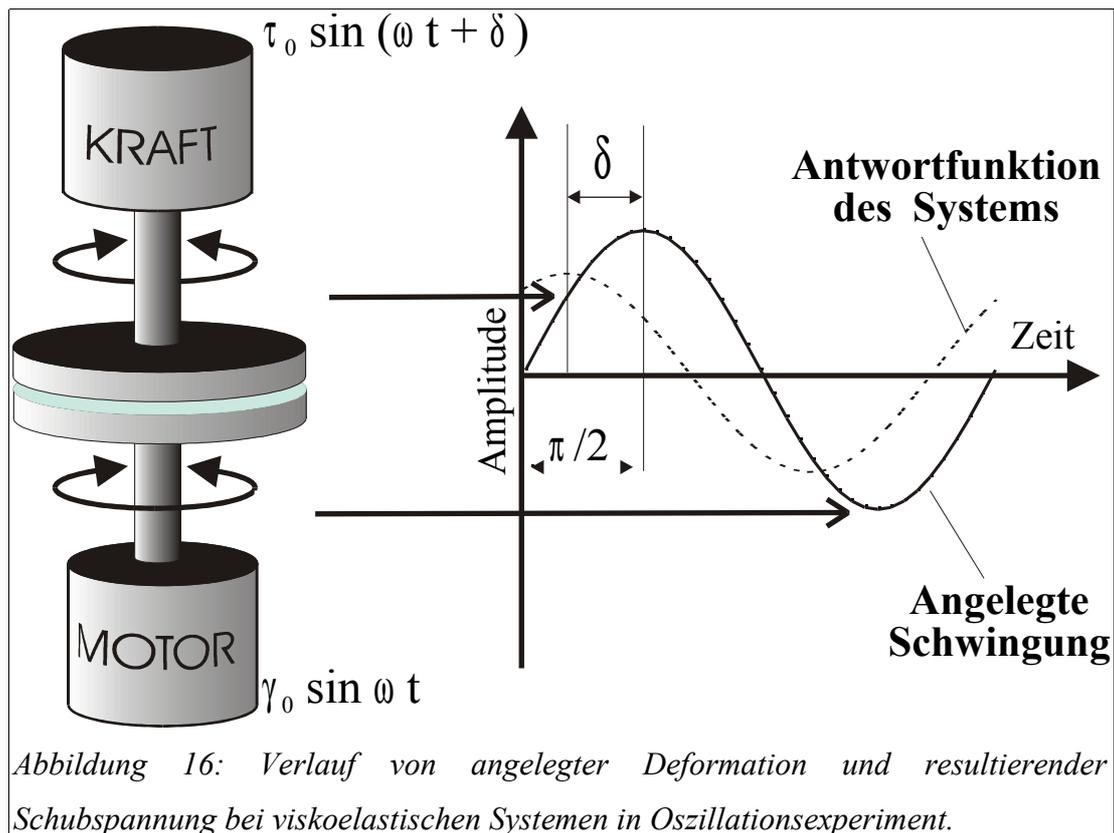
Membranen können als entropieelastische Körper angesehen werden und sind über einen weiten Beanspruchungsbereich reversibel verformbar. Bei hinreichend kleinen Deformationen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der angelegten Deformation  $\gamma$  und der resultierenden Schubspannung  $\sigma_{12}$  (Hook'sches Gesetz). Als Proportionalitätskonstante wird der Schubmodul  $G$  definiert.

$$\sigma_{12} = G \cdot \gamma \quad \text{Gleichung 30}$$

Im Oszillationsexperiment wird über einen Motor eine sinuidale Schwingung mit festgelegter Deformation und Frequenz auf die Probe übertragen. Die Antwortfunktion des Systems, die am Kraftaufnehmer des Rheometers detektiert wird, ist ebenfalls eine Sinusschwingung mit

[44] Gehm, L., Rheologie, Vincentz Verlag, Hannover, (1998)

gleicher Frequenz. Wie in der Abbildung 16 dargestellt, tritt jedoch in der Regel eine Phasenverschiebung auf, die charakteristisch für das viskoelastische Verhalten der Probe ist. Der Phasenwinkel  $\delta$  beträgt für rein viskose Substanzen  $90^\circ$ , während für rein elastische Proben keine Phasenverschiebung auftritt. Viskoelastische Fluide zeigen Phasenwinkel zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$ .



Mechanische Schwingungsmessungen bieten den Vorteil, dass Netzwerkstrukturen im Gegensatz zum Scherexperiment zerstörungsfrei charakterisiert werden können, wenn die Deformationsamplitude hinreichend klein gewählt wird (Abbildung 16). In diesem linear viskoelastischen Bereich sind die Materialfunktionen der Membran von der angelegten Deformation unabhängig und lassen sich durch Lösen linearer Differentialgleichungen eindeutig ermitteln. Darüber hinaus können durch zeitabhängige Messungen Strukturveränderungen detektiert und aus der Frequenzabhängigkeit der Materialfunktionen Hinweise auf die Netzwerkstruktur gewonnen werden.

Analog zum Schubmodul im Hook'schen Gesetz lässt sich bei oszillatorischer Beanspruchung aus der Phasenverschiebung und dem Verhältnis der maximalen Schubspannung  $\sigma_0$  zur

maximalen Deformationsamplitude  $\gamma_0$  ein komplexes Schwingungsmodul  $G^*$  ermitteln.

$$G^* = \frac{\sigma_0 \cdot e^{i \cdot \delta}}{\gamma_0} = G' + i \cdot G'' \quad \text{Gleichung 31}$$

Der komplexe Schubmodul kann in seinen Realteil (Speichermodul  $G'$ ) und Imaginäranteil (Verlustmodul  $G''$ ) zerlegt werden. Dabei ist der Speichermodul  $G'$  ein Maß für den Anteil der Deformationsenergie, die vom untersuchten System elastisch gespeichert wird. Dieser ergibt sich aus dem Anteil der Schubspannung, die in Phase ( $\delta = 0$ ) mit der angelegten Deformation gemessen wird. Dagegen wird der Verlustmodul  $G''$  um  $90^\circ$  phasenverschoben zur angelegten Deformation ermittelt und entspricht dem Anteil der eingebrachten Energie, die durch viskoses Fließen dissipiert wird.

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad \text{Gleichung 32}$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad \text{Gleichung 33}$$

Der Quotient aus Verlustmodul und Speichermodul gibt direkt das Verhältnis von dissipierter zu gespeicherter Energie wieder und wird als Verlustfaktor  $\tan \delta$  bezeichnet. Durch Kombination der beiden Gleichungen ergibt sich:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Gleichung 34}$$

Alternativ zum komplexen Schwingungsmodul  $G^*$  kann eine komplexe Schwingungsviskosität definiert werden. Diese lässt sich ebenfalls in einen elastischen  $\eta'$  und viskosen Anteil  $\eta''$  zerlegen und wird durch den folgenden Ausdruck gegeben:

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \eta' + i \cdot \eta'' \quad \text{Gleichung 35}$$

In der folgenden Abbildung ist der frequenzabhängige Verlauf des Speichermoduls  $G'$  verschiedener Polymersysteme dargestellt.

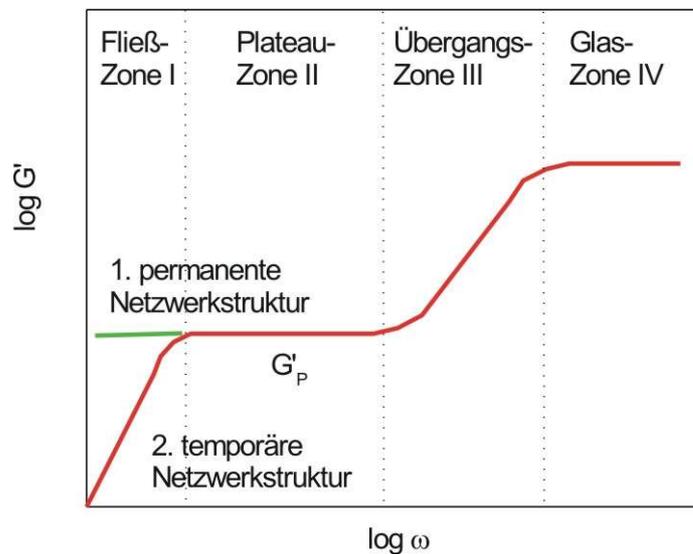


Abbildung 17: Frequenzabhängigkeit des Speichermodul  $G'$  für unterschiedliche Systeme. Kurve 1: permanentes Netzwerk, Kurve 2: temporäres Netzwerk.

In der Fließzone ist die Schwingungsfrequenz noch so gering, dass die Moleküle voneinander abgleiten können. Der Speichermodul  $G'$  steigt quadratisch mit der eingebrachten Energie an, wobei ein Großteil der Energie durch Relaxationsprozesse in viskoses Fließen überführt wird. Mit steigender Frequenz ist das System immer weniger in der Lage, die Deformationsenergie durch viskoses Fließen zu dissipieren, so dass sie im zunehmenden Maße in elastischer Verformung von beweglichen Kettensegmenten zwischen den Verhakungspunkten gespeichert wird. Bei chemisch vernetzten Membranen liegen permanente Netzpunkte vor. Da die zugeführte Energie fast ausschließlich in der Deformation der Segmentketten aufgenommen wird, beobachtet man bei z.B. Symplexmembranen, bei denen die Vernetzungspunkte über Ionische-Wechselwirkungen aufgebaut werden, keine Fließzone. Die Kurve (1) für den Speichermodul  $G'$  geht direkt in die Plateauzone über.

Bei viskoelastischen Polymerfluiden ist im Plateaubereich (Zone II) die Deformationsfrequenz so hoch, dass die Polymerketten nicht mehr aneinander abgleiten können. Durch die eingeschränkte Relaxation verhalten sich die Verhakungspunkte wie quasi permanente Netzpunkte eines kovalent verknüpften Polymernetzwerkes. Die dem System aufgezwungene Energie kann nur noch von den beweglichen Kettensegmenten bis zu einem Maximum elastisch gespeichert werden, so dass der Speichermodul  $G'$  trotz zunehmender Frequenz

einen nahezu konstanten Verlauf zeigt und in diesem Bereich als Plateaumodul  $G'_p$  bezeichnet wird.

Bei Polymerfluiden, die aufgrund zu geringer Kettenlänge kein Verhängungsnetzwerk ausbilden können, wird keine Plateauzone beobachtet.

Während die überschüssige Energie im Plateaubereich durch die Beweglichkeit der Kettensegmente dissipiert werden kann, können bei weiterer Steigerung der Deformationsfrequenz auch die beweglichen Kettensegmente der Beanspruchungsgeschwindigkeit nicht mehr folgen. In dieser Übergangszone wird die Schwingungsenergie von den Molekülen durch Deformation von Bindungslängen und Bindungswinkeln gespeichert, wodurch der Speichermodul erneut ansteigt (Zone III).

In der Glaszone ist auch diese Möglichkeit, die eingebrachte Deformationsenergie reversibel aufzunehmen, erschöpft, so dass kein weiterer Anstieg von  $G'$  beobachtet wird.

Durch die Ermittlung des Plateaubereichs der Speichermodule können Netzwerkstrukturparameter aus der Theorie der Gummielastizität nach Gleichung 36 berechnet werden.

$$G'_p = \left(1 - \frac{2}{f}\right) \cdot \nu_e \cdot R \cdot T = \frac{(f-2)}{2} \cdot n_e \cdot R \cdot T = \frac{(f-2)}{2} \cdot \frac{c}{M_e} \cdot R \cdot T$$

*Gleichung 36*

f: Funktionalität des Vernetzers

$\nu_e$ : Zahl der elastisch wirksamen Ketten pro Volumeneinheit

$n_e$ : Zahl der elastisch wirksamen Verhängungspunkte pro Volumeneinheit

c: totale Monomerkonzentration

Die Verhängungsmolmasse  $M_e$ , die die Molmasse zwischen zwei Verknüpfungspunkten der Netzwerkes angibt, ergibt sich aus Gleichung 37:

$$M_e = \frac{\rho \cdot R \cdot T}{G'}$$

*Gleichung 37*

Hierbei ist:  $\rho$  die Dichte des Polymerknäuels,  $R$  die allg. Gaskonstante,  $T$  die Meßtemperatur und  $G'$  der Wert für das Speichermodul im Plateubereich.

Besonders wichtig ist hierbei die Bestimmung der Dichte der Polymerknäule in der Membran. Bei Polymerlösungen entspricht die Dichte weitestgehend der Einwaagekonzentration des Polymers. Bei der Untersuchung der in Wasser gequollenen Membranen wurde die Dichte bzw. der Polymeranteil durch Volumen- und Massen-Quellung für jede Membran genau ermittelt.

Die Netzpunktdichte  $v_e$ , die die Anzahl von Verknüpfungspunkten pro Volumenelement angibt, berechnet sich nach Gleichung 38.

$$v_e = \frac{G' \cdot N_A}{R \cdot T}$$

Hierbei ist  $N_A$  die Advogado Konstante

*Gleichung 38*

Mit Hilfe der Netzpunktdichte kann der Netzpunktabstand  $\xi$  zwischen zwei Verknüpfungspunkten nach Gleichung 39 berechnet werden.

$$\xi = \frac{1}{\sqrt[3]{v_e}}$$

*Gleichung 39*

## 2.3 Ultraschalldegration

Im Jahr 1933 wurde von Flosdorf et. al. [45] die Beobachtung gemacht, dass sich die Viskosität einer Stärkelösung durch Ultraschallbehandlung verringert.

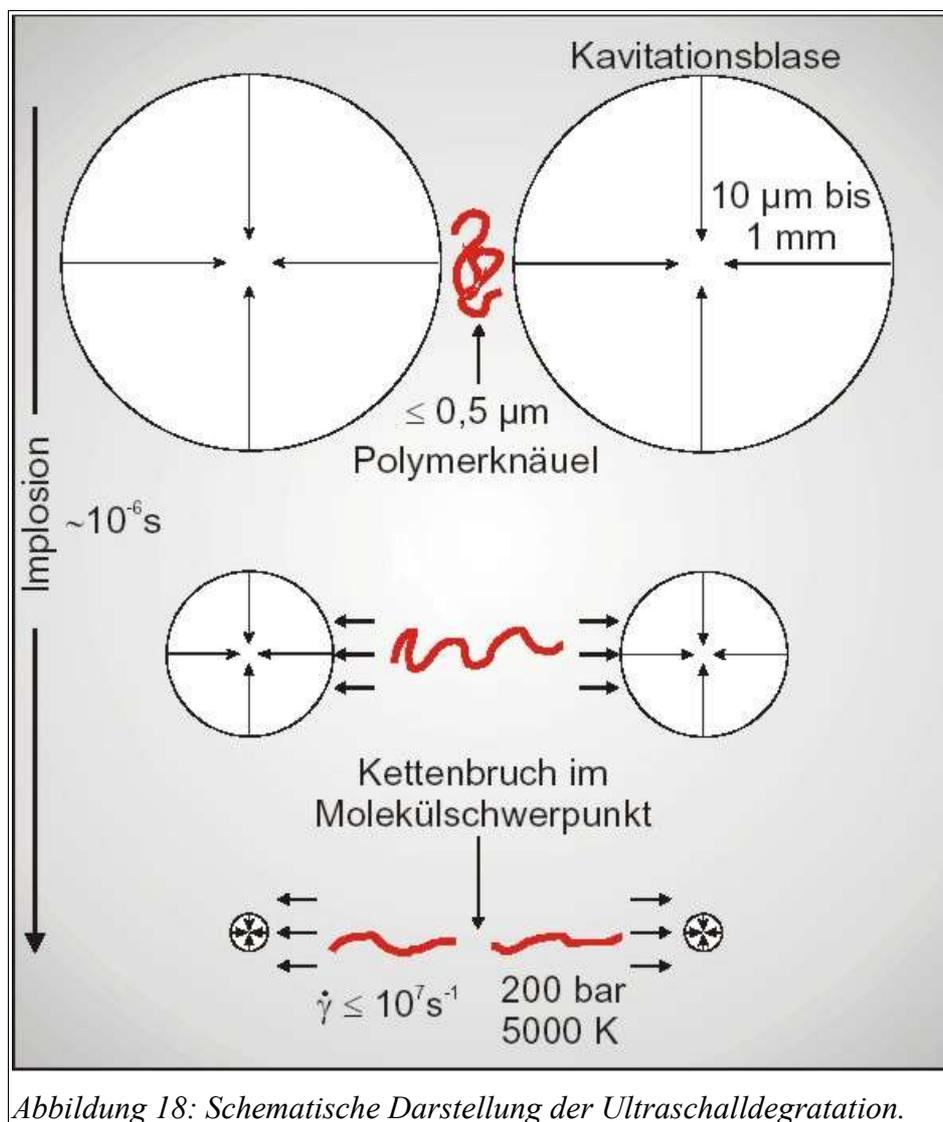
Bei der Ultraschalldegration von Polymermolekülen in Lösung wird mit Schallwellen hoher Intensität gearbeitet. Die Degradation erfolgt nicht durch die direkte Einwirkung der Ultraschallwellen auf das Polymermolekül, sondern durch die induzierten Druckschwankungen im Lösungsmittel [46] [47]. In Flüssigkeiten kommt es bei höheren

[45] Flosdorf, E.W., Chambers L.A., J. Am. Chem. Soc., (1933), Vol. 55, S. 3501

[46] Schnabel W., Polymer Degradation, Carl Hanser Verlag, München, 1981

[47] Basedow A.M., Ebert H.K., Ultrasonic Degration of Polymers in Solution, Adv. Polym. Sci., (1977),

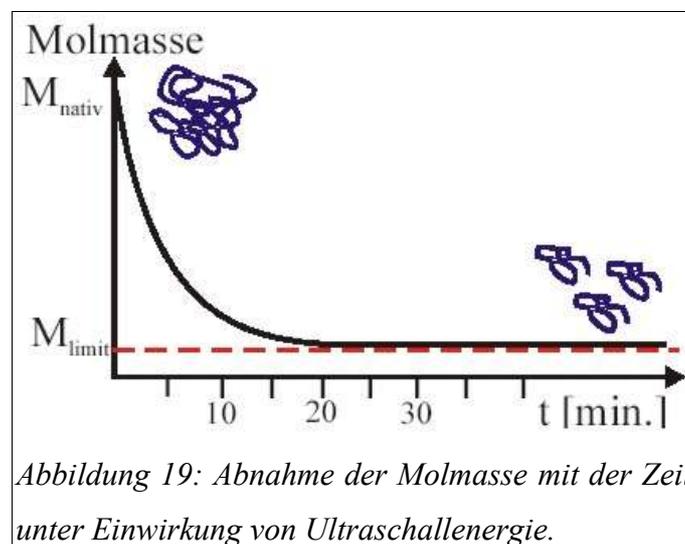
Schallintensitäten zur Bildung von Gasbläschen aufgrund gelöster Gase oder durch lokale Verdampfung von dem eingesetzten Lösungsmittel. Diese Gasbläschen vergrößern sich und kollabieren ab einer bestimmten Größe im Mikrosekundenbereich (Kavitation), wobei lokal kurzzeitig extreme Drücke von bis zu 200 bar und Temperaturen von bis zu 5000 K auftreten [48]. Außerhalb der Gasbläschen kommt es durch die Implosion der Gasblasen zur Ausbildung eines Dehnströmungsfeldes, wobei hierbei Scherraten von bis zu  $10^7 \text{ s}^{-1}$  auftreten können [49].



Durch diese hohen Scherraten, die sphärisch auf das Polymer einwirken, zerbrechen die

Polymerketten unter Bildung von Makroradikalen (Abbildung 18). Das entstandene Makroradikal wird durch das umgebene Lösungsmittel neutralisiert.

Hierbei erfolgt die Degradation nicht statistisch, sondern durch Kettenbrüche im Molekülschwerpunkt [50] [51]. Die Degradation erfolgt bei großen Polymermolekülen schneller als bei kleineren Polymermolekülen, da diese die im Dehnströmungsfeld auftretenden Kräfte besser akkumulieren können. Die Degradation erfolgt mit einer exponentiellen Abnahme der Molmasse mit der Zeit. Charakteristisch ist das Auftreten eines Grenzmolekulargewichtes und eine Verringerung der Polydispersität.



Die Reaktionskinetik der Degradation erfolgt nach erster Ordnung und weist darauf hin, dass die Polymermoleküle unabhängig voneinander degradieren (Abbildung 19).

Der Hauptparameter für den Degradationsprozess ist die Dehngeschwindigkeit resultierend aus der Kavitation und der Implosionszeit. Die Degradationsrate und das Grenzmolekulargewicht sind dabei abhängig von dem Polymertyp, der Polymerkonzentration, dem Lösungsmittel, der Flüssigkeitstemperatur und dem akustischen Druck.

Das Grenzmolekulargewicht ist für jedes Polymer spezifisch und wird nicht unterschritten, d.h. bei der Ultraschalldegration kommt es nicht zum Abbau bis zu den Monomeren. Das kommt daher, dass unterhalb einer bestimmten Polymerkettenlänge (spezifisch für jedes Polymer) die angreifenden Kräfte für einen Kettenbruch nicht mehr ausreichend sind.

Ultraschall vermag also, Polymere zu degradieren, ohne den chemischen und polymeren

[50] Milas M., Rinaudo M., Tinland B., Carbohydr. Polymer, (1986), Vol. 6, S. 95

[51] Malkotra S.L., Ultrasonic degradation of hydroxypropylcellulose solutions in water, ethanol and tetrahydrofuran, J. Macromol. Sci. Chem., (1982), Vol. A17, Issue 4, S. 601–636

Charakter der Probe zu beeinflussen; d.h. es können homologe Reihen in Bezug auf die Molmasse hergestellt werden.

W.-M. Kulicke [52] bewies, dass sogar voluminöse Seitengruppen (Acetyl- und Pyruvatgruppen) im Xanthan nicht abgespalten werden und auch keine Oligomere oder Monomere entstehen.

Dies macht den Ultraschallabbau insbesondere für Polymeranalytische Untersuchungen interessant. Alternative Degradationsmethoden für Polymere wie z.B. die alkalische, saure, thermische, enzymatische Spaltung oder Scherung (Malen) können die chemische Struktur (Abspaltung von Seitengruppen) und die Molmassenverteilung beeinflussen. Des weiteren kann es auch bis zum Abbau von Monomeren kommen, die z.B. die Qualität einer NMR-Untersuchung durch Überlagerung der Monomersignale mit den Polymersignalen stark herabsetzen kann bzw. unmöglich macht.

## 2.4 NMR-Spektroskopie

Um die Funktionalisierung der Membran bzw. der Ausgangspolymere mit den Furanderivaten analytisch zu erfassen, ist die NMR-Spektroskopie die Methode der Wahl.

Die NMR-Spektroskopie ist die wichtigste spektroskopische Methode zur Identifizierung von Substanzen und Strukturaufklärung komplexer Moleküle [53]. In der organischen Chemie und in der Polymeranalytik werden am häufigsten die  $^1\text{H}$ - und die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Mit Hilfe dieser Analysenmethoden lassen sich Konstitution (z.B. Zusammensetzung, von Copolymeren und Sequenz), Konfiguration (z.B. Taktizitätsbestimmung) und Konformation von synthetischen und biologischen Polymeren ermitteln. Aus der Lage (chemischen Verschiebung), der Intensität (Integral des Signals) und der Feinstruktur (Spin-Spin Kopplungseffekte), lassen sich wertvolle Informationen über die Struktur einer Verbindung gewinnen.

Die Grundlage der Kernresonanz-Spektroskopie bilden die magnetischen Eigenschaften der Atomkerne. Aus experimentellen Befunden ergibt sich, dass eine Reihe von Kernen einen Eigendrehimpuls (Kernspin) und damit ein magnetisches Moment besitzen.

[52] W.-M. Kulicke, M. Otto, A. Baar, Improved NMR characterisation of high molecular weight polymers and polyelektrolytes through use of prelineary ultrasonic degradation, *Macromol. Chem.*, (1993), Vol. 194, S. 751-765

[53] M.Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1991)

Die in dieser Arbeit untersuchten Kerne  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  besitzen eine Spin-Quantenzahl von  $I = \frac{1}{2}$ .

### **$^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie**

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie wurde schon früh als analytische Methode angewendet, da das Proton mit einer natürlichen Häufigkeit von 99,985 % und einem großen magnetischen Moment die größte Signalempfindlichkeit aller Kerne besitzt. Der große Vorteil von Protonenresonanz-Spektren besteht in der Proportionalität von Signalintensität und Anzahl der detektierten Kerne. Durch Interaktion der Signale ist die Bestimmung von Mengenverhältnissen der Protonen in einer Verbindung möglich, wodurch wichtige Informationen bei der Strukturaufklärung geliefert werden. Darüber hinaus kann die Zusammensetzung von Mischungen ermittelt werden.

Es wurden ca. 10-20 mg der zu untersuchenden Proben in ca. 1 ml  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst, bei Chitosan Proben wurden zusätzlich einige Tropfen  $\text{CD}_3\text{COOD}$  bzw.  $\text{DCl}$  zugegeben. Als Standard wurde das Natriumsalz der deuterierten Trimethylsilylpropionsäure zugesetzt.

Alle Proben wurden auf einem 400MHz NMR-Spektrometer vermessen.

### **$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie**

Die natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$ -Kernen beträgt nur 1,11 %. Es ist also wesentlich schwieriger  $^{13}\text{C}$ -Kerne zu vermessen als z.B.  $^1\text{H}$ -Kerne zu vermessen. Wegen der geringeren natürlichen Häufigkeit der  $^{13}\text{C}$ -Kerne muss wesentlich mehr Polymer in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst werden. Für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen wird ca. 300 mg Polymer in ca. 5 ml  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Dies führt zu sehr hochviskosen Lösungen, die die Messung negativ beeinflussen. Die Polymerproben wurden deshalb für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen Ultraschalldegradiert, um die Molmasse und damit auch die Viskosität der Lösung herabzusetzen.

## **2.5 Quecksilber-Porosimetrie**

Von den möglichen Methoden zur Porenmessung sind die Quecksilber-Intrusion und die Gas-Adsorption/Desorption (BET, Langmuir) die am weitesten verbreiteten.

Die Quecksilber-Porosimetrie wurde 1945 von Ritter und Drake entwickelt und gestattet es,

das Volumen und die Größe von Makro- und Mesoporen in porösen Feststoffen zu messen (Abbildung 20).

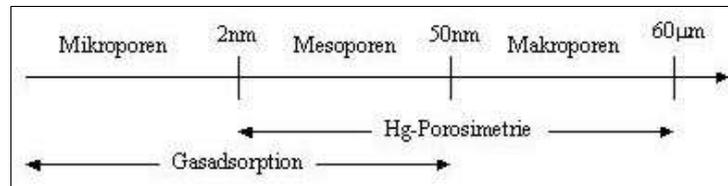


Abbildung 20: Messbereich verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Porenweite.

Die Grundlage des Verfahrens beruht auf der hohen Oberflächenspannung und der damit verbundenen Eigenschaft, dass sich Quecksilber gegenüber den meisten Feststoffen wie eine nicht benetzende Flüssigkeit verhält.

Dank dieser Eigenschaft dringt Quecksilber erst unter dem Einfluss eines steigenden Druckes in die offenen Poren eines Feststoffes ein.

Es kann mit folgender Gleichung, die von Washburn vorgeschlagen wurde, der Porenradius berechnet werden:

$$r = -2 \gamma \cdot \cos(\Theta) \frac{(\Theta)}{p}$$

r = Porenradius;  $\Theta$  = Benetzungswinkel; p = Druck

Gleichung 40

Hierbei werden folgende Annahmen gemacht:

- Die Oberflächenspannung des Quecksilbers und sein Benetzungswinkel gegenüber dem Feststoff sind während der Analyse konstant.
- Es werden zylinderförmige Poren in der Probe angenommen.
- Der Feststoff wird durch den Druck dicht deformiert.

Der Benetzungswinkel des Quecksilbers ist abhängig von der Natur der Probe und muss somit experimentell bestimmt werden. Die an einer großen Zahl von Proben gemessenen Benetzungswinkel von Quecksilber liegen zwischen  $125^\circ$  und  $152^\circ$ . Hieraus ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von  $141,3^\circ$ .

Für die Oberflächenspannung wird ein Wert von  $480 \text{ dyn/cm}$  angenommen.

Hieraus ergibt sich aus Gleichung 40:

$$r = 7500 / p \quad r = \text{Porenradius [nm]}; p = \text{Angewendeter Druck [kg/cm}^2\text{]}$$

Die Methode erlaubt bei einer maximalen äußeren Druckbelastung von 2000 bar die Messung von Porenradien zwischen 3,75 - 7000 nm.

Mit dem selben Modell zylindrischer Poren kann auch die *Porenoberfläche* bestimmt werden, indem die frisch geformte Quecksilberoberfläche gegeben ist durch Gleichung 41.

Die totale Porenoberfläche ergibt sich aus Integration über das Volumen zwischen  $V_{\min}$  und  $V_{\max}$ .

$$dA = - \frac{p}{\gamma \cdot \cos \Theta} \cdot dV$$

Gleichung 41

## 2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Ein Elektronenmikroskop ist ein spezielles Mikroskop, das anstelle von Licht gebündelte, durch Hochspannung beschleunigte Elektronen im Vakuum zur Abbildung und starken Vergrößerung kleinster Objekte verwendet wird. Die Wellenlänge des für Menschen sichtbaren Lichts liegt etwa zwischen 390 nm und 760 nm. Daraus folgt, dass Objektpunkte von geringerem Abstand als ca. 800 nm (in der Praxis 1  $\mu\text{m}$  und mehr) nicht mehr getrennt voneinander wahrgenommen werden können.

Die Wellenlänge von bewegten Elektronen, wie sie im Elektronenmikroskop verwendet werden, lässt sich durch eine Folgerung DeBroglies aus der Theorie des Planckschen Wirkungsquantums berechnen. Bei einer Beschleunigungsspannung von ca. 10 kV ergibt sich für die Geschwindigkeit der Elektronen nach DeBroglies:

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot e \cdot U}{m_e}} \quad \lambda = \frac{h}{m_e \cdot v}$$

$v$  = Geschwindigkeit;  $e$  = Coulombsche Ladung;  $U$  = Spannung;  $m_e$  = Masse Elektron;  $h$  = Plancksches Wirkungsquantum;  $\lambda$  = Wellenlänge

Eine Geschwindigkeit für das Elektron von  $5,931 \cdot 10^7$  m/s. Mit diesem Wert erhält man über das Plancksche Wirkungsquantum eine Wellenlänge von 0,012 nm für den Elektronenstrahl. Dies entspricht ca. einem zehntausenstel der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes. Durch

Erhöhung der Beschleunigungsspannung können so Objekte zumindest theoretisch mit  $<0,01$  nm aufgelöst werden.

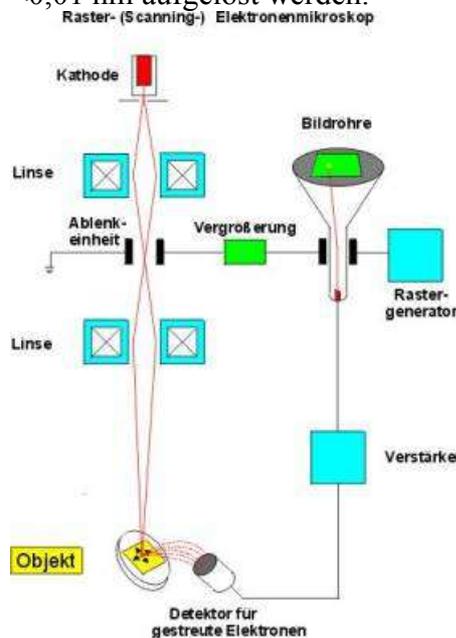


Abbildung 21: schematischer Aufbau eines REM.

Der komplette Vorgang des Mikroskopierens findet im Hochvakuum statt, um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden. Die aus der Kathode austretenden Elektronen werden durch einen Wehnelt-Zylinder gebündelt und durch die ringförmige Anode auf sehr hohe Geschwindigkeiten beschleunigt. Die Geschwindigkeit der Elektronen muss konstant gehalten werden damit deren Wellenlänge nicht variiert. Die verwendeten so genannten magnetischen Linsen entsprechen in ihrer Wirkung exakt den Linsen optischer Mikroskope. Man richtet zwei mit Eisen ummantelte Spulen nah beieinander aus und lässt den Elektronenstrahl dazwischen durchfließen. Dadurch wird aufgrund der Lorentzkraft eine erhebliche Vergrößerung erreicht (siehe

Abbildung 21).

Beim Rasterelektronenmikroskop wird die Oberfläche Punkt für Punkt, Zeile für Zeile von dem gebündelten Elektronenstrahl abgetastet. Durch das Auftreffen des Elektronenstrahls werden die Atome in der Probe angeregt. Die dadurch austretenden Signale werden punktweise gesammelt, verstärkt und auf einen Bildschirm geleitet. So entsteht ein Abbild der Oberflächenstruktur des zu untersuchenden Objektes. Diese Technik bietet den Vorteil, große Objektbereiche scharf abzubilden. Dadurch entsteht ein plastischer, dreidimensionaler Eindruck. Die maximal erreichte Vergrößerung liegt aufgrund technischer Limitierungen bei maximal 100.000.

### Probenpräparation

Da in der Rasterelektronenmikroskopie nur elektrisch leitende Oberflächen dargestellt werden können, müssen die Proben speziell präpariert werden. Durch besputtern (aufdampfen) eines Metallfilmes (z.B. Gold) werden die Oberflächen organischer Objekte leitend gemacht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schicht nicht zu dick aufgedampft wird, da sonst die feinen Strukturen des Objekts abgedeckt werden. Andererseits muss insbesondere bei porösen Materialien auf eine ausreichende Beschichtung geachtet werden, da nicht leitende Bereiche

die Messung massiv behindern.

Da die Abtastung mit dem Elektronenstrahl im Hochvakuum stattfindet, müssen die Objekte außerdem vor dem Bedampfen so präpariert werden, dass das zu untersuchende Objekt keinerlei leicht flüchtige Bestandteile abgibt. Hierzu werden die zu untersuchenden Proben zuvor im Hochvakuum getrocknet.

Die vermessenen Proben wurden 45 sec. bei einem Druck von ca. 0,1 mbar in einer Heliumatmosphäre und einer angelegten Spannung von ca. 10 kV mit Gold bespattert. Hieraus resultiert eine Schichtdicke von ca. 10 nm Gold auf der Probe.

### **Kryo-Präparation**

Alternativ kann Wasser mit einem aufwändigen Kälteverfahren (Kryo-Präparation) fixiert werden, und im tiefgefrorenen Zustand untersucht werden.

Ein besonderes Problem stellt die Vermeidung von Strukturveränderungen bei der Präparation wasserhaltiger Proben dar. Mit einem konventionellen REM können nur absolut trockene Präparate bearbeitet werden, weil ansonsten nicht das erforderliche Hochvakuum (ca.  $5 \cdot 10^{-5}$  mbar) erreicht wird. Eine thermische Trocknung (Trockenschrank) führt jedoch zu deutlichen Artefakten (Schrumpfung, Trockenrisse) und ist daher für mikro-strukturelle Untersuchungen von gequollenen, hydrophilen Membranen ungeeignet.

Bei der Kryo-Präparation werden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im gefrorenen Zustand gebrochen. Bei dieser Temperatur bleibt das entstehende Eis volumenkonstant, wodurch die Bildung von Artefakten im Idealfall verhindert wird. Die Bruchstücke werden nun bei unter  $-70$  °C im Hochvakuum getrocknet, indem das Eis durch Sublimation zu Wasserdampf entzogen wird. Das getrocknete Material eignet sich als Dauerpräparat (Vorteil dieser Methode).

Im Gegensatz zur Kryo-Präparation wird beim Kryotransfer-Verfahren das in der Probe enthaltene Wasser nach dem Schockgefrieren und dem Gefrierbruch durch ständiges Tiefkühlen der Probe erhalten. In diesem Zustand wird das Präparat beschichtet und anschließend unter Vakuum auf einen Kühl Tisch in das REM überführt.

Auch Kryo-Präparation und -Transfer sind nicht frei von Artefakten. Problematisch ist vor allem eine zu geringe Abkühlrate, die zur Bildung von Eis-Artefakten führt. Außerdem werden die Proben während der Beschichtung an der Oberfläche höheren Temperaturen ausgesetzt.

## 2.7 Konvokales Lasermikroskop

Während in der konventionellen optischen Mikroskopie der gesamte Bildausschnitt auf einmal betrachtet (d.h. detektiert) werden kann, wird in der konfokalen Mikroskopie lediglich ein Punkt auf der Probe beleuchtet und das von diesem Punkt zurückgestreute Licht detektiert. Damit sieht man auch sofort den größten Nachteil im Vergleich zur konventionellen Methode: Es besteht die Notwendigkeit, die Probe „abzurastern“. Man muss also entweder die Probe unter dem Laserfokus bewegen, oder man muss den Fokus durch geeignete Optiken über die Probe wandern lassen.

Ein Vorteil ist, dass das reflektierte Licht nur von einem einzigen Punkt auf der Probe stammt. Durch die hohe Ortsauflösung kann die drei dimensionale Topographie der Probe untersucht werden. Des Weiteren ist eine gleichzeitige orts aufgelöste spektroskopische Untersuchung der Probe möglich z.B. durch Raman.

### 2.7.1 Aufbau

Die konfokale Mikroskopie wurde bereits 1957 von M. Minsky [54] [55] beschrieben und zuerst doppelt fokussierte Mikroskopie genannt. Diese Methode hat sich mittlerweile zu einer sehr leistungsfähigen Methode zur Charakterisierung von stark strukturierten, komplexen und mikrostukurierten Oberflächen entwickelt.

Das grundlegende Prinzip der konfokalen Lasermikroskopie (k-LM) ist in Abbildung 22 dargestellt.

---

[54] US 3013467, Minsky M., Microscopy apparatus, (1957)

[55] Minsky M., Memoir on inventing the confocal scanning microscope, Scanning, (1988), Vol. 10, S. 128–138

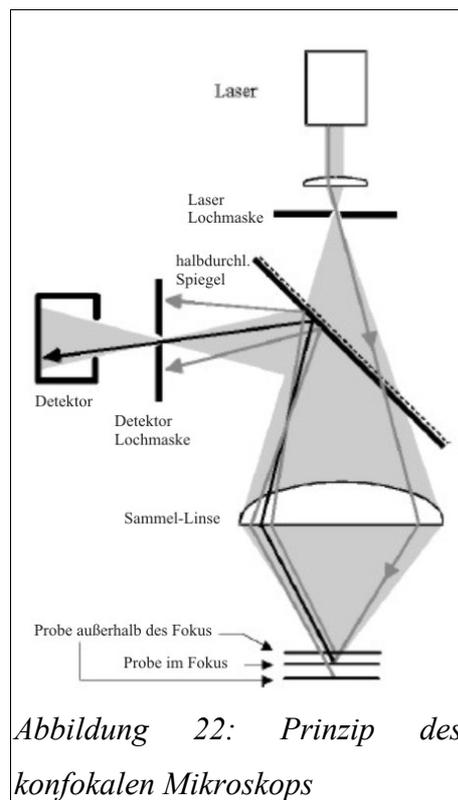


Abbildung 22: Prinzip des konfokalen Mikroskops

Licht wird von einer Punktlichtquelle (z.B. Laser) auf die Laserlochmaske und anschließend über eine Sammellinse (Mikroskop Objektiv) auf die Probe gelenkt. Eine Probe die sich im fokussierten Licht befindet wird über einen halbdurchlässigen Spiegel und einer detektor Lochmaske im Detektor registriert. Bereiche der Probe außerhalb des Fokus wird durch die Detektor- Lochmaske nicht zum Detektor geleitet. Hierbei wird die Tiefenauflösung des Gerätes maßgeblich durch die „Lochgröße“ der Lochmaske beeinflusst und auch als 1 Dimensionale konfokale Punkt Abstandsmessung bezeichnet [56] [57]. Ein weiterer Vorteil der konfokalen Mikroskopie gegenüber der klassischen Licht Mikroskopie ist, dass die laterale Auflösung signifikant größer ist (ca. 20 %) [58]. Mit diesem einfachsten Verfahren kann nur der Probenabstand in z-Richtung bestimmt werden.

Für die Untersuchung der 3D-Topographie der Probe sind verschiedene Designs für konfokale Mikroskope möglich. Zeitraubende serielle x-y-Scan Techniken, auf Basis der 1D konfokalen Punkt-Abstandsmessung, wurden zur Erfassung der tieferen Bereiche entwickelt. Durch eine anschließende z-Scan Untersuchung stehen alle Daten zur Erzeugung einer Topographischen

[56] Hamilton D.K., Wilson T., Sheppard C.J.R., Experimental observation of the depth-discrimination properties of scanning microscopes, Opt. Lett., (1981), Vol. 6, S. 625

[57] Wilson T., Depth response of scanning microscopes Optik, (1989), Vol. 81, S. 113

[58] Wilson T., Confocal Microscopy, (1990), New York, Academic P.

3D Darstellung der Probe zur Verfügung [59] [60]. Moderne Anwendungen für diesen Typ der konfokalen Mikroskopie liegen im Bereich der biologischen und medizinischen Zelluntersuchungen [61] und in der Analyse von glatten technisch genutzten Oberflächen [62] [63] [64].

Eine Übersicht der Applikationen für die konfokale Lasermikroskopie ist in den Veröffentlichungen von Hellmuth [65] und Dixon [66] dargestellt. Eine moderne Methode stellt die abtastende konfokale Lasermikroskopie (SCM) dar (Abbildung 23).

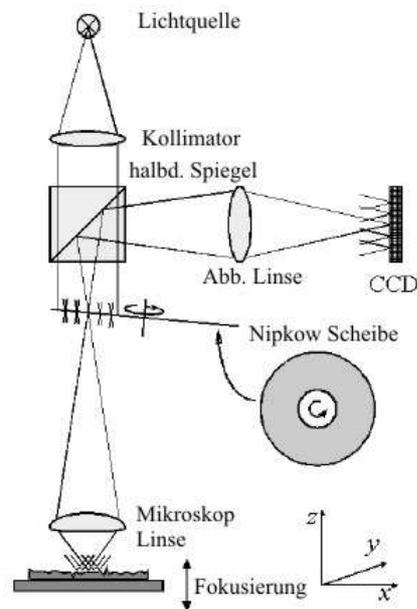


Abbildung 23: Prinzip der abtastenden konfokalen Lasermikroskopie (SCM)

[59] Hamilton D.K., Wilson T., Three-dimensional surface measurement using the confocal scanning microscope, Appl. Phys., (1982), Vol. B 27, S. 211

[60] Carlsson K., Åslund N., Confocal imaging for 3-D digital microscopy, Appl. Opt., (1987), Vol. 26, S. 3232

[61] Massig J.H., Preissler M., Wegener A.R., Gaida G., Real-time confocal laser scan microscope for examination and diagnostics of the eye in vivo, Appl. Opt., (1994), Vol. 33, S. 690

[62] Hamilton D.K., Wilson T., Surface profile measurement using the confocal microscope, J. Appl. Phys., (1982), Vol. 53, S. 5320

[63] Xiao G.Q., Kino G.S., A real-time confocal scanning optical microscope, (1987), Proc. SPIE, Vol. 809, S. 107

[64] Xiao G.Q., Corle T.R., Kino G.S., Real-time confocal scanning optical microscope, Appl. Phys. Lett., (1988), Vol. 53, S. 716

[65] Hellmuth T., Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie, Phys. Blätter, (1993), Vol. 49, S. 489

[66] Dixon A.J., Doe N., Pang T.M. Industrial applications of confocal scanning optical microscopy Proc. SPIE (1987), Vol. 809, S. 37

Hierbei wird eine Lochmaske mit unterschiedlichen Öffnungsdurchmessern (Nipkow Scheibe), in einer dazwischen liegenden Abbildungsebene des Mikroskopes verwendet [67]. In Kombination mit einem CCD (charge coupled device) Detektor und der Rotierenden Nipkow Scheibe ist es möglich Echtzeit x-y Abtastungen des Probefeldes vorzunehmen. Nur ein weiterer z-Scan, der durch die Bewegung der Probe erreicht wird, ist notwendig, um eine 3D Topographie der Probe zu erstellen. Diese Technik der abtastenden konfokalen Lasermikroskopie erlaubt schnelle und sehr akkurate Untersuchungen auch von komplex strukturierten Oberflächen [68] [69] [70]. Diese Art der konfokalen Lasermikroskopie wurde auch zur Untersuchung der Membranen in dieser Arbeit verwendet.

### 2.7.2 Theoretische Grundlagen der 3D konfokalen Mikroskopie

Eine umfassende Beschreibung der theoretischen Grundlagen der konfokalen Lasermikroskopie ist von Wilson 1990 beschrieben.

Die Tiefendiskriminierung ( $I_z$ ) eines konfokalen Systems (siehe Gleichung 42) ist proportional zu einer  $\text{sinc}^2$  Funktion, die von dem Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) der Mikroskoplense der Wellenzahl ( $k=2\pi/\lambda$ ) und dem Fokussierungsabstand  $z$ .

$$I_{(z)} = \left( \sin \frac{[kz(1 - \cos \alpha)]}{kz[1 - \cos \alpha]} \right)^2 \cdot I_o$$

Gleichung 42

Die quantitative Beschreibung der Halbwertsfläche erfolgt über die sogenannte Halbwertsbreite (full width at half maximum FWHM) also über einen 50 % igen

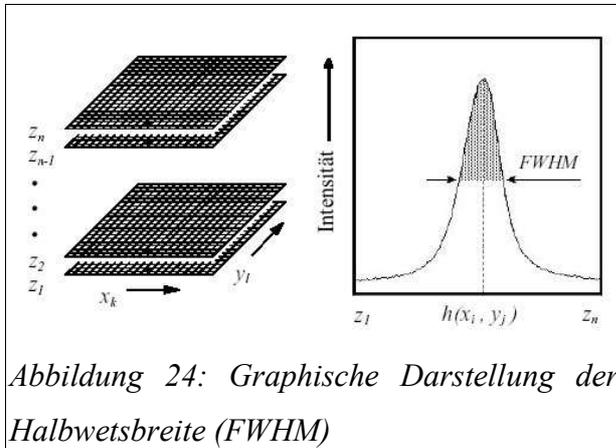
[67] Petráň M., Hadravský M., Egger M.D., Galambos R., Tandem-scanning reflected-light microscope J. Opt. Soc. Am., (1968), Vol. 58, S. 661

[68] Tiziani H.J., Jordan H.-J., Contributions to Optical Non-Contact Techniques for Engineering Surface Metrology, BCR Information, European Commission, (1995), Report EUR 16161 EN

[69] Jordan H.-J., Optische Mikrotopometrie und Rauheitsmessung an technischen Oberflächen, Berichte aus dem Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart, (1996)

[70] Jordany H.J., Wegner M., Tiziani H., Highly accurate non-contact characterization of engineering surfaces using confocal microscopy, Meas. Sci. Technol., (1998) Vol. 9, S. 1142–1151

Intensitätsabfall der entsprechenden Strecke in axialer (x) oder lateraler (y) Richtung (siehe Abbildung 24) .



Die Halbwertsbreite ist wiederum von der dem Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) der Mikroskoplinse und der Wellenlänge abhängig.

$$FWHM = 2 z_{1/2} \approx \frac{0,443 \lambda}{1 - \cos \alpha}$$

Gleichung 43

Abbildung 24: Graphische Darstellung der Halbwertsbreite (FWHM)

Die maximale noch dedektierbare Oberflächenneigung wird wie nach Gleichung 44 wie folgt berechnet:

$$\alpha_{max} = 0,5 \cdot \arcsin ( NA )$$

Gleichung 44

Die dimensionslose Größe NA steht dabei für die numerische Apertur der Linse, es gilt:  $NA = n \cdot \sin\Theta$ , dabei ist  $\Theta$  der halbe Öffnungswinkel der Linse. Die Wellenlänge, zusammen mit der numerischen Apertur, bestimmt also u.a. die Tiefenschärfe und Nahauflösung. Durch die Verwendung unterschiedlicher Mikroskoplinsen kann so die Auflösung erhöht werden. Jedoch wird hierdurch auch die beobachtete Fläche verkleinert (Tabelle 3).

Mikroskop-Objektiv	20x /NA 0,45	50x /NA 0,85	160x /NA 0,95
Arbeitsabstand [ $\mu\text{m}$ ]	2000	220	70
$\alpha_{max}$ [Grad]	13,4	29,1	35,9
$FWHM_{Theorie}$ [ $\mu\text{m}$ ]	2,3	0,51	0,35
$FWHM_{Experiment}$ [ $\mu\text{m}$ ]	6,1	1,1	0,52
Nahauflösung [nm]	40	20	10
Messfeld	500 $\mu\text{m}$ x 500 $\mu\text{m}$	225 $\mu\text{m}$ x 225 $\mu\text{m}$	70 $\mu\text{m}$ x 70 $\mu\text{m}$
Punktauflösung	(1,1 $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	(0,44 $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	(0,14 $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>

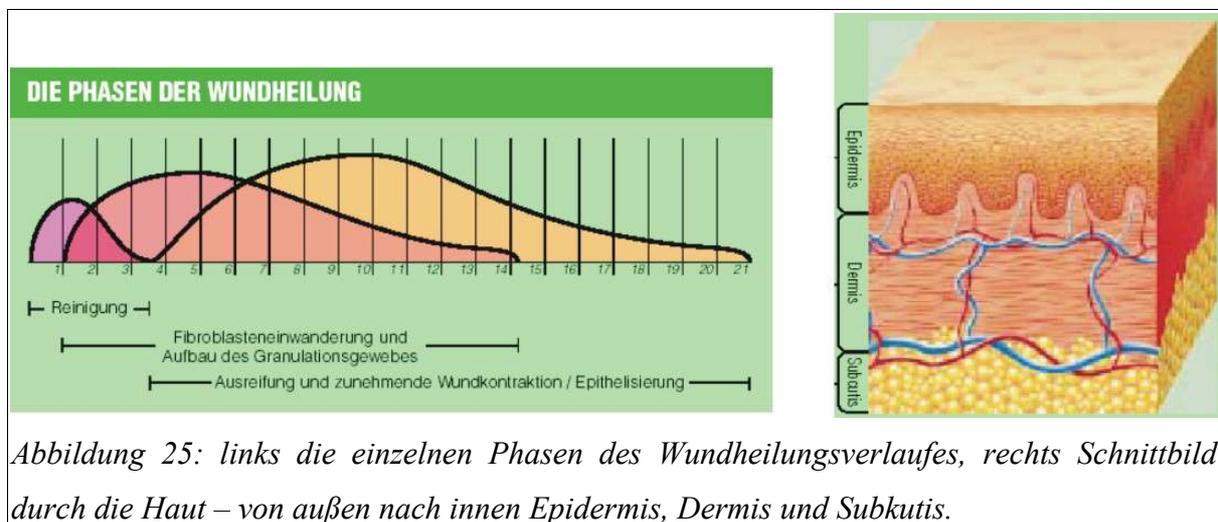
Tabelle 3: Parameter der Abtastende konfokalen Mikroskopie für verschiedene Objektive

Die Abweichung der experimentellen Halbwertsbreite (FWHM) von der theoretischen

Halbwertsbreite ist hauptsächlich auf die elektronische Signalverarbeitung zurückzuführen.

## 2.8 Prinzip der Wundheilung

Verletzungen der Epidermis (Alltags-Wunden) heilen normalerweise problemlos ab und stellen für die Wundversorgung keine Herausforderung dar. Erst eine tiefergehende Verletzung der Haut, bei der die Dermis oder die Subkutis geschädigt wird, führt häufiger zu Problemen bei der Heilung dieser Verletzungen. Die Wundheilung kann in verschiedenen Phasen eingeteilt werden wobei die Grenzen zwischen den einzelnen Phasen fließend sind und ineinander übergehen. Zuerst setzt die Reinigungsphase oder Entzündungsphase ein, bei der zunächst das traumatisierte Gewebe durch z.B. Metall-Proteinasen abgebaut wird. Hiernach kommt es zur Ausbildung von Granulationsgewebe, das den Wunddefekt langsam auffüllt. Zum Ende der Wundheilung kommt es zu zunehmender Wundrandkontraktion mit anschließender Epithelisierung (Abbildung 25).



Die heutigen Anforderungen an die Funktion von Wundauflagen für Wunden gehen zurück auf G. Winter [71] und sind jüngst von T.D. Turner neu formuliert worden [72]. Hauptaufgabe ist die Schaffung eines feuchten Wundheilungsmilieus, das im Gegensatz zur traditionellen trockenen Wundbehandlung mit z.B. Baumwollkompressen den natürlichen Abläufen der Wundheilung physiologische und damit bessere Konditionen bietet. Dabei muss

[71] Winter G., Nature, Vol. 193, (1962) S. 293

[72] Turner T.D., Wound Rep. Reg., Vol. 2, (1994) S. 202

die Wundaufgabe das Wundexudat aufnehmen oder nach außen ableiten (Semipermeabilität) gleichzeitig aber auf der Wunde einen Flüssigkeitsfilm belassen. In diesem verbliebenen Flüssigkeitsfilm findet dann die eigentliche Wundheilung statt. Erreicht werden diese Anforderungen durch gel- oder schwammartige Strukturen und/oder zusätzliche quellfähige oder wasserbindende Substanzen in der Wundaufgabe. Nach außen sorgt eine semipermeable Membran für Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit und gleichzeitig für eine Barrierefunktion gegenüber möglicherweise aus der Umgebung eindringenden Keimen.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich bei einer Variation der Eigenschaften der Wundaufgaben im Hinblick auf Flüssigkeitsaufnahme oder Wasserdampfdurchlässigkeit z.T. gegenteilige Effekte beobachten lassen, z.B. eine generelle Proteinaufkonzentration [73].

Nachteile der im Stand der Technik bekannten Wundaufgaben sind unter anderem die unzureichende heilungsfördernde Wirkung bei chronischen Wunden und der Versorgung von Brandwunden und Spalthautentnahmewunden sowie die o.g. zum Teil gegenteiligen Effekte, die durch unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf Flüssigkeitsaufnahme oder Wasserdampfdurchlässigkeit und Sauerstoffpermeabilität der Wundaufgaben erzielt werden.

Aufgabe ist es daher, Wundaufgaben zur Verfügung zu stellen, die sich im besonderen Maße zur Einleitung bzw. Förderung der Heilung chronischer, d.h. schwer oder nicht heilende Wunden und der Versorgung von Brandwunden und Spalthautentnahmewunden eignen.

Eine Brandwunde ist definitionsgemäß eine Gewebeschädigung durch Einwirken von thermischer Energie (strahlende Wärme heißer Körper, Flammen, Kontakt mit erhitzten Gasen, Massen oder Flüssigkeiten [= Verbrühung]) oder von ionisierenden und UV-Strahlen (Strahlungsschäden) mit verschiedenen Schweregraden.

Die Schädigung der Haut lässt sich in unterschiedliche Tiefen einteilen. „Bei der Verbrennung 1. Grades sind nur Epidermis (Oberhaut-) Lagen betroffen. Typisch für dieses Verbrennungsausmaß ist eine Hautrötung. Die Verbrennung 2. Grades ist durch den Befall der Epidermis und obersten Corium (Lederhaut-) Schichten charakterisiert. Als Folge dieser Schädigung finden sich große und kleine Blasen an der Hautoberfläche oder eine flächenhafte Plasmaentleerung. Die Haut unter den Blasen erscheint rötlich. Bei einer Verbrennung 3. Grades ist der Hautmantel in seiner ganzen Dicke (Oberhaut und Lederhaut) geschädigt. Die Haut ist weißlich, gelegentlich auch dunkel gefärbt. Bei der schwersten Verbrennung (4.

---

[73] Achterberg V., J. Wound Care, Vol. 5, (1996), S. 79

Grades) sind auch unter der Haut gelegener Organstrukturen, wie Unterhautfettgewebe, Sehnen, Nerven, Knochen und Muskeln schwer traumatisiert (Tabelle 4). Aufgrund der ausgeprägten Gewebeerstörungen müssen diese Bereiche umfassend von den Nekrosen befreit werden, was bei diesen Schweregraden meist erst durch Amputationen erreicht werden kann.“ [74].

<b>Tiefe der Verbrennung</b>	<b>Mögliche Ursache</b>	<b>Oberfläche</b>	<b>Farbe</b>	<b>Schmerzäußerung</b>
1. Grades (epider.)	Sonne	trocken	erythematös	schmerzhaft
2a. Grades (Oberf.)	heißes Wasser	feucht, Blasen	rot	schmerzhaft
2b. Grades (Tief)	heißes Wasser	feucht, Blasen	gesprenkelt rosa	schmerzhaft
3. Grades (subd.)	Flammen	trocken	weißgrau	schmerzlos

*Tabelle 4: Charakteristische Zeichen verschiedener Verbrennungstypen*

Bei Tiefen 2. Gradigen und 3. Gradigen thermischen Hautschäden ist die Haut in so tiefe Schichten geschädigt, dass diese Wunden auf jeden Fall eine operative Therapie benötigen (siehe Tabelle 5) [75].

<b>Tiefe der Verbrennung</b>	<b>Abheilungszeiträume</b>	<b>plastisches Ergebnis</b>
1. Grades epidermal	5-6 Tage	Heilt ohne Narben ab.
2a. Grades oberflächlich	12-14 Tage	Heilt ohne Narben ab.
2b. Grades tief	ca. 4 Wochen (ggf. Transpl.)	Heilt mit Narbenbildung
3. Grades	Transplantation	Variabel

*Tabelle 5: Übersicht der Abheilungszeiträume für die unterschiedlichen Schweregrade der Verbrennungen.*

Neben dem ästhetischen Aspekt muss die Haut vor allem als eigenständiges Organ angesehen werden. Dieses Organ übernimmt wichtige Funktionen, die nach einer Verbrennungsverletzung teilweise oder ganz verloren gehen:

Schranken- und Barrierenfunktion, Kontaktfunktion, Regulationsfunktion, Ausscheidungsfunktion, Sinnesfunktion und Speicherfunktion.

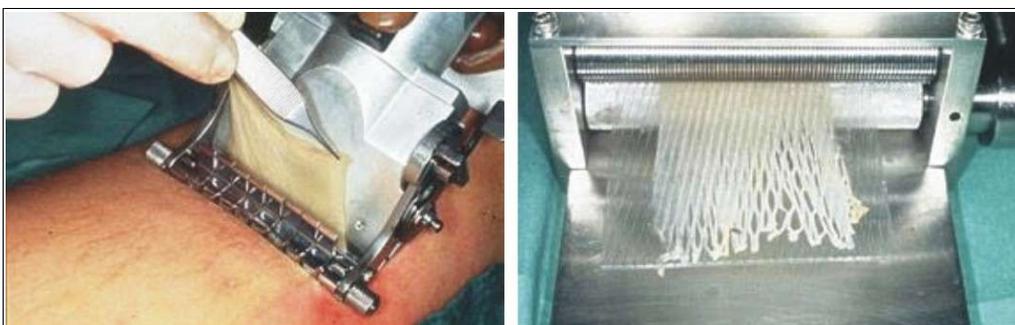
[74] Härtel P., Verbrennungen und ihre Behandlung, Krankengymnastik, München, 24. Jahrgang, 1, (1972) S. 1-6

[75] Butenandt I., Coerd I., Verbrennungen im Kindesalter, Stuttgart, Enke Verlag, (1979)

Auf der menschlichen Haut und im Darm befinden sich, für die Aufrechterhaltung der Gesundheit, erforderliche Bakterien. Diese Bakterien sind bei intakten Schleimhäuten, sowie bei der intakten Haut für den Menschen apathogen. Wenn es nun im Rahmen einer Verletzung oder eines thermischen Traumas zu einer Zerstörung der intakten Barriere (Haut) kommt, können diese lebensnotwendigen Bakterien für den Patienten pathogen werden. Neben der erforderlichen medikamentösen Behandlung einer Brandwunde kommt auch der regelmäßigen intensiven Wundreinigung, durch das Pflegepersonal, ein hoher Stellenwert zu, denn dadurch wird die Anzahl der Erreger auf der Brandwunde auf das mögliche Minimum reduziert. Hiermit sind natürlich hohe Personalkosten verbunden, so dass die Kosten für ein Verbrennungsbett in einer Spezialklinik in Deutschland bei ca. 4000,- € pro Tag liegen. Zum Vergleich, die Kosten für eine normale stationäre Behandlung liegen bei ca. 300,- € und für eine intensive medizinische Behandlung bei ca. 1200,- € (Stand 2004, BGK Boberg).

Durch die Möglichkeit einen kurzen Zeitraum in einem führenden Verbrennungszentrum bei Herrn Dr. Bisqua im Berufsgenossenschaftlichen Krankenhaus Boberg zu hospitieren, konnte ich einen praktischen Einblick in die Versorgung von Schwerbrandverletzten gewinnen. Die folgenden Ausführungen sind Bestandteil der bestmöglichen Versorgung von Verbrennungsverletzungen.

Eine Brandwunde, die operativ behandelt werden muss (Grad IIb oder III), kann nur durch eine Eigenhauttransplantation dauerhaft zur Heilung gebracht werden. Das Eigenhauttransplantat bezeichnet man als Spalthauttransplantat und wenn es weiter verarbeitet wird, bezeichnet man es als Gitter- oder „mesh graft“ Transplantat (siehe Abbildung 26). Das Gittertransplantat kann bis zu einer Vergrößerung von 10:1 vergrößert werden.



*Abbildung 26: links Spalthautentnahme an einer nicht betroffenen Hautpartie, rechts Erzeugung eines „mesh graft“ Transplantates mit einem Walzenmesser*

Im Gesicht, im Dekolleté und an den Händen wird ausschließlich Spalthaut aufgelegt. Dies hat zwei Gründe:

Das kosmetische Endergebnis ist besser als das der Gittertransplantate und die Spalthaut ist belastbarer als die Gittertransplantate.

Bei Verletzungen am Körperstamm und an den Extremitäten wird häufig das Gittertransplantat zur Anwendung kommen. Die häufigste Vergrößerung der Spalthautstücke liegt bei einem Verhältnis von 2:1 bis 3:1.

Bei den Gitter- oder mesh-graft- Transplantaten geht die Heilung oder der Wundverschluss von den Hautbrücken aus, ein Einwachsen des Transplantates dauert etwa 4 Tage. Eine vollständige Epithelisierung dauert 2-3 Wochen.

Die Behandlung des Spenderareals erfolgt nach dem Stand der Technik Postoperativ zur Blutstillung der Spalthautentnahmewunden mit kalten und warmen Wickeln und anschließend mit einer Wundabdeckung auf Basis von Salbenbandagen. Diese Folgen naturgemäß nicht dem Prinzip der feuchten Wundheilung. Hierdurch entstehen hohe Personalkosten für die tägliche aseptische Wundreinigung und Bandagenwechsel. Die verwendeten Salbenbandagen verkleben am Wundgrund, was bei einem Bandagenwechsel für den Patienten zu einer erneuten Traumatisierung des Gewebes und zu einem sehr hohen Leidensdruck führt. Des Weiteren stellen die Salbenbandagen für pathogene Keime, die von außen in die Wunde gelangen können, keine Barriere dar, so dass es häufig (trotz dem sehr hohen Pflegeaufwand) zu kleineren Infektionen in dem Wundareal kommt. Hierdurch wird die Epithelisierung der Wunde zusätzlich behindert. Die Versorgung von Brandverletzungen und Spalthautentnahmewunden basiert also auf der klassischen Wundversorgung. Durch eine geeignete Wundauflage, die das Prinzip der feuchten Wundheilung beinhaltet, müsste somit eine starke Verbesserung der Wundversorgung erreicht werden.

Bei chronischen Wunden oder Problemwunden handelt es sich meistens um wenig exudierende Wunden mit nekrotischen Belägen oder Infektion innerhalb der Wunde. Die Wunden zeichnen sich durch keine Heilungstendenz aus und sind meist in tiefere Bereiche des Gewebes vorgedrungen.

Definitionsgemäß wird eine sekundär heilende Wunde, die innerhalb von 8 Wochen keine Tendenz zur Heilung zeigt, als chronisch bezeichnet. Dabei können chronische Wunden jederzeit aus einer akuten Wunde heraus entwickelt werden, z.B. wenn persistierende Infektionen nicht erkannt werden oder die Primärversorgung inadäquat war (Abbildung 27).



*Abbildung 27: Chronische Wunde am Unterschenkel (Ulkus cruris)*

Zumeist aber stellen chronische Wunden das letzte Stadium einer fortschreitenden Gewebeerstörung dar, ausgelöst durch venöse, arterielle oder stoffwechselbedingte Gefäßleiden, durch Druckschädigungen, Strahlenschäden oder Tumore. Alle Gefäßschädigungen, auch wenn sie unterschiedlicher Genese sind, münden letztlich in Ernährungsstörungen des Hautgewebes mit zunehmender Hypoxie und Ischämie, was dann den Zelltod mit Nekrosenbildung zur Folge hat [76].

Diese Situation ist die denkbar schlechteste Ausgangsbasis für eine Wundheilung. Die Reparationsleistung der Zellen muss in einem extrem stoffwechselgeschädigten Hautgebiet gestartet werden, weshalb von Anfang an nicht gewährleistet ist, dass die „richtigen Zellen zur richtigen Zeit das Richtige tun“. In entsprechenden Untersuchungen wurde gegenüber dem Befund in einer akuten Wunde vor allem ein erheblicher Überschuss an Leukoplasten und Metalloproteinasen festgestellt. Des Weiteren weisen die meisten Geschwüre so ausgeprägte Nekrosen und Beläge auf, dass sie trotz der anhaltenden Leukozytenmasskierung nicht mehr aufgelöst werden können. Gleichzeitig infiltrieren toxische Zerfallsprodukte von Gewebe und Bakterien das umliegende Wundgebiet, was weiteren Gewebsuntergang zur Folge hat und die Chronizität der Wunde unterhält.

Ohne äußere Hilfe kann dieser Teufelskreis nicht durchbrochen werden, wobei der erste und wichtigste Schritt in einer weitestgehenden Normalisierung der Blutversorgung und Mikro-zirkulation im geschädigten Hautgebiet besteht.

Die Revasculierung kann z.B. bei Diabetisches Ulcus angiopathischer Genese oder Ulcus

---

[76] Röthel H., Vanscheid W, Basisinformationen zum Wundmanagement (I): Die Reinigung der Wunde, Hartmann Wund Forum, 1/1997, S. 24-28

cruris arteriosum durch gefäßchirurgische Verfahren sowie medikamentöse Therapien erreicht werden. Beim Diabetischen Ulcus ist zusätzlich penibel auf eine normale Blutzuckereinstellung zu achten [77].

In chronischen Wunden kommt es zusätzlich zu einem biochemischen Ungleichgewicht in den verschiedenen Phasen der Wundheilung, so dass trotz der oben genannten therapeutischen Maßnahmen und der Wundversorgung mit Wundauflagen, die als Wirkprinzip die feuchte Wundheilung beinhalten, teilweise keine Verbesserung der Wundheilung erreicht werden kann.

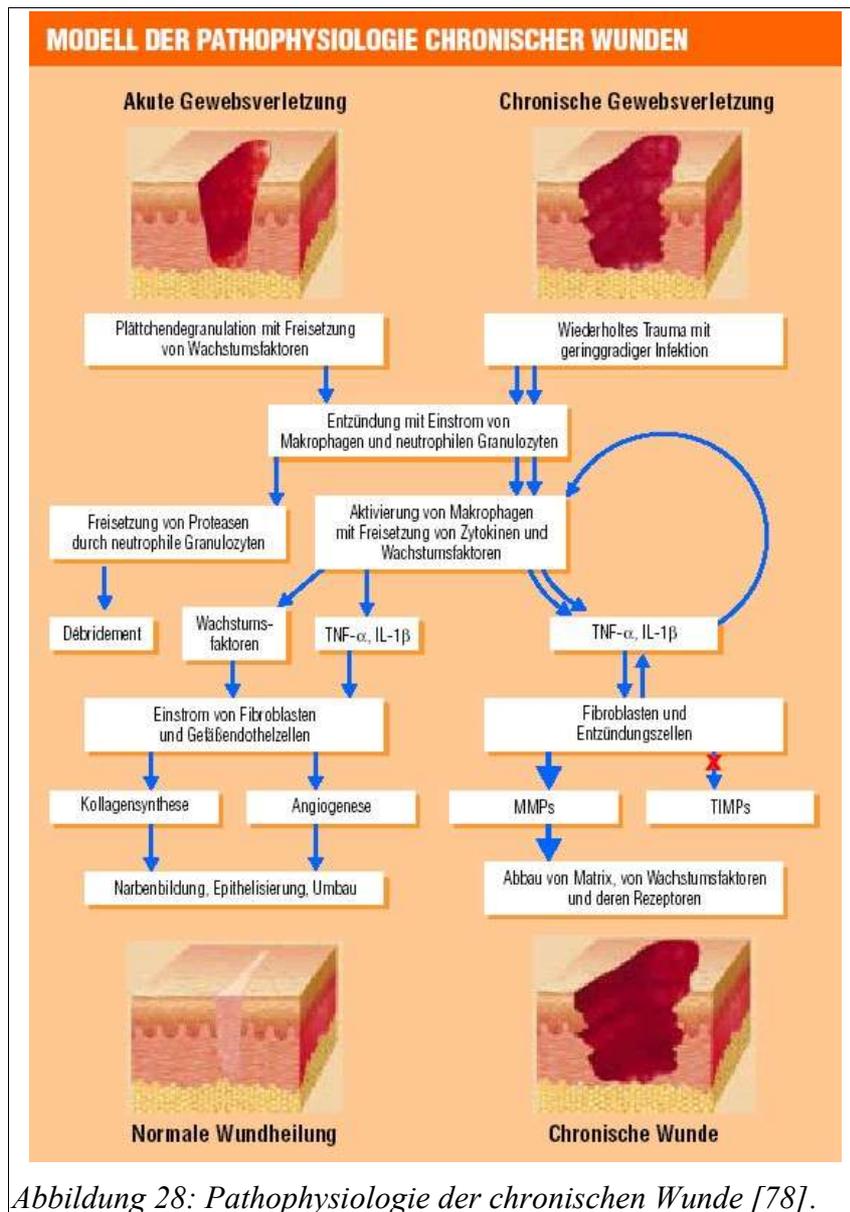
Es wurde in vitro und in vivo durchgeführten Experimenten gezeigt, dass unter anderem TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) und IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) entscheidende Wirkungen auf die Heilung von Hautwunden haben [78]. Die Wirkung von TNF- $\alpha$  ist von der Konzentration und der Expositionsdauer abhängig. Nach einmaliger Gabe einer niedrigen Dosis von TNF- $\alpha$  kann dieser die Heilung von Hautwunden durch indirekte Stimulation der Entzündung und Vermehrung der von Makrophagen produzierten Wachstumsfaktoren mäßig fördern. TNF- $\alpha$  hat jedoch, wenn in hohen Dosen oder über längere Zeit gegeben, nachteilige Wirkungen auf die Heilung von Hautwunden. Diese nachteiligen Wirkungen beruhen wahrscheinlich auf einer Kombination verschiedener Einzelwirkungen von TNF- $\alpha$ . Erstens steigert TNF- $\alpha$  seine eigene Synthese und induziert die Synthese von IL-1 $\beta$ , was dazu tendiert, die Wirkung niedriger Dosen von TNF- $\alpha$  zu verstärken und zu verlängern. Zweitens unterdrücken sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  die Synthese extrazellulärer Matrix-Proteine und TIMP's (Tissue Inhibitor of metalloproteinase – Gewebe-Metallproteinase-Inhibitor) während sie die Syntheserate der MMP's (Matrix-Metallproteinase) steigert. Diese Wirkungen von TNF- $\alpha$  könnten zu hohen Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MMP's im Wundmilieu führen (siehe Abbildung 28).

Es wurden mehrere Unterschiede zwischen den molekularen Milieus akuter und chronischer Wunden identifiziert, die eine Rolle in der Pathophysiologie chronischer Wunden spielen können (siehe Abbildung 29). In chronischen Wunden wurde – im Gegensatz zu akut heilenden Wunden – entzündungsfördernde Zytokine, hohe Proteaseaktivität und verminderte

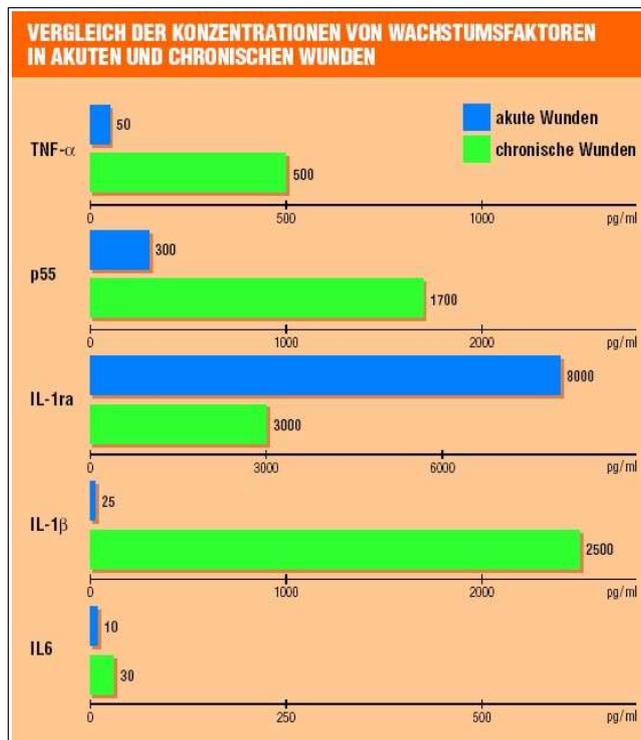
---

[77] Röthel H., Vanscheid W., Basisinformationen zum Wundmanagement (II): Defektauffüllung und Reepithelisierung, Hartmann Wund Forum, 2/1997, S. 24-28

[78] Mast B.-A., Schultz G.-S., Interaktionen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proterasen in akuten und chronischen Wunden, Hartmann Wund Forum, 3/1997, S. 16-24



Wachstumsfaktoren-Aktivität gefunden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann die Hypothese aufgestellt werden, die diese Profile in eine gemeinsame molekulare Pathophysiologie chronischer Wunden integriert (Abbildung 28).



*Abbildung 29: Vergleich verschiedener biochemischer Botenstoffe zwischen akuten und chronischen Wunden [78].*

Es liegt also auf der Hand, Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 mit entsprechenden Wirkstoffen zu blockieren. Solche Wirkstoffe finden sich seit kurzem in den Vereinigten-Staaten und Europa auf dem Markt. Als besonders erfolgreich in der Rheumatherapie haben sich bisher das Etanercept<sup>®</sup> und das Infliximab<sup>®</sup> herausgestellt.

Diese oder ähnliche Wirkstoffe könnten von der Arbeitsgruppe von Prof. Wießler des DKFZ so modifiziert werden, dass eine anschließende Diels-Alder-Reaktion an der Wundmembran ermöglicht wird.

Diese Wirkstoffe könnten dann, kovalent mit der Membran verknüpft, Zytokine blockieren ohne selbst in die Wunde zu gelangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anstatt solcher Verbindungen Modellverbindungen eingesetzt, die durch Ihren hohen sterischen Anspruch solche Wirkstoffe simuliert.

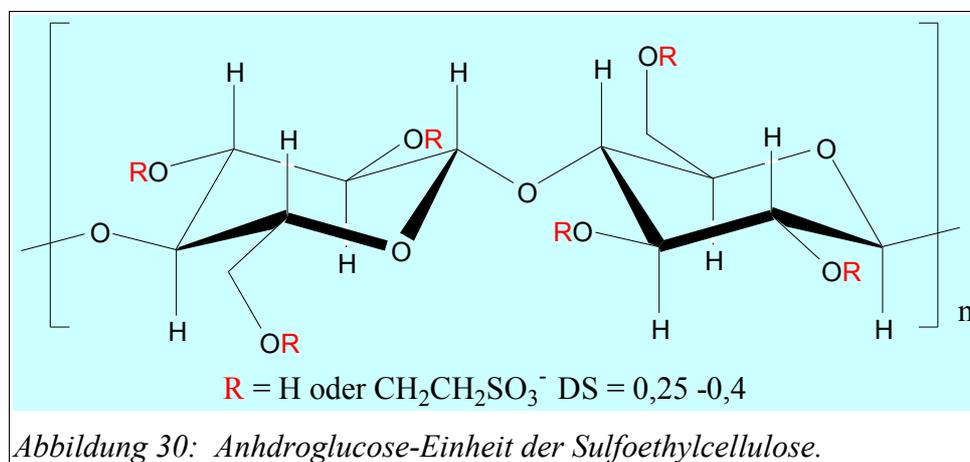
### 3 Charakterisierung der Ausgangsverbindungen

#### 3.1 Sulfoethylcellulose

Sulfoethylcellulose ist eine polyanionische Verbindung. Bei Polyanionen handelt es sich um wasserlösliche Polyelektrolyte, die in wässriger Lösung meist erst vom umgebenden Lösungsmittel deprotoniert werden und so Ihre negative Ladung erhalten. Hierzu bieten sich z.B. Sulfonsäuren an, die bei Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen in einer polymeranalogen Reaktion über Seitengruppen eingeführt werden können.

##### 3.1.1 Verwendete Sulfoethylcellulose Proben

Als polyanionische Membrankomponente wurde Sulfoethylcellulose verwendet. Es handelt sich um einen starken anionischen Polyelektrolyten auf Cellulosebasis, bei dem einige Hydroxylgruppen durch Sulfoethylgruppen substituiert sind (Abbildung 30).



Die Sulfoethylcellulose kann durch Reaktion von Alkalicellulose in einer Williamschen-Ethersynthese mit dem Natriumsalz der 2-Chlorsulfonsäure hergestellt werden. Eine weitere Synthesemöglichkeit besteht in einer Michael- analogen Reaktion mit Vinylsulfonsäure. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sulfoethylcellulose-Proben, wurden nach diesem Prinzip dargestellt (Abbildung 31).

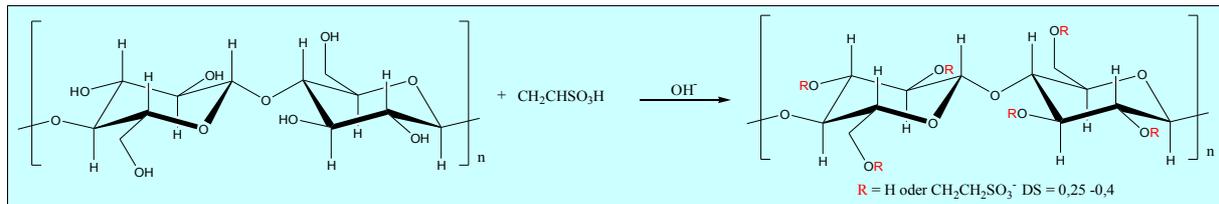


Abbildung 31: Veretherungsreaktion von Cellulose mit Vinylsulfonsäure zu Sulfoethylcellulose

Eine Substitution des Hydroxylwasserstoffes durch eine Sulfoethylgruppe kann an den Positionen C-2, C-3 und C-6 der Anhydroglucoseeinheit erfolgen, so dass ein theoretischer Substitutionsgrad von drei pro Glykosidring erreicht werden kann. Bei den hier verwendeten Proben liegt ein durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS) von 0,25-0,4 vor. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der Substitutionspositionen entsteht eine ungleichförmige Verteilung der Substituenten entlang und zwischen den Ketten.

Die effektive Substitutionsgeschwindigkeit ist an C-6 am größten vor C-2 und C-3 ( $k_6$ : 5,  $k_2$ : 3,  $k_3$ : 1). Dies kann mit dem sterischen Anspruch der voluminösen Sulfoethylcellulose erklärt werden [79]. Die Sulfoethylcellulose weist schon bei einem DS von 0,2-0,5 eine gute Wasserlöslichkeit auf, was auf eine gleichmäßige Verteilung der Substituenten entlang der Polymerkette hindeutet.

Die verwendeten Proben unterscheiden sich in ihren molekularen Parametern, wobei der Bereich der Substitution relativ klein gewählt wurde, da sich Membranen nur in einem DS-Bereich von 0,25 bis 0,45 gut bilden. Bei geringeren Substitutionsgraden ist das Cellulosederivat in Wasser schlecht löslich. Bei höheren bilden die Ketten eine höhere Anzahl von Netzwerkpunkten und es bilden sich unzusammenhängende Flocken.

Bei den eingesetzten Sulfoethylcellulose Proben handelt es sich um ein feines weißes Pulver, die von der Firma Wolff-Cellulosics zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Bestimmung des Trockengehaltes wurden die Proben bei 110°C im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet (ca. 2-3 Tage).

Der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad der Chitosanproben wurde mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie bestimmt. Außerdem konnte noch der regiospezifische Substitutionsgrad (RS) bestimmt werden. Alle Sulfoethylcellulose Proben wurden ca. 2 Stunden mit Hilfe einer Ultraschallsonde bei intensiver Kühlung degradiert um thermische Kettenbrüche nahezu auszuschließen. Anschließend wurde die wässrige Lösung ca. 45 min bei 13.000 U/min

[79] Kull W., Kulicke W.-M., Dissertation, Universität Hamburg, (1996)

zentrifugiert um den Metallabrieb der Ultraschallsonde abzutrennen. Diese so erhaltene Lösung wurde einige Tage an der Lyophilie gefriergetrocknet. Der so erhaltene Schaum wurde für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Der Staudinger-Index ( $[\eta]$ ) wurde durch eine Konzentrationsreihe mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters bestimmt.



Abbildung 32: Makrogele einer 0,1 % Sulfoethylcellulose Lösung auf einer Glasoberfläche.

Sulfoethylcellulose, mit den hier verwendeten durchschnittlichen Substitutionsgraden, löst sich in wässrigen Systemen wie viele andere Cellulosederivate nicht vollständig molekulardispers. Es entstehen visuell erkennbare Makrogele ( $> 500\text{nm}$ ) und mit bloßem Auge nicht erkennbare Mikrogele ( $< 500\text{nm}$ ) (siehe Abbildung 32).

<b>SEC- Probe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Trockengehalt [%]	86,9	86,7	90,4	90,1	90,4
DS-Wert	0,51	0,34	0,36	0,4	0,4
RS Position 6	53 %	67 %	49 %	55 %	57 %
RS Position 3	29 %	20 %	30 %	28 %	28 %
RS Position 2	17 %	13 %	21 %	17 %	15 %
$[\eta]$ [ml/g]	582	608,7	419,6	434,2	530
$K_H^* [\eta]^2$	164.300	145.700	68.260	55.020	117.710
$c_{\text{kritisch}}$ (visko.) [%]	0,43	0,41	0,59	0,57	0,47
$M_\eta$ [g/mol]	253.000	266.000	180.000	186.000	230.000

Tabelle 6: Eingesetzte Sulfoethylcellulose-Proben (SEC) mit Angabe ausgewählter molekularer Parameter

$M_\eta$  wurde berechnet mit:  $[\eta] = 4,28 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0,95}$  [124].

### 3.1.2 NMR-Untersuchungen

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Substitutionsgrades kann ein  $^1\text{H}$ - und ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum genutzt werden. Hierbei werden die Integrale der Seitengruppen Signale bestimmt und mit dem polymeren Rückgrat ins Verhältnis gesetzt.

Durch das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum kann zusätzlich das prozentuale Verhältnis der Positionen bestimmt werden, an denen die Substituenten an die Anhydroglucoseeinheit gebunden sind. Hierfür kommen die Positionen C-2, C-3 und C-6 in Frage. Dieses Verhältnis der Substituentenverteilung wird regiospezifischer Substitutionsgrad (RS) genannt. Die nachfolgende Anhydroglucoseeinheit der Sulfoethylcellulose in Abbildung 33 soll als Legende für die NMR-Spektren dienen.

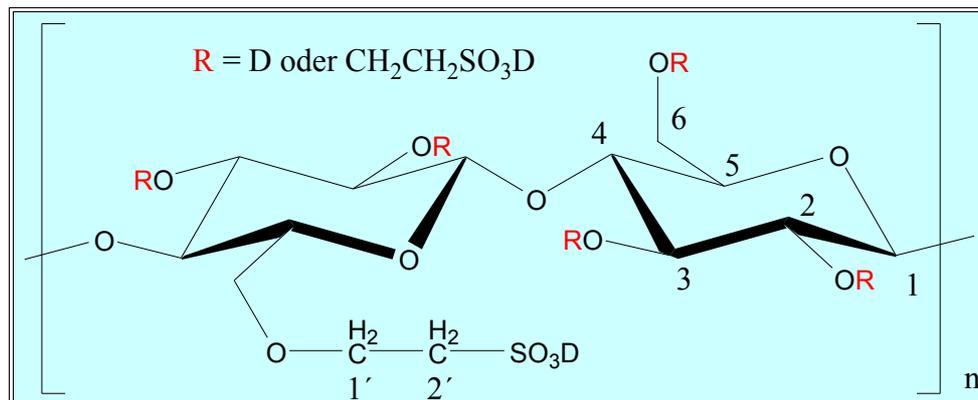
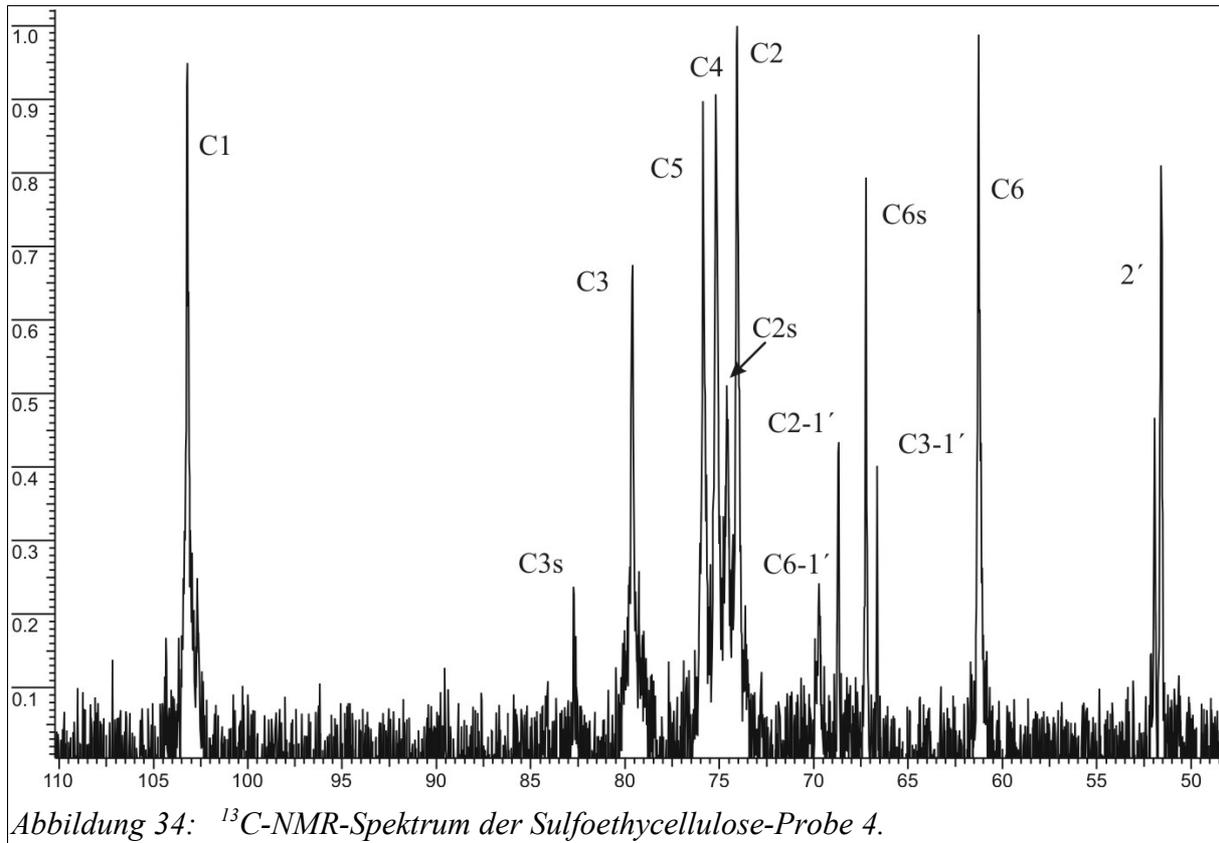


Abbildung 33: Struktur der Anhydroglucoseeinheit der Sulfoethylcellulose mit Bezeichnung der Positionen für die NMR-Spektroskopie.



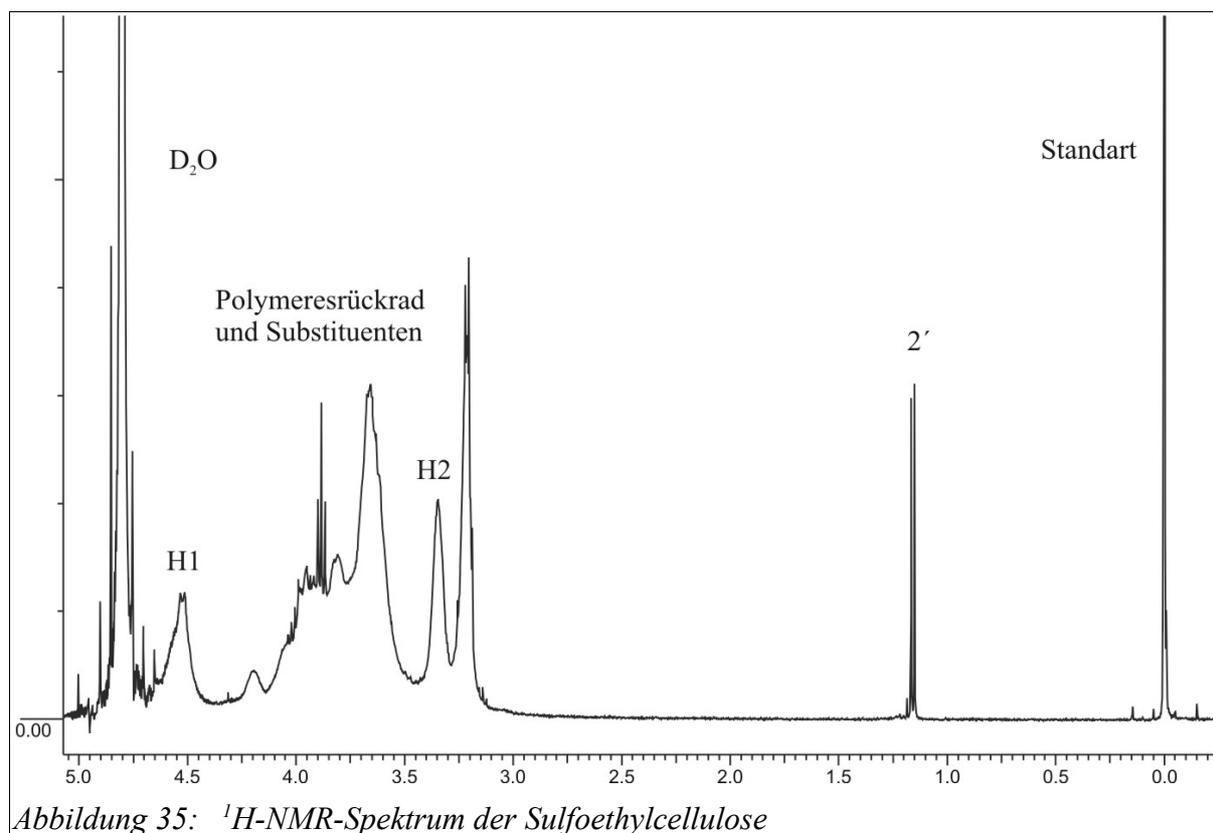
$^{13}\text{C}$ -NMR (100,62 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 51,54, 51,94$  (s,  $2'$ );  $61,26$  (s,  $\text{C}_6$ );  $66,64$  ( $\text{C}_3-1'$ );  $67,24$  (s,  $\text{C}_6-1'$ );  $68,69$  ( $\text{C}_2-1'$ );  $69,21$  (s,  $\text{C}_6-1'$ );  $74,07$  (s,  $\text{C}_2$ );  $74,62$  (s,  $\text{C}_4-1'$ );  $75,19$  (s,  $\text{C}_4$ );  $75,87$  (s,  $\text{C}_5$ );  $79,61$  ( $\text{C}_3$ );  $82,75$  (s,  $\text{C}_3-1'$ );  $103,21$  (s,  $\text{C}_1$ ) ppm.

Die Sulfoethylcellulose wurde für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen ca. 1 Stunde ultraschalldegradiert, um die Viskosität der Lösung zu verringern.

Es kann mit Hilfe des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums die prozentuale Verteilung der Sulfoethylgruppen entlang der Cellulosekette bestimmt werden. Die prozentuale Verteilung entlang der Kette entspricht gut der Vorstellung, dass die effektive Substitutionsgeschwindigkeit an C-6 am größten vor C-2 und C-3 ( $k_6: 5, k_2: 3, k_3: 1$ ) ist.

Tabelle 7: Angabe des spezifischen Substitutionsgrades an den Sulfoethylcellulose-Proben.

SEC- Probe	1	2	3	4	5
DS-Wert	0,51	0,34	0,36	0,4	0,4
RS an Position 6	53 %	67 %	49 %	55 %	57 %
RS an Position 2	29 %	20 %	30 %	28 %	28 %
RS an Position 3	17 %	13 %	21 %	17 %	15 %



$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1,17$  (q, H-1'); 3,3 (s, H-2), 3,5-4,25 (m); 4,52 (s, H-1) ppm.

### 3.1.3 Viskosimetrie

Der Staudinger-Index ( $[\eta]$ ) wurde durch eine Konzentrationsreihe mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters des Typs Ic bestimmt. Als Lösungsmittel für die Viskosimetrie wurde eine Lösung aus 0,1 mol Natriumnitrat verwendet. Hierbei ist darauf zu achten, die Sulfoethylcellulose erst in dest. Wasser zu lösen und dann anschließend das Natriumnitrat zuzugeben. Wird die Sulfoethylcellulose direkt in eine 0,1 molaren Natriumnitratlösung gelöst bilden sich zum größten Teil makroskopische Gelkugeln, die die Messung stark verfälschen. Die so hergestellte Lösung wird durch einem Nylonfilter der Firma Millipore mit einer Maschenweite von 20  $\mu\text{m}$  filtriert. Hierdurch werden selektiv größere Bestandteile wie z.B. Makrogele, Cellulosepartikel usw. aus der Lösung entfernt. Die viskosimetrische Molmasse ( $M_\eta$ ) konnte durch bekannte  $[\eta]$ -M-Beziehungen ermittelt werden (Abbildung 36). Die hier verwendete  $[\eta]$ -M-Beziehung, wurde durch Lichtstreu-Untersuchungen an methylierter Sulfoethylcellulose (polymeranalogen Umsetzung) erhalten.

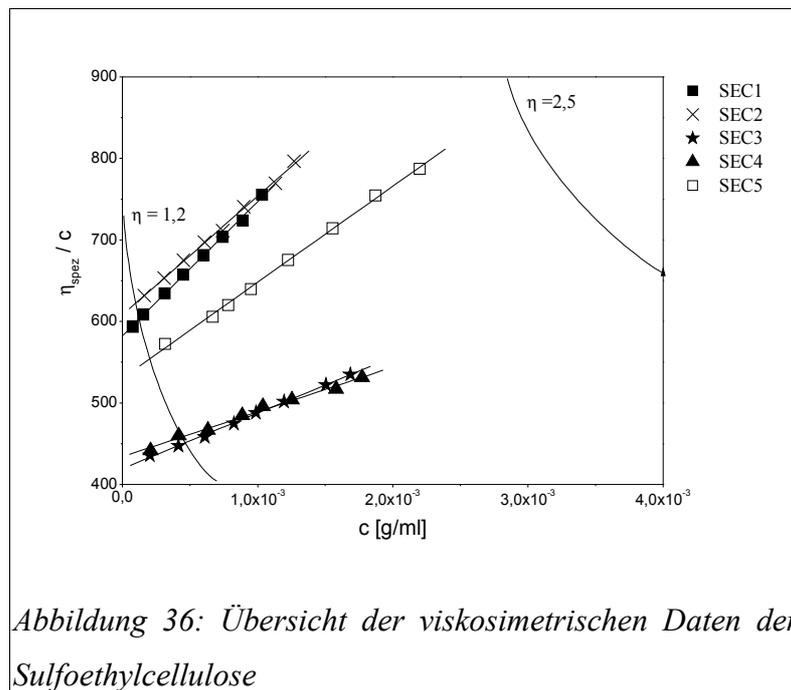


Abbildung 36: Übersicht der viskosimetrischen Daten der Sulfoethylcellulose

Durch diese Hydrophobierung der Sulfoethylcellulose können sich keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Sulfoethylcellulose ausbilden. Diese Proben lösen sich demzufolge molekulardispers, und geben so die Molmasse des Einzelmoleküls wieder [80].

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse aus den viskosimetrisch ermittelten Parametern der eingesetzten Sulfoethylcellulose-Proben (SEC)

SEC- Probe	1	2	3	4	5
Trockengehalt [%]	86,9	86,7	90,4	90,1	90,1
DS-Wert	0,51	0,34	0,36	0,4	0,4
$[\eta]$ [ml/g]	582	608,7	419,6	434,2	530,4
$M_{\eta}$ [g/mol]	253.000	266.000	180.000	186.000	230.000
DP	1.980	2.070	1.400	1.450	1.800
$k_H$	0,48	0,39	0,39	0,29	0,42
$k_H^*$ [ $\eta$ ] <sup>2</sup>	164.300	145.700	68.300	55.000	117.700
$c_{\text{kritisch}}$ (visko.) [%]	0,43	0,41	0,59	0,57	0,47
Knäueldur. [nm]	58	60	46	47	54
Knäuelvol. [nm <sup>3</sup> ]	101.700	110.900	52.000	55.600	83.900
Knäueld. [g/cm <sup>3</sup> ]	0,0043	0,0041	0,0060	0,0057	0,0047
Regression	0,9992	0,9988	0,9991	0,9948	0,9991

$M_{\eta}$  wurde berechnet mit:  $[\eta] = 4,28 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0,95}$  [124].

### 3.1.4 Lichtstreuung

Bei der Sulfoethylcellulose handelt es sich um aggregathaltige Systeme, deren Charakterisierung sich komplizierter als bei molekular dispers gelösten Systemen gestaltet. Es existieren Molekülverbände, die entsprechend ihrer Größe in Mikrogele (<500 nm) und Makrogele (>500 nm) eingeteilt werden können. Zur Aufklärung der Lösungsstruktur ist nicht nur die Struktur eines Moleküls, sondern die des Gesamtsystems heranzuziehen. Für viele Anwendungen sind gerade diese übergeordneten Strukturen von Bedeutung.

Beim Lösen in wässrigen Medien bilden sich je nach Molmasse und Substitutionsgrad beim Lösungsprozess unterschiedlich große Aggregate. Große Aggregate (Makrogele) können durch filtrieren oder zentrifugieren aus der Lösung abgetrennt werden. Kleine Aggregate (Mikrogele) werden offensichtlich nicht bei der Probenpräparation abgetrennt und führen zu Störungen beim Elutionsprozeß der Größenausschlußchromatographie.

Mit geringerem Substitutionsgrad wird die Ausbildung von Aggregaten begünstigt. Mit sinkendem Substitutionsgrad sind immer geringere elektrostatische Abstoßungskräfte und eine größere Zahl an aggregatfördernden, intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den nicht modifizierten Celluloseketten vorhanden. Die Teilchen weisen eine immer kompaktere Struktur auf, wobei ein Übergang von molekular dispers gelösten Polymeren zu lockeren und weiter zu kompakten Partikeln erfolgt. Bei den verwendeten niedrigen Substitutionsgraden sind molekular dispers gelöste Proben nur durch polymeranaloge Umsetzungen (z.B. Methylierung) zu erhalten, die die intramolekularen Wechselwirkungen herabsetzen [80].

Wie bereits oben erwähnt sind für viele Anwendungen -dies schließt die Symplexbildung ein- die übergeordneten Strukturen von Bedeutung. Wie bereits im Theorieteil erwähnt (Kapitel 4.2), trägt die „reale“ Lösungsstruktur der Sulfoethylcellulose maßgeblich bei der Bildung der Netzwerkstrukturen der Symplexe bei. Dies tritt insbesondere bei der Verwendung von Polykationen mit kleiner Molmasse auf, die für die Netzwerkstruktur der Symplexe nur einen untergeordneten Beitrag leisten können.

Die Lichtstreuuntersuchungen aller Sulfoethylcelluloseproben wurden in wäßriger 0,1 mol/l

---

[80] S. Knop, H. Thielking, W.-M. Kulicke, Symplex Membranes of Sulphoethylcellulose and Poly (diallyldimethylammonium chloride) for the Pervaporation of Water-Alcohol Mixtures, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 77, (2000), S. 3169-3177

Natriumnitrat-Lösung mit 200 ppm Natrumazid durchgeführt, um den Polyelektrolyteffekt bei verdünnten Lösungen zu kompensieren. Als Brechungsindexinkrement wurde für alle Proben mit  $dn/dc = 0,161 \text{ ml/g}$  ein typischer Wert für Cellulosederivate gewählt [81] [82] [83]. Zur Abtrennung makroskopischer Verunreinigungen und der enthaltenen Makrogelpartikel wurde die gelöste Probe 45 min. zentrifugiert.

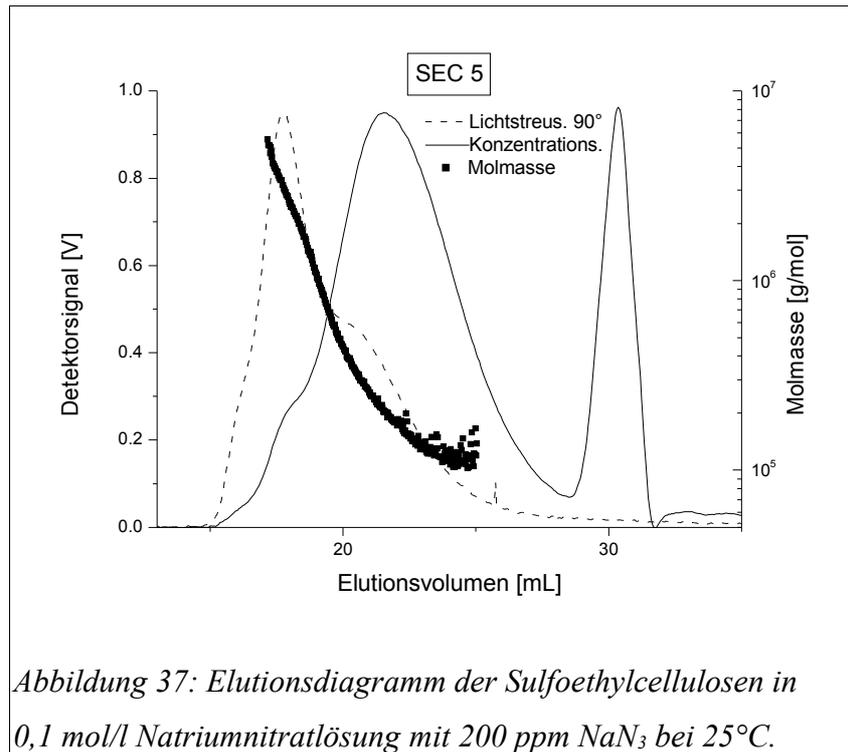


Abbildung 37: Elutionsdiagramm der Sulfoethylcellulosen in 0,1 mol/l Natriumnitratlösung mit 200 ppm  $\text{NaN}_3$  bei 25°C.

Abbildung 37 zeigt anhand der Probe SEC 5 das für die hier untersuchten Proben charakteristische Elutionsdiagramm mit einem Aggregatanteil zu Beginn der Messung. Bei der Untersuchung von diesen technischen Proben fällt ein sehr großes Konzentrationssignal bei einem Elutionsvolumen von 30 ml auf. Hierbei handelt es sich um die in dem Polymer enthaltenen Salze die bei dem Herstellungsprozess als Nebenprodukte entstehen. Dieses Konzentrationssignal der enthaltenen Salze geht in das Konzentrationssignal der Polymerlösungen direkt ineinander über. Hierdurch kann die Bestimmung der Molmasse und deren Verteilungen zu verfälschten Ergebnissen führen. Aufgrund dessen wurden alle Sulfoethylcellulosen mit Hilfe eines Dialyseschlauches mit einem „molecular weight cut off“ von 15.000 g/mol über einen Zeitraum von 24 Stunden dialysiert und anschließend

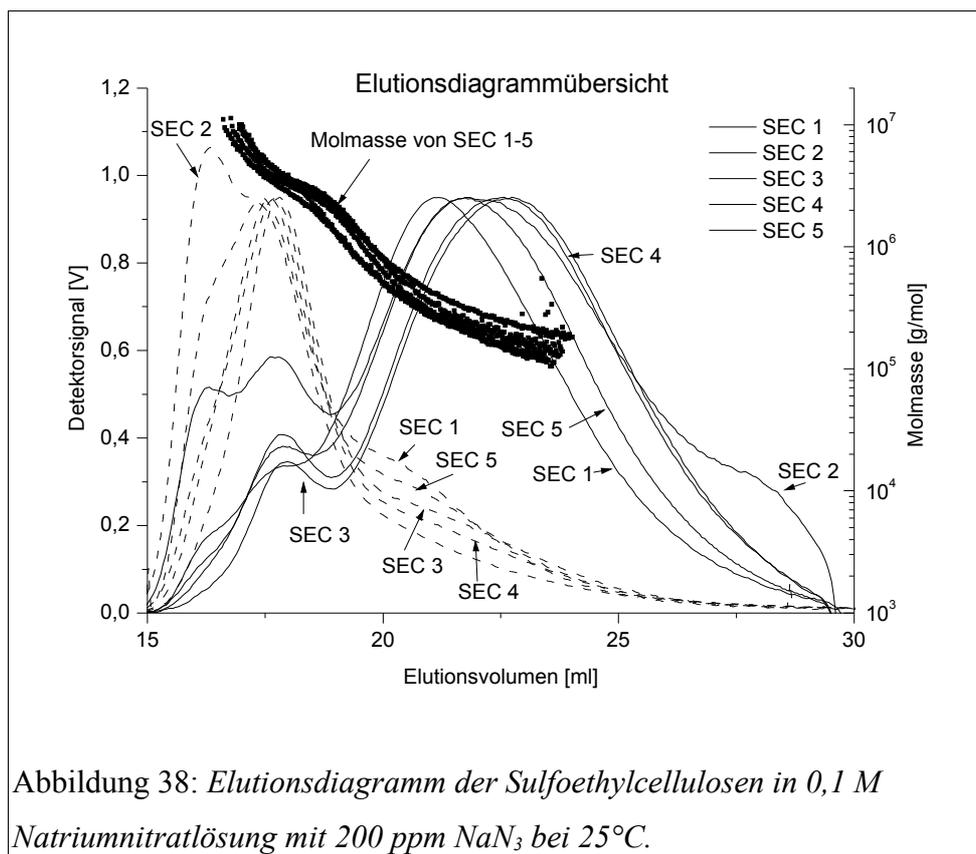
[81]Kaiser U., Dissertation, Universität Hamburg, 1991

[82]Adolphi U., Dissertation, Universität Hamburg, 1996

[83]Bartsch S., Dissertation, Universität Hamburg, 1998

gefriergetrocknet. Die so dialysierten Proben enthalten keine ionischen Verbindungen.

In Abbildung 38 ist eine Gesamtübersicht aller Sulfoethylcellulosen dargestellt. Hierbei stellt die gestrichelte Linie das Lichtstreusignal und die durchgezogene dünne Linie das Konzentrationssignal dar. Außerdem wurden in die Übersicht die Molmassen für jede Fraktion in die Abbildung eingepasst (dicke durchgezogene Linie).



Alle so untersuchten Sulfoethylcelluloseproben zeigen eine bimodale oder sogar multimodale Verteilung der Molmasse. So zeigen alle Proben bei einem Elutionsvolumen zwischen 15 - 18 ml einen sehr starken Anstieg des Lichtstreusignals bei einem gleichzeitig geringen Anstieg des Konzentrationssignals. Diese sehr großen Polymerknäule, die bei der Größenausschluß-Chromatographie zuerst eluiert werden, weisen auf eine Aggregatbildung der Sulfoethylcellulose hin. Anschließend erfolgt die Elution der zunehmend kleiner werdenden Polymere, wobei hierbei ein sehr großes Konzentrationssignal neben einem stark abflachenden Lichtsteusignal zu beobachten ist. Das ausgeprägte Konzentrationssignal zeigt, dass ein Großteil der Sulfoethylcellulose (ca. 80 %) molekular dispers gelöst vorliegt. Das geringe Lichtsteusignal entsteht durch das zunehmend geringere Lichtstreuvermögen der immer kleiner werdenden Polymerknäule im Elutionsmittel.

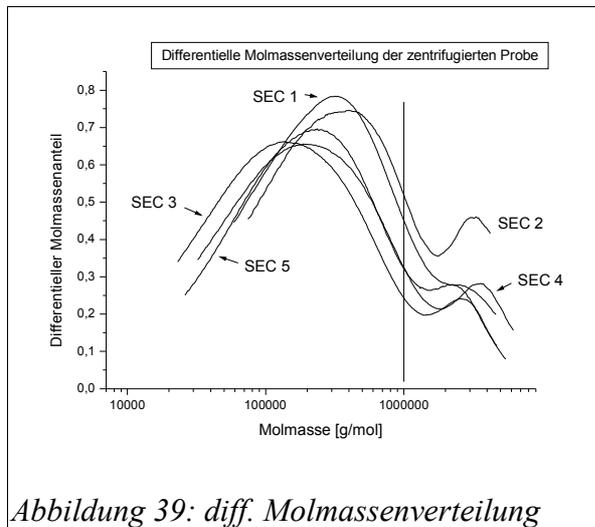


Abbildung 39: diff. Molmassenverteilung

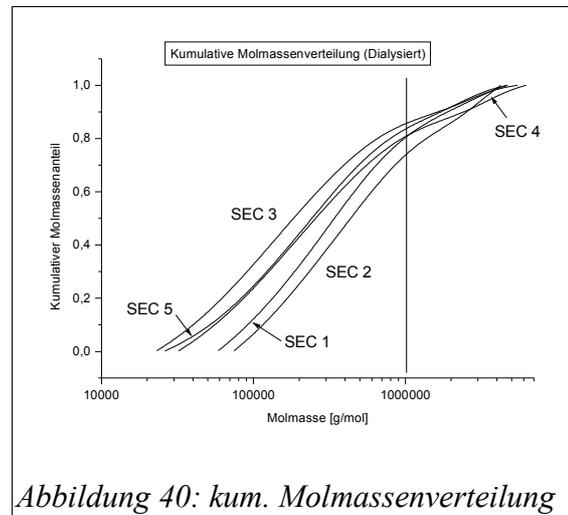


Abbildung 40: kum. Molmassenverteilung

Durch die Bestimmung der Molmasse aus den Lichtstreuendaten ist es für jede Fraktion möglich die Molmassenverteilung zu ermitteln. In Abbildung 39 ist die differentielle Molmassenverteilung für die Sulfoethylcellulosen dargestellt. Die senkrechte schwarze Linie in den oben gezeigten Graphen stellt die maximale Molmasse für Cellulose aus natürlichen Quellen wie z.B. Holz oder Baumwolle dar. In Abbildung 40 ist die kumulative Molmassenverteilung der Sulfoethylcellulosen abgebildet. Es zeigt sich, dass 17-25 % der Sulfoethylcellulosen eine Molmasse über 1.000.000 g/mol aufweisen. Diese hohe Molmasse kann demnach nur durch Aggregation der Polymerknäule, hauptsächlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen werden. Durch den geringen Substitutionsgrad der Sulfoethylcellulose und der damit verbundenen geringen Ionizität der Polymere, bilden sich aufgrund einer nicht ausreichenden ionischen Abstoßung der Polymerknäule, polymere Cluster aus mehreren einzelnen Molekülen. Die Tabelle 9 gibt einen Übersicht, über sie bestimmte gewichtsmittleren Molmasse ( $M_w$ ), Polydispersität ( $M_w/M_n$ ), Molekülradius ( $R_z$ ), Wiederfindungsrate (WR) und der verwendeten Auswertungsmethode für die Sulfoethylcellulose an.

<i>Probe</i>	$M_w$ [g/mol]	$M_w/M_n$	$R_G$ [nm]	$WR$ [%]	<i>Auswertung</i>
SEC 1	637.000	3,2	96	72,8	Zimm 1.Ordnung
SEC 2	1.238.000	5	50	70,8	Debey 1.Ordnung
SEC 3	643.200	4,4	83	79,1	Zimm 1.Ordnung
SEC 4	769.400	4,4	84	75,3	Zimm 1.Ordnung
SEC 5	511.400	3,9	82	80	Zimm 1.Ordnung

Tabelle 9: Übersicht der Molmasse ( $M_w$ ), Molmassenverteilung ( $M_w/M_n$ ), Gyrationradius ( $R_G$ ), Wiederfindungsrate ( $WR$ ) und der verwendeten Auswertungsmethode

Bedingt durch die hohen Scherfelder - die innerhalb einer Größenausschluß-Chromatographie-Säule auftreten - kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der polymeren Cluster degradiert werden. Um ein möglichst genaues Bild der Cluster-Bildungstendenzen zu erhalten, wurden die Sulfoethylcellulose Proben zusätzlich mit Hilfe der asymmetrischen Feld-Fluss-Fraktionierung untersucht. Bei dieser Fraktionierungsmethode treten keine störenden Scherfelder auf.

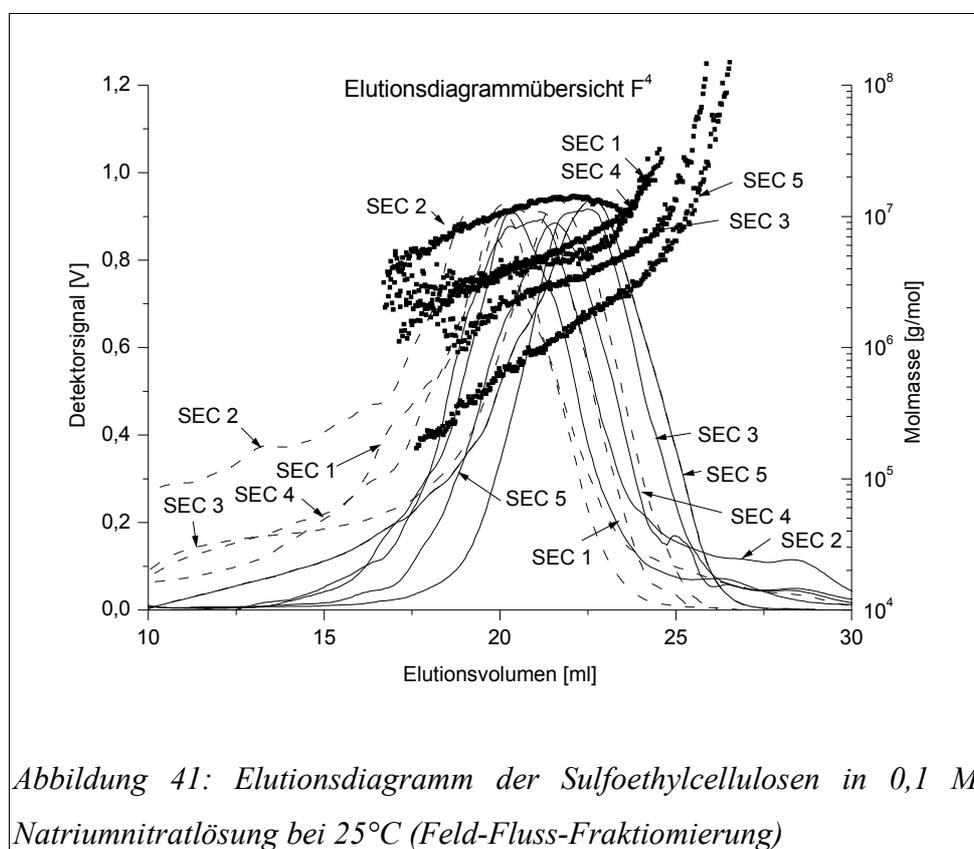


Abbildung 41 zeigt, dass für die hier untersuchten Proben charakteristische Elutionsdiagramm

der Feld-Fluss-Fraktionierung. Hierbei tritt im Gegensatz zu der Größenausschlusschromatographie keine bimodale Verteilung auf. Es wird jedoch mit dieser Methode eine wesentlich höhere Molmasse ermittelt. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um Aggregate handelt.

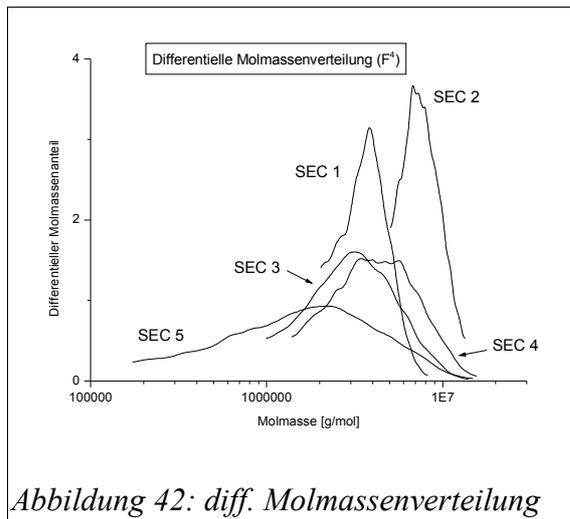


Abbildung 42: diff. Molmassenverteilung

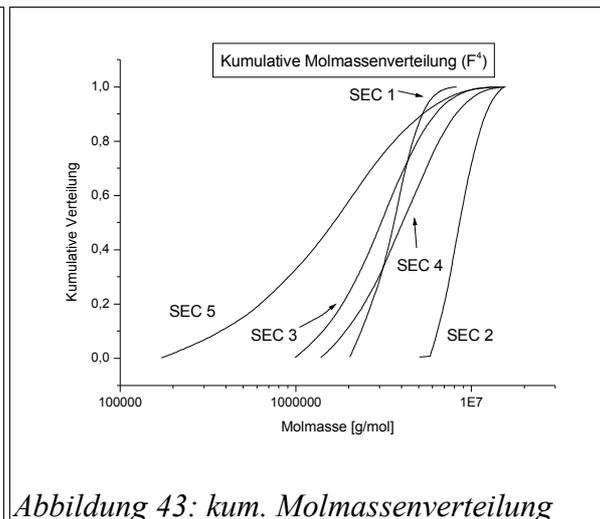


Abbildung 43: kum. Molmassenverteilung

Durch das Trennprinzip der Feld-Fluss-Fraktionierung entsteht im Gegensatz zur Größenausschlusschromatographie kein hohes Dehnströmfeld während des Trennprozesses. Hierdurch wird ein Degradieren der labilen polymeren Cluster verhindert und es werden naturgemäß wesentlich höhere Werte für die Molmasse gefunden. Hierbei entspricht die Molmasse nicht einem molekular dispers gelösten Einzelmolekül sondern dem polymeren Cluster. Wenn die viskosimetrischen Molmassen der Sulfoethylcellulosen bzw. der niedermolekulare Molmassen-Anteil aus der Größenausschlusschromatographie (ca. 80 %), die zwischen 180.000–300.000 g/mol liegen, als die Molmasse des Einzelmoleküls angesehen werden kann, ist es möglich, die Cluster Bildungsneigung (CB) zu bestimmen. Die Cluster Bildungsneigung gibt die Anzahl der Einzelmoleküle an die sich zu Aggregaten zusammengeschlossen haben. Dieser Wert sollte nicht als absolute Größe verstanden werden, sondern als eine Neigung in dem verwendeten Lösungsmittel Aggregate zu bilden. Um die Makro- und Mikrogele die bei dieser Bestimmungsmethoden mit erfasst werden sollen nicht abzutrennen, wurde die Probe nur durch einen 20 µm Filter filtriert. Hierdurch werden nur größere Partikel aus der Lösung entfernt. In Tabelle 10 ist die Übersicht der Molmasse, Molmassenverteilung und der Teilchengröße der Sulfoethylcellulose die mit F<sup>4</sup>-bestimmt wurde aufgeführt.

<i>Probe</i>	<i>M<sub>w</sub> [g/mol]</i>	<i>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></i>	<i>R<sub>G</sub> [nm]</i>	<i>CB</i>	<i>DS</i>	<i>Auswertung</i>
SEC 1	3.810.000	1,91	126	15	0,51	Berry 1.Ordnung
SEC 2	8.350.000	1,86	139	31	0,34	Berry 1.Ordnung
SEC 3	3.510.000	2,80	108	20	0,36	Berry 1.Ordnung
SEC 4	4.570.000	2,78	108	26	0,4	Berry 1.Ordnung
SEC 5	2.640.000	4,29	145	12	0,4	Berry 1.Ordnung

*Tabelle 10: Übersicht der Molmasse ( $M_w$ ), Molmassenverteilung ( $M_w/M_n$ ), Gyrationradius ( $R_G$ ), Cluster Bildungsneigung ( $CB$ ), durchschnittlicher Substitutionsgrad ( $DS$ ) und der verwendeten Auswertungsmethode – Bestimmt mit  $F^4$ .*

Es zeigt sich, dass mit zunehmenden durchschnittlichen Substitutionsgrad die Neigung Aggregate zu bilden abnimmt. So zeigt die Sulfoethylcellulose Probe SEC 2 mit dem geringsten DS-Wert auch die größte Molmasse bei dieser Bestimmungsmethode. Dies ist auf eine Aggregatbildung der Sulfoethylcellulose durch die hohe Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Eine Ausnahme stellt die Probe 5 dar, die bei der Feld-Fluss-Fraktionierung die größte Verteilung aufweist.

Es zeigt sich, dass es sich um labile Aggregate handelt die bei höheren Scherfeldern zum Teil zerstört werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Lichtstreuung zeigt sich, dass bei der Feld-Fluss-Fraktionierung keine bi- oder multimodale Verteilungen auftreten. Es werden jedoch wesentlich größere Werte für die Molmasse der Sulfoethylcellulose erhalten. Aufgrund der hohen Werte kann davon ausgegangen werden, dass sich fast ausschließlich um Aggregate handelt. Diese Neigung Aggregate zu bilden hat auch einen Einfluss auf die Erzeugung von Symplexmembranen insbesondere, wenn Polykationen geringer Molmasse zu Einsatz kommen. Hierdurch wird die Struktur des interpenetrierenden Netzwerkes maßgeblich durch die Knäuelgröße und damit auch Aggregatgröße der Sulfoethylcellulose bestimmt.

### 3.1.5 Lösungsstruktur

Die Lösungsstruktur beeinflusst das Fließverhalten von Polymerlösungen. Bei der Synthese der Symplexmembranen aus einem Polykation und einem Polyanion spielen die Ausstreichereigenschaften der Polymerlösungen eine große Rolle, da von den Fließereigenschaften die Güte des entstehenden Filmes abhängt. Bei zu niedrig oder hoch viskosen oder elastischen Lösungen kann kein ebenmäßiger Film ausgezogen werden. Dies

spielt insbesondere bei hohen Auftragungsgeschwindigkeiten, wie sie bei der technischen Membranherstellung erreicht werden eine Rolle. Aus den rheologischen Untersuchungen können Anhaltspunkte für die Lösungsstruktur der Proben erhalten werden, die Einflüsse auf das Verhalten der Ausgangslösungen während der Synthese oder auf Eigenschaften der Membranen haben können.

Für die Sulfoethylcellulose-Proben wurden Schermessungen bei 25°C durchgeführt. Es wurde die Konzentration der verwendeten Sulfoethylcellulose von 1 % bis 3 % variiert.

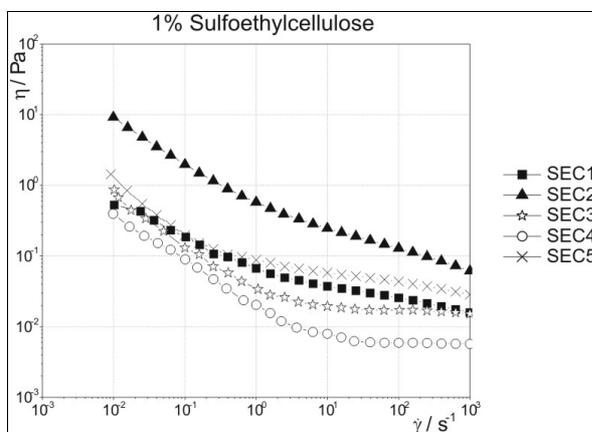


Abbildung 44: Vergleich der Fließeigenschaften einer 1 % SEC-Lösung (Probe 1-5)

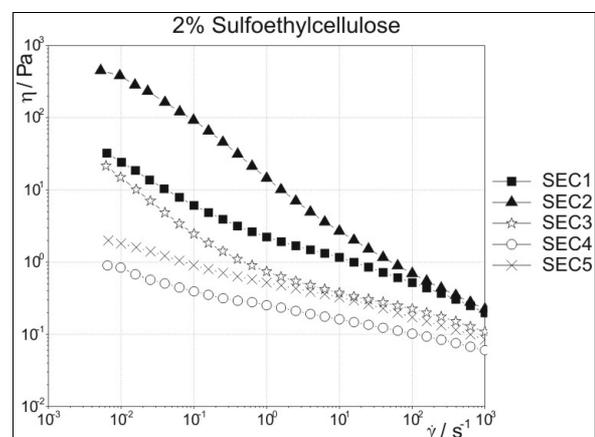


Abbildung 45: Vergleich der Fließeigenschaften einer 2 % SEC-Lösung (Probe 1-5)

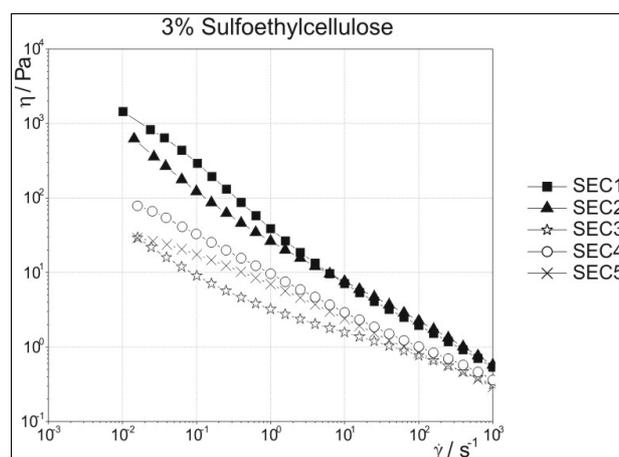


Abbildung 46: Vergleich der Fließeigenschaften einer 3 % SEC-Lösung (Probe 1-5)

Die Fließkurven der Sulfoethylcellulose Proben bei unterschiedlichen Konzentrationen sind in

Abbildung 44 bis Abbildung 46 dargestellt. Mit zunehmender Konzentration der Lösung steigt erwartungsgemäß die Viskosität an. Alle Proben verhalten sich strukturviskos. Die Viskosität nimmt mit zunehmender Schergeschwindigkeit ab. Im direkten Vergleich der Proben untereinander fällt auf, dass sich die Viskositätsergiebigkeit der Sulfoethylcellulose in Abhängigkeit der Konzentration der Lösung stark verändert. So zeigt z.B. die Sulfoethylcellulose 2 bei einer 1 % und 2 % Lösung die höchste Viskositätsergiebigkeit. Diese wird jedoch bei einer 3 % Lösung von der Sulfoethylcellulose 1 übertroffen. Insbesondere bei kleinen Lösungskonzentrationen leistet die Molmasse der Substanzen einen starken Beitrag zu der Viskositätsergiebigkeit. Die Tendenz Aggregate zu bilden, wird dagegen stärker von dem DS-Wert der Proben beeinflusst, die mit abnehmenden DS-Werten zunimmt. Insbesondere bei hohen Lösungskonzentrationen wird die Viskositätsergiebigkeit sowohl von der Molmasse als auch von der Tendenz zur Aggregatbildung beeinflusst. Hierdurch kann sich die Viskositätsergiebigkeit der einzelnen Proben stark verändern.

## 3.2 Chitosan

Für die Symplexmbranherstellung wurde als polykationische Komponente Chitosan in einer sauren wässrigen Lösung verwendet. Zur Herstellung von Chitosanmembranen wurde eine essigsäure 2-3 % Chitosanlösung verwendet.

### 3.2.1 Chitosan - Vorkommen und Herstellung

Cellulose und deren Derivate stellen quantitativ die größte und, Chitin und deren Derivate (z.B. Chitosan) stellen die zweitgrößte Quelle an nachwachsenden Rohstoffen dar [84] [85]. Da bei solchen Verbindungen eine hervorragende biologische Verträglichkeit wie z.B. geringe Toxizität, dermatologische Verträglichkeit und biologische Abbaubarkeit gegeben ist, sind in letzter Zeit starke Forschungsanstrengungen auf diesem Gebiet unternommen worden [86]. Chitosan wurde 1859 zum ersten mal von Rouget als „modifiziertes Chitin“ entdeckt und 35 Jahre später von Hoppe und Seyler (1894) in Chitosan umbenannt [87]. Bei Chitosan bzw. Chitin handelt es sich um ein Copolymer von 2-Aminodesoxy-*D*-glucose und 2-Acetamido-2-

---

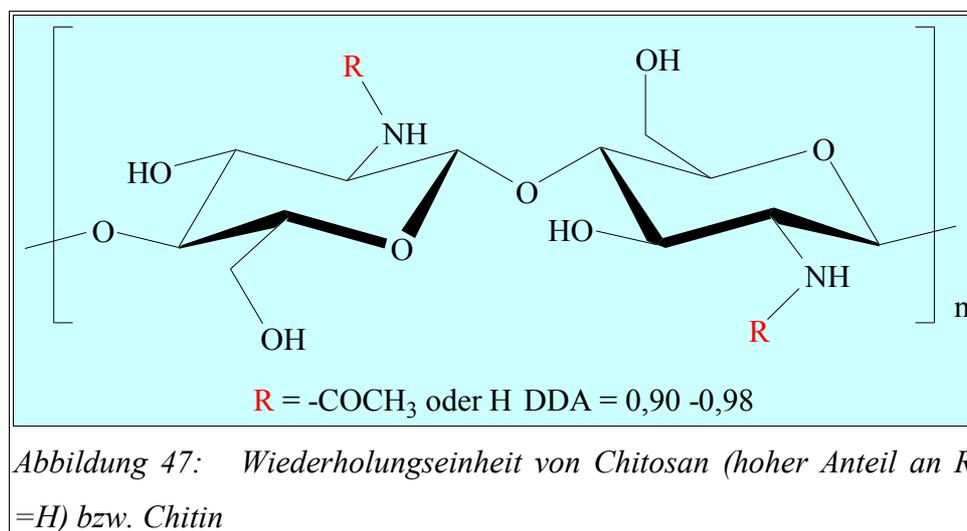
[84] S. Mann, Nachwachsende Rohstoffe, Ulmer Verlag, Stuttgart, 1998

[85] F. Waskow, Leitfaden Nachwachsende Rohstoffe, C.F. Müller Verlag, Heidelberg, 1998

[86] A.G. Walton, J. Blackwell: Biopolymers, Academic Press, New York 1973

[87] R.A.A. Muzzarelli, M.G. Peter (Hrsg.): Chitin Handbook, Atec, Grottammare 1997

desoxy-*D*-glucose. Chitin bzw. Chitosan ist analog dem Cellulosegerüst aufgebaut, bei dem die Hydroxylgruppe am C2-Atom durch eine Amidgruppe bzw. Aminogruppe substituiert ist (Tabelle 48). Bei hohen Anteilen an acetylierter Aminogruppen spricht man von Chitin, ist die Aminogruppe weitgehend deacetyliert von Chitosan [88][89].



Die potentiellen Anwendungsbereiche von Chitosan sind so vielseitig und vielversprechend, dass man Chitosan zu recht als das Material für das XXI. Jahrhundert bezeichnet hat. So wird Chitosan und deren Derivate durch ihr Eigenschaftsprofil in Bereichen wie z.B. Abwasserreinigung, Kosmetik, Agrarwirtschaft, Diätprodukte, Beschichtungen, Membranen, Medizinprodukte und vielen weiteren Anwendungsgebieten eingesetzt.

Die Forschungsanstrengungen der letzten Jahre im Bereich Chitin, Chitosan und Chitosanderivate lagen so naturgemäß in den oben angegebenen Bereichen.

So konnte mit Chitosan und deren Derivaten gute Ergebnisse in der Fest-Flüssig-Trennung bei Abwässern und Prozesslösungen erreicht werden [90] [91] [92].

Außerdem hat sich gezeigt, dass Chitosan und Chitosanderivate gute bis sehr gute selektive Komplexbildner für Schwermetalle wie z.B. Blei, Cadmium, Kupfer usw. sind.

[88] H.J. Bader, et.al.; Chitin – Ein wertvolles polysaccharid aus Krabbenpanzern, PdN-Chemie 1996, 45

[89] R.A.A. Muzzarelli; Chitin in Nature and Technology, Plenum Press, de Gruyter, New York 1986

[90] D. K. Rout, et. al.; Gel-Sol Transition and Thermotropic Behavior of a Chitosan Derivative in Lyotropic Solution, Macromolecules, 1993, 26, 6007-6010

[91] Hye Keong Jun, et.al.; Chitosan as a Coagulant for Recovery of Proteinaceous Solids from Fofu Wastewater, J. Agric. Food Chem., 1994, 42, 1834-1838

[92] Carsten Laue: Synthesis and Application of hybrid Natural/Synthetic Water-soluble Cationic Graft-copolymers, Dissertation, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2000

Ionen wie z.B. Magnesium, Calcium, Kalium, Natrium usw. werden nur schlecht von Chitosan und Chitosanderivaten komplexiert, so dass Chitosan auch für Ionenaustauscher oder schwermetallhaltige Abwasserreinigungen in Betracht kommt [93].

Im Bereich der Diätprodukte ist Chitosan wegen seiner Fähigkeit die Fettresorption zu verhindern, zu einem der wichtigsten Diät-Hilfsstoffe geworden [94] [95]. Chitosan muss neuerdings für diesen Anwendungsbereich als Medizinprodukt [96] [97] eingestuft werden. Bis heute gibt es jedoch eine Fülle frei verkäuflicher Chitosanprodukte, die als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt sind.

Im Bereich der medizinischen Produkte wird die Eignung von Chitosan als Wundheilungsaufgabe intensiv untersucht [98] [99]. Außerdem werden gerade in den letzten Jahren große Forschungsanstrengungen für die Verkapselung von pharmakologisch wirksamen Substanzen und Pestiziden mit Hilfe von Chitosan unternommen [100] [101].

Als natürliches Polymer zeichnet sich Chitosan durch seine große Gewebe-Verträglichkeit aus. Darüber hinaus sind sie biologisch verwertbar und bio-abbaubar.

Mit seiner bio-verträglichen, adsorbierbaren und anti-mikrobiellen Wirkung kommt Chitosan zunehmend auch in der Medizin zum Einsatz [102].

---

[93] Alexander Rether; Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen, Dissertation, Anorganisch-chemisches Institut der technischen Universität München, 2002

[94] K. Deuchi, et. al.; Effect of the viscosity or deacetalation degree of Chitosan on fecal fat excrement from rats fed on a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995a, 59(5), 781-785

[95] O. Kanauchi, et. al.; Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1995, 59(5), 786-790

[96] OVG-Reinland-Pfalz, 26.6.1999, Az. 6A 10716/99

[97] VGH Baden-Württemberg, 22.2.2000, Az. 9S 188/00

[98] S. Nakatuka, A.-L. Andrady; Permeability of Vitamin B-12 in Chitosan Membranes. Effect of Crosslinking and Blending with Poly(vinylalcohol) on Permeability, in: *Journal of Applied polymer Science*, 44 (1992), 17-28

[99] Xianfang Zeng, Eli Ruckenstein; Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes, *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 1996, 4169-4175

[100] Emanuelle Marie, et. al.; Synthesis of Chitosan-Stabilized polymer Dispersions, Capsules, and Chitosan Grafting Produkts via Miniemulsion, *Biomacromolecules*, 3, 2002, 475-481

[101] Marc A. Teixeira, et. al.; Assessment of Chitosan gels for the Controlled Release of Argochemicals, *Ind. Eng. Chem. Res.* 29, 1990, 1205-1209

[102] Okamoto Y., et.al., Analgesic effects of chitin and chitosan, *Carbohydrated Polymers*, Vol. 49, Issue 3, (2002), S. 249-252

Da Chitosan aus Chitin gewonnen wird, wird der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad (DDA) angegeben, dieser beschreibt den Grad der Deacetalisierung an einem Chitin Molekül. Anders ausgedrückt gibt der DDA den prozentualen Anteil an Aminogruppen in einem Polymermolekül wieder.

Chitin ist nach der Cellulose das zweithäufigste Polysaccharid in der Biomasse. Es ist der Hauptbestandteil der Schalen von Krustentieren wie Krabben, Schrimps und Krill oder den Panzern von Insekten. Hierbei unterscheidet sich der Chitinanteil in den natürlich vorkommenden Quellen stark voneinander. Es ist neben den Proteinen mit einer Vielzahl anorganischen Mineralien wie z.B. Calciumcarbonaten verbunden. Die globalen Ressourcen werden auf etwa  $10^6$ - $10^7$  t/a geschätzt, wobei die Jahresproduktion bei ca. 2000 t liegt.

Chitin wird vor allem in Japan, Thailand und in den USA wegen der geringen Rohstoffkosten aus Abfällen der Krabbenfischerei gewonnen. Aufgrund der geringen Menge an Nordseekrabben, die in Deutschland anfallen (Fangbeschränkungen, Gewinnung des Krabbenfleisches außerhalb von Deutschland) gibt es nur geringe Produktionskapazitäten für Chitosan in Deutschland.

Nicht nur die Quantität der Schalen von Kustentieren sondern auch die Qualität sind für die Chitosanproduktion entscheidend. So gibt es erhebliche Unterschiede in dem Chitosangehalt bei unterschiedlichen Spezies der Gattung Crustacea [103] (siehe Tabelle 11).

Quelle	Feuchtigkeit [%]	Protein [%]	verb. Rückst. [%]	Chitin [%]
Crab ( <i>Callinectes sapidus</i> )	4,5	24,0	56,0	12,9
Crab ( <i>Chinonectes opilio</i> )	-	29,2	40,6	26,7
Crab ( <i>Portunus trituberculatus</i> )	12,9	10,3	57,9	17,1
Shrimp <i>Penaeus nonodon</i>	9,7	42,8	20,8	36,5
Shrimp <i>Penaeus sp.</i> (Kopf)	3,2	55,8	22,6	11,9
Shrimp <i>Penaeus sp.</i> (Schale)	4,0	45,0	31,7	27,2
Prawn	9,24	61,6	26,7	30,0
Crawfish ( <i>procambartus clarkii</i> )	5,7	28,1	44,0	12,5
Krill ( <i>Euphausia superba</i> )	-	44,6	27,7	19,9

Tabelle 11: Chemische Zusammensetzung unterschiedlicher Schalen von Krustentieren.

Der oben aufgeführte Verbrennungsrückstand repräsentiert zum größten Teil die enthaltenen

[103] No Hong Kyoon, Meyers Samuel P., Preparation of chitin and chitosan, Chitin Handbook, Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G., European Chitin Society, (1997), ISBN- 88-86889-01-1

Mineralien, die hauptsächlich in Form von Kalk filamentartig in den Schalen vorliegen. Neben den aufgeführten Parametern enthalten die Schalen auch noch Lipide, Farbstoffe und weitere Verunreinigungen.

Um das Chitin aus den Schalen isolieren zu können, wird in einem mehrstufigen Verfahren gearbeitet. Als erstes wird das Rohmaterial (z.B. Prawnschalen) durch Waschen von Fleischresten und anderen Verunreinigungen wie z.B. Sand befreit. Die Schalen müssen zunächst von Proteinen befreit werden. Die Deproteinierung kann chemisch durch den Einsatz von verd. Natronlauge (1-2 mol/l Lösung) bei 60-100 °C oder biochemisch durch die Einwirkung von z.B. Enzymen bei 25 °C erfolgen. Anschließend werden die so behandelten Schalen bei 25 °C chemisch mit Hilfe von Salzsäure demineralisiert. Hierbei wird eine große Menge Salzsäure für die Neutralisation der häufig erheblichen Mengen Kalk in den Schalen benötigt. Neuere Verfahren zur Demineralisierung verwenden ausschließlich oder unterstützend Säure produzierenden Bakterien. Hierzu kommen z.B. Essigsäure oder Milchsäure produzierenden Mikroorganismen in Betracht. In einem - von der Bundesregierung geförderten Länderübergreifenden Forschungsprojekt - werden zur Zeit aerobe und anaerobe Systeme zur Decalcifizierung und Deproteinierung von Garnelenschalen untersucht. So kann durch die Produktion der Säure eine erhebliche Menge Salzsäure eingespart werden und ein Molmassenabbau von Chitin durch die milden von den Bakterien produzierten Säuren weites gehend verhindert werden (siehe Abbildung 48).



Abbildung 48: Visuelle Eigenschaften der Ausgangsverbindungen bzw. Produkte bei der Gewinnung von Chitin aus Garnelenschalen (Prawn).

Zum Zerstören bzw. Entfernen der in den aufgearbeiteten Schalen enthaltenen Farbstoffe können verschiedene Methoden genutzt werden. So können organische Lösungsmittel wie z.B. Aceton, Ethanol und Diethylether oder andere Lösungsmittelsysteme Verwendung finden. Technisch werden zur Kostenreduzierung meist oxidative Substanzen wie z.B. Wasserstoffperoxid, Natriumhypochlorid oder Kaliumpermanganat in wässriger Lösung

verwendet. Das so isolierte Chitin wird hauptsächlich zur Synthese von Chitosan verwendet.

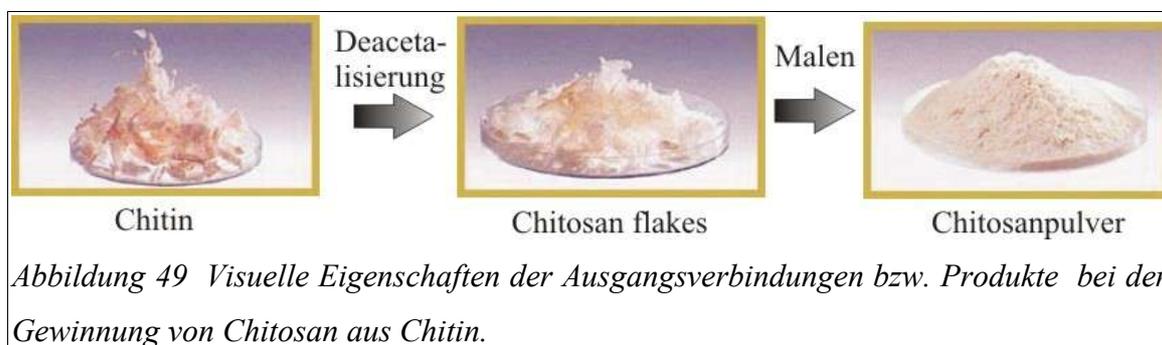


Abbildung 49 Visuelle Eigenschaften der Ausgangsverbindungen bzw. Produkte bei der Gewinnung von Chitosan aus Chitin.

Das erhaltene Chitin kann durch alkalische oder enzymatische Deacetalisierung zum Chitosan umgesetzt werden. Die hier verwendeten Proben wurden ausschließlich durch alkalische Hydrolyse gewonnen.

Hierzu wird das Ausgangsmaterial in konzentrierter Natronlauge (50-60 %) suspendiert und bei einer Temperatur von 70-150 °C ca. 1-6 Stunden zur Reaktion gebracht. Hierbei ist sowohl der erreichte Deacetalisierungsgrad als auch die Degradation des Chitosans von den Reaktionsbedingungen abhängig [104]. Bei dem oben beschriebenen Vorgehen tritt durch den Luftsauerstoff initiierte oxidative Degradation der Molekülketten auf, die erwünscht sein kann und durch Zugabe von Perhydrol unterstützt werden kann.

Durch Verwendung von Stickstoff als Inertgas kann Chitosan höherer Molmasse hergestellt werden [105]. Außerdem beeinflusst die Temperatur, [106] die Partikelgröße, die Reaktionszeit und die Laugenkonzentration [107] die Molmasse und den durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad des so erzeugten Chitosans.

Ein wichtiger Punkt, der oft vernachlässigt wird, ist die Qualität des verwendeten Chitins. Die verwendeten Reinigungsschritte zum Abtrennen der Proteine und der Mineralien beeinflussen insbesondere die Molmasse des Chitins. Hierdurch wird natürlich auch maßgeblich die

[104] J.-F. Revol, J. Li, R. H. Marchessault, Effect of Degree of deacetylation of Chitin on the Properties of Chitin Crystallites, J. Appl. Polym. Sci., Vol. 65 (1997), S. 373-380

[105] Bough W.A., Salter W.L., Wu A.C.M., Perkins B.E, Biotechnol. Bioeng., (1978), Vol. 20, S. 1931

[106] US 4195175, Peniston Q.P., Jonson E.L., Process for the manufacture of chitosan, (1980)

[107] Alimuniar A., Zainuddin R., Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier Applied Science, Essex, UK, (1992) S. 627

Molmasse des Chitosans, das aus diesem Chitin hergestellt wird, beeinflusst [108] [109]. Hierbei trägt ein niedriger pH-Wert  $<3$  bei der Decalcifizierung mit Salzsäure maßgeblich zum Molmassenabbau des Chitins bei. Durch die Verwendung von milderer Säuren wie z.B. Essig oder Milchsäure kann die Degradation verringert werden. Nur durch den Einsatz hochmolekularer Chitine kann auch hochmolekulares Chitosan gewonnen werden, das besonders gute filmbildende Eigenschaften aufweist und somit für die Herstellung von Chitosanfilmen als Wundauflagen hervorragend geeignet ist.

### 3.2.2 Verwendete Chitosanproben

Die Chitosan Proben 1-4 wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Molmasse. Das Chitosan liegt in Form von Flocken vor. Chitosan 5 wurde von der Firma Fluka bezogen. Bei Chitosan 6 handelt es sich um fein gemahlene und getrocknete Chitosan 5. Bei Chitosan 7-9 handelt es sich um Chitosan der Firma Biomexx (siehe Abbildung 50). Diese Proben entsprechen einem technischen Produkt was sich insbesondere durch den geringeren durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad bemerkbar macht.



Abbildung 50: Visuelle Eigenschaften der verwendeten Chitosanproben: von links, Chitosan 1 - Chitosan 9

Der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad der Chitosanproben wurde mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$ -NMR und der  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie bestimmt.

Für die Bestimmung des Trockengehaltes wurden die Proben bei  $110\text{ °C}$  im Trockenschrank

[108] Brzeski M. M., Hirano S., Tokura S., Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan, The Japan Society of Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan, S. 15

[109] Lusena C.V., Rse R.C., J. Fisch. Res. Board Can., Vol. 10, (1953), S. 521

bis zur Massenkonstanz getrocknet.

Der Staudinger-Index ( $[\eta]$ ) wurde durch eine Konzentrationsreihe mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters bestimmt. Als Lösungsmittel für die Viskosimetrie wurde eine Lösung aus 0,5 mol/l Essigsäure und 0,2 mol/l Natriumacetat verwendet. Die viskosimetrische Molmasse ( $M_\eta$ ) konnte durch bekannte  $[\eta]$ -M-Beziehungen ermittelt werden.

<b>Chitosan</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
Trockenge. [%]	89,4	89,2	84,9	85,1	89	94,7	89,3	90,6	90,8
DDA-Wert	0,98	0,97	0,97	0,97	0,86	0,87	0,84	0,79	0,75
$[\eta]$ [ml/g]	524	819	1522	1108	719	720	578	685	1077
$k_H \cdot [\eta]^2$	70400	378900	953400	484200	111800	110200	134700	182300	529500
$c_{\text{kritisch}}$ (vis)	0,48	0,31	0,16	0,23	0,35	0,36	0,43	0,36	0,23
$M_\eta$ [g/mol]	221000	406000	937000	610000	340000	345000	253000	318000	587000
unlös. B. [%]	0,9	0,8	1	0,7	0,6	0,6	0,1	0,1	0,2

*Tabelle 12: Eingesetzte Chitosanproben mit Angabe ausgewählter molekularer Parameter*

$M_\eta$  wurde berechnet mit:  $[\eta] = 5,8 \cdot 10^{-2} \cdot M^{0,74}$  [124].

Des weiteren wurde von Chitosan 5 bzw. 8 die Kettenlänge radikalisch degradiert. Hierzu wird in Anlehnung an technische Verfahren 10 g Chitosan in 300 ml einer 20 % Natronlauge suspendiert. Zu dieser Suspension werden 3 ml einer 30 % Wasserstoffperoxidlösung gegeben und die Suspension wird zwischen 30 und 90 min auf ca. 85 °C erhitzt. Anschließend wird die Suspension durch einen Büchnertrichter filtriert und das Chitosan bis zur pH Neutralität gewaschen. Das so abgebaute Chitosan wird bei ca. 40 °C bei einem Druck von ca. 30 mbar mit Hilfe eines Rotationverdampfers ca. 1-2 Stunden getrocknet (Tabelle 13).

Chitosan	10	11	12	13
Trockenge. [%]	89,4	89,2	84,9	85,1
DDA-Wert [%]	0,98	0,97	0,97	99-100
$[\eta]$ [ml/g]	246	229	216	91,8
$k_H \cdot [\eta]^2$	23.300	18.600	3.100	12.000
$c_{\text{kritisch}}$ (vis) [wt%]	1,0	1,1	1,2	2,7
$M_\eta$ [g/mol]	79.700	72.500	66.900	21.000
unlös. B. [%]	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabelle 13: Eingesetzte Chitosanproben mit Angabe ausgewählter molekularer Parameter

$M_\eta$  wurde berechnet mit:  $[\eta] = 5,8 \cdot 10^{-2} \cdot M^{0,74}$  [124]

### 3.2.3 NMR-Untersuchungen

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Deacetalisierungsgrades kann ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-IGATED-Spektrum oder ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum genutzt werden. Hierbei werden die Integrale der Carbonylsignale bestimmt und mit dem polymeren Rückgrat ins Verhältnis gesetzt.

Beim Chitosan befinden sich Substituenten im Gegensatz zur Sulfoethylcellulose ausschließlich an der C2-Position. Insofern wird beim Chitosan kein spezifischer Substitutionsgrad bestimmt.

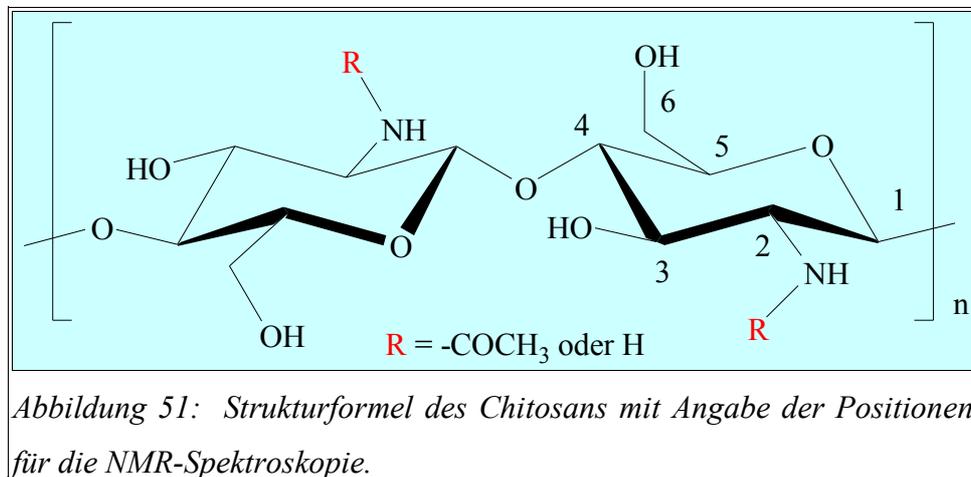
Der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad der Chitosanproben wurde mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$ -NMR und der  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie bestimmt. Hierzu wird z.B. das Integralverhältnis zwischen der Carbonylgruppe und den Kohlenstoffatomen der Anhydroglucoseeinheit bestimmt. Alle Chitosanproben wurden für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen ca. 1 Stunde mit Hilfe einer Ultraschallsonde bei intensiver Kühlung degradiert um thermische Kettenbrüche auszuschließen. Anschließend wurde die wässrige Lösung ca. 45 min bei 13.000 U/min zentrifugiert um den Metallabrieb der Ultraschallsonde abzutrennen. Diese so erhaltene Lösung wurde einige Tage an der Lyophille gefriergetrocknet. Der so erhaltene Schaum wurde für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Als Referenzsubstanz wurde die wasserlösliche Trimethylpropionsäure (TMSP) verwendet. Für die Relaxationszeit wurden 5 Sekunden bei einer Messtemperatur von 60 °C gewählt (Tabelle 14).

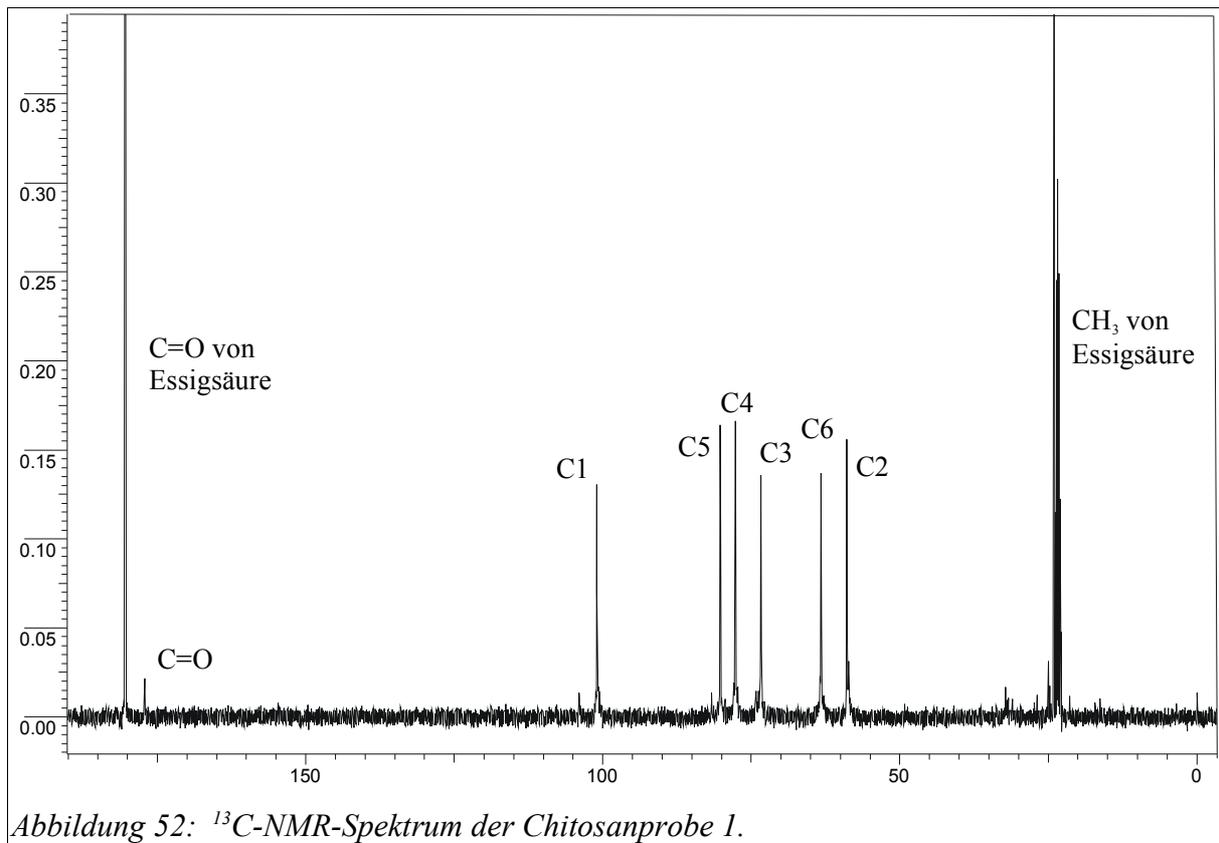
Chitosan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
DDA-Herst	0,95	0,95	0,95	0,95	--	--	0,85	0,8	0,78	--	--	--	--

Chitosan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
DDA-gem.	0,98	0,97	0,97	0,97	0,86	0,87	0,84	0,79	0,75	0,98	0,97	0,97	1

Tabelle 14: Übersicht der durchschnittlichen Deacetalisierungsgrade bei den verwendeten Chitosanen bestimmt mit  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Untersuchungen (Mittelwert) im Vergleich zu den angegebenen Herstellerangaben.

Die nachfolgende Anhydroglucoseeinheit des Chitosans (Abbildung 51) soll als Legende für die exemplarischen NMR-Spektren von Chitosan in Abbildung 52 und Abbildung 53 dienen.





$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{CD}_3\text{COOD}$ ):  $\delta = 0,00$  TMSP; 57,21 (s, C2); 61,56 (s, C6); 71,87 (s, C3); 75,97 (s, C4); 78,53 (s, C5); 99,48 (s, C1); 177,3 (s, C=O) ppm.

Das Chitosan wurde für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen ca. 1,5 Stunde ultraschalldegradiert, um die Viskosität der Lösung zu verringern. Durch die Messung eines IGATED-NMR-Spektrums können die Signalintensitäten bzw. Signalflächen direkt miteinander in Beziehung gesetzt werden, um den durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad zu bestimmen.

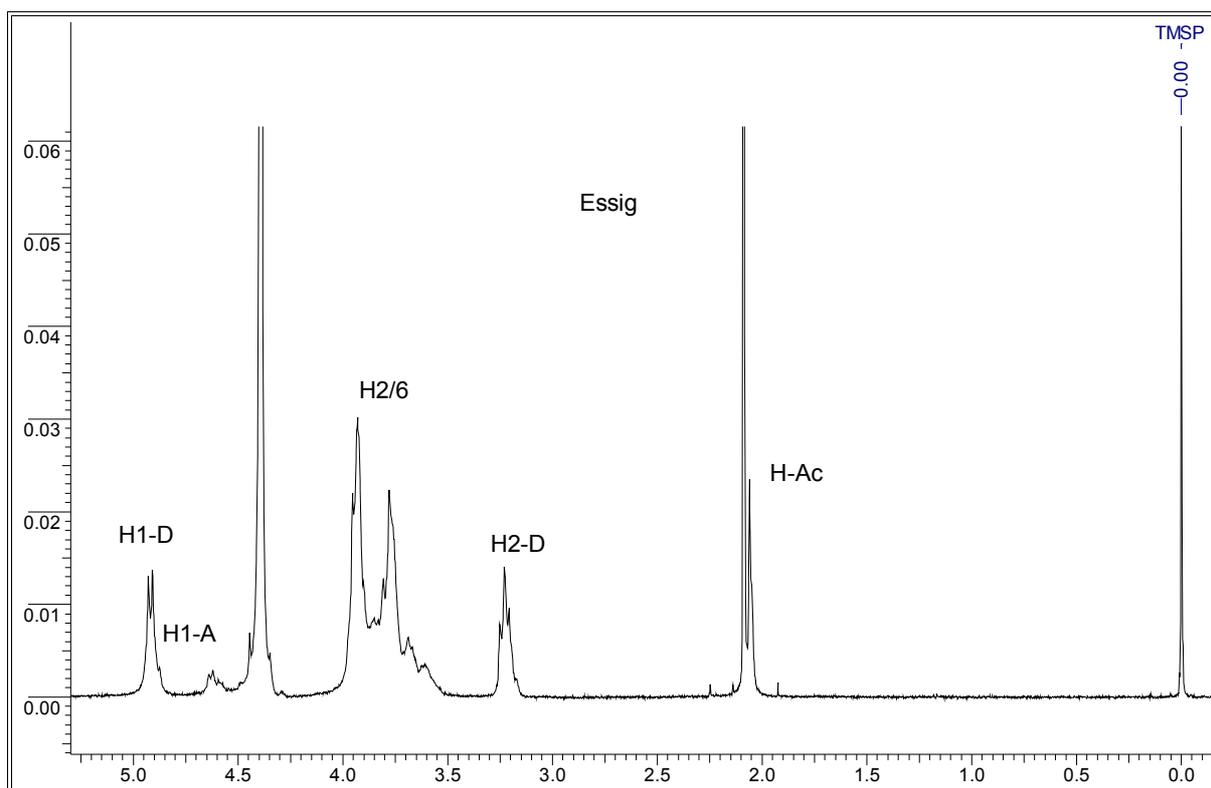


Abbildung 53  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Chitosan 7

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{CD}_3\text{COOD}$ ):  $\delta = 0,00$  TMS; 2,03 (s,  $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$ ); 2,06 (s,  $\text{CH}_3\text{-Essigsäure}$ ); 3,23 (t, H-2-Deacetalisiert); 3,53-4,02 (m, H2-6); 4,39 (s, HOD); 4,62 (m, H1-Acetalisiert); 4,91 (d, H1-Deacetalisiert) ppm.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung des Chitosans kann bei niedermolekularem Proben direkt erfolgen. Bei Verwendung hochmolekularer Proben muss das Chitosan z.B. mit Hilfe von Ultraschallenergie degradiert werden um die Viskosität der Lösungen herabzusetzen. Hierbei wird für die Proben eine Relaxationszeit von 7 Sekunden bei einer Meßtemperatur von  $70\text{ }^\circ\text{C}$  zur Verhinderung der Signalverbreiterung gewählt [110].

Der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad kann im Gegensatz zur  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie nicht direkt aus der Signalfläche ermittelt werden.

Bei der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie kann der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad über verschiedene Signalverhältnisse berechnet werden. Zur Verdeutlichung sollen die nachfolgenden Formeln dienen.

[110] Lavertu M., Xia Z., et al., A validated  $^1\text{H-NMR}$  method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 32, (2003), S. 1149-1158

$$DDA = \left( \frac{H1D}{H1D + HAc/3} \right) \cdot 100$$

*Gleichung 45*

Die Gleichung 45 ermöglicht es, die Integralfläche des deacetalisierten Protons an der 1 Position (H1D) mit der Methylgruppe des Chitin (HAc) ins Verhältnis zu setzen.

$$DDA = \left( 1 - \left( \frac{2 HAc}{H - 2/6} \right) \right) \cdot 100$$

*Gleichung 46*

Die Gleichung 46 setzt die Integralfläche der Methylgruppe (HAc) des Chitins mit dem polymeren „Backbone“ (H-2/6) zueinander ins Verhältnis.

$$DDA = \left( \frac{H1D}{H1D + H1A} \right) \cdot 100$$

*Gleichung 47*

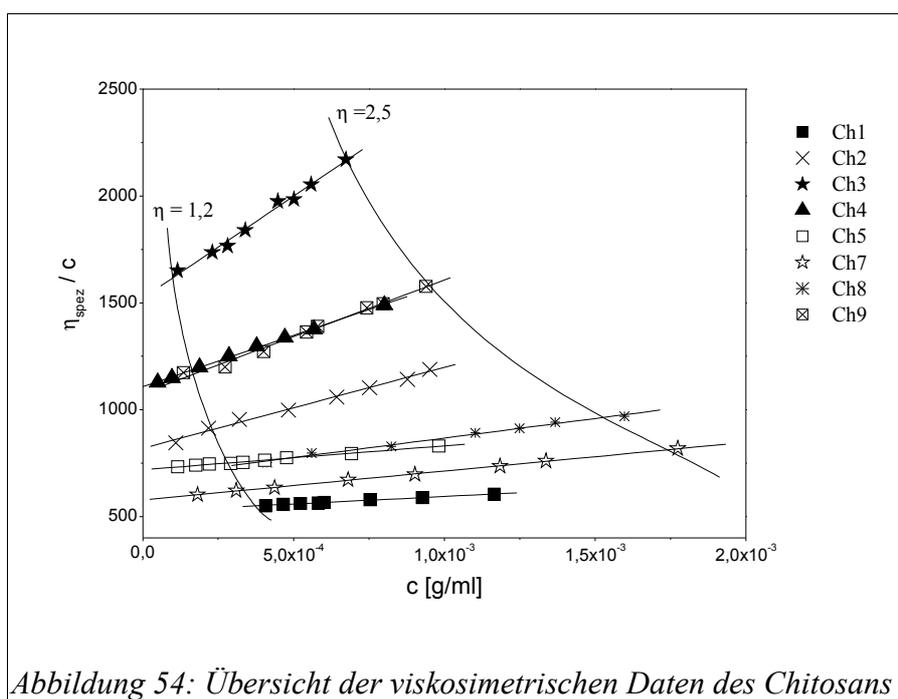
Die Gleichung 47 ermöglicht es, die Integralfläche des deacetalisierten Protons an der 1 Position (H1D) mit dem acetalisierten Proton an der 1 Position (H1A) ins Verhältnis zu setzen.

Alle Auswertungsmethoden ergeben im Rahmen der Messgenauigkeit identische Ergebnisse. Welche Methode zur Auswertung genutzt werden kann, ist hauptsächlich von der Qualität des Spektrums und von dem durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad abhängig.

### 3.2.4 Viskosimetrie

Der Staudinger-Index ( $[\eta]$ ) wurde durch eine Konzentrationsreihe mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters des Typs Ic bestimmt. Als Lösungsmittel für die Viskosimetrie wurde eine Pufferlösung aus 0,5 mol/l Essigsäure und 0,2 mol/l Natriumacetat verwendet. Nach ca. 2 Stunden wird die Lösung durch einen 20  $\mu$ m Nylonfilter filtriert. Hierdurch werden effektiv größere Bestandteile aus der Lösung entfernt. In Abbildung 54 sind die viskosimetrischen Ergebnisse von Chitosan 1-9 dargestellt.

Die viskosimetrische Molmasse ( $M_\eta$ ) konnte durch bekannte  $[\eta]$ - M Beziehungen ermittelt



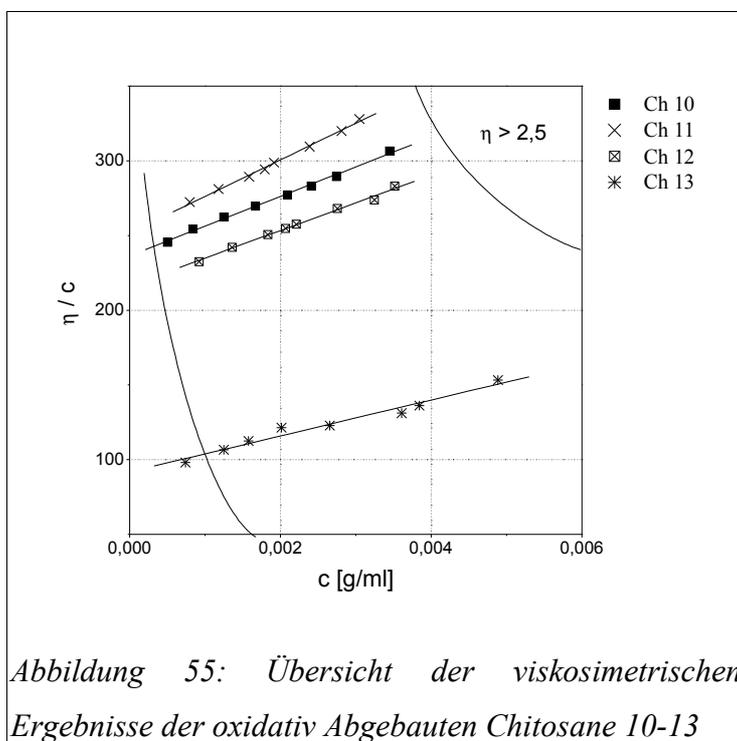
werden ( $[\eta] = 5,8 \cdot 10^{-2} \cdot M^{0,74}$ ) [124].

Chitosan	1	2	3	4	5	6*	7	8	9
T. geh. [%]	89,4	89,2	84,9	85,1	89	94,7	89,3	90,6	90,8
DDA-Wert	0,98	0,97	0,97	0,97	0,93	0,93	0,84	0,79	0,75
$[\eta]$ [ml/g]	524	819	1522	1108	719	713	578	685	1077
$M_\eta$ [g/mol]	221000	406000	937000	610000	340000	330000	253000	318000	587000
DP	1370	2520	5820	3790	2110	2090	1570	1980	3450
$k_H$	0,26	0,56	0,41	0,39	0,22	0,22	0,4	0,39	0,46
$k_H^* [\eta]^2$	70400	378900	953400	484200	111800	119400	134700	182300	529500
$c^*_\eta$ [%]	0,48	0,31	0,16	0,23	0,35	0,35	0,43	0,36	0,23
$d_\eta$ [nm]	53	76	123	96	69	69	58	66	94
Knäuelvol. [μm <sup>3</sup> ]	79,7	230	981	464	120	120	101	150	435

Tabelle 15: Übersicht der viskosimetrischen Ergebnisse der verwendeten Chitosanproben 1-9

Die radikalisch degradierten Chitosanproben wurden wie oben beschrieben gelöst und vermessen. Bei den Substanzen Chitosan 10-12 handelt es sich um Chitosan 5, das wie oben beschrieben, 30 min (Chitosan 10), 60 min. (Chitosan 11) und 90 min. (Chitosan 12) abgebaut wurde. Bei Chitosan 13 handelt es sich um Chitosan 8, das 3 Stunden abgebaut wurde. In

Abbildung 55 sind die viskosimetrischen Ergebnisse von Chitosan 10-13 dargestellt.



Chitosan	10	11	12	13
Trockengehalt [%]	92,2	92,9	90,8	85,1
DDA-Wert	0,99	0,99	0,99	>0,99
$[\eta]$ [ml/g]	245,8	229,2	215,8	91,8
$M_{\eta}$ [g/mol]	79.700	72.500	66.900	21.000
DP	495	450	415	130
$k_H$	0,39	0,35	0,07	1,43
$k_H^* [\eta]^2$	23.280	18.600	3.100	12.022
$c^*_{\eta}$ [%]	1,0	1,1	1,2	2,7
$d_{\eta}$ [nm]	30	28	27	14
Knäuelvol. [ $\mu\text{m}^3$ ]	13,5	11,5	10	1,34

Tabelle 16: Übersicht der viskosimetrischen Ergebnisse der oxidativ Abgebauten Chitosanproben 10-13

### 3.2.5 Lösungsstruktur

Die Lösungsstruktur beeinflusst das Fließverhalten von Polymerlösungen. Bei der Synthese

der Chitosanmembranen aus einer polykationionische Lösung spielen die Ausstreichereigenschaften der Polymerlösungen eine große Rolle, da von den Fließeigenschaften die Güte des entstehenden Filmes abhängt. Bei zu hoch oder niedrig viskosen oder elastischen Lösungen kann kein ebenmäßiger Film ausgezogen werden. Dies spielt insbesondere bei hohen Auftragungsgeschwindigkeiten von elastischen Lösungen, eine Rolle. Hierdurch kommt es u.a. zur Strangaufweitung beim Extrudieren der Polymerenlösungen. Aus den rheologischen Untersuchungen können Anhaltspunkte für die Lösungsstruktur der Proben erhalten werden, die Einflüsse auf das Verhalten der Ausgangslösungen während der Synthese oder auf Eigenschaften der Membranen haben könnten.

Des weiteren beeinflusst die verwendete Menge Säure in der Chitosanlösung die Lösungsstruktur, da erst durch die Zugabe einer Säure das neutrale Chitosan unter Aufnahme von Hydroniumionen in die entsprechende Salzform übergeht.

Außerdem wurde die Alterung der Polymere in Lösung untersucht, da eine ausreichende Langzeitstabilität der Polymerlösungen insbesondere bei technischen Verarbeitungsprozessen eine wichtige Rolle spielt.

Es wurden zunächst die Fließeigenschaften von den verwendeten Chitosanen in einer 1 % Essigsäure bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Hierbei konnte in allen Fällen eine homogene Chitosanlösung erhalten werden. Unlösliche Bestandteile wurden mit Hilfe einer Glasfilterfritte (Typ 0 - ca. 120  $\mu\text{m}$ ) abgetrennt.

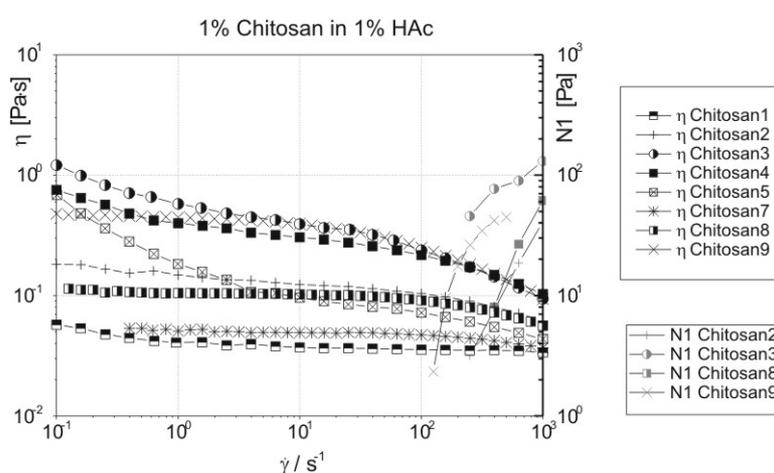


Abbildung 56: Vergleich der Fließeigenschaften einer 1 % Chitosanlösung in einer 1 % HAC-Lösung (Probe 1-9)

Bei der 1 % Chitosanlösung weisen die hochmolekularen Chitosane (3,4,5,9) eine hohe

Viskoergiebigkeit auf (Abbildung 56). Bei dieser geringen Chitosankonzentration ist der durchschnittliche Deacetalisierungsgrad von Chitosan noch nicht ausschlaggebend für die Viskoergiebigkeit der Lösungen. Die Viskoergiebigkeit dieser Lösungen wird hauptsächlich durch die Molmasse des Chitosans bestimmt. Die ermittelten ersten Normalspannungsdifferenzen (N1) treten bei der 1 % Chitosanlösung nur bei den hochmolekularen Chitosanen (2,3,8,9) auf. Hierbei zeigen die Chitosane 8 ( $M_n = 318.000$  g/mol) und 9 ( $M_n = 587.000$  g/mol) trotz ihrer geringeren Molmasse im Vergleich zu Chitosan 2 ( $M_n = 406.000$  g/mol) und 3 ( $M_n = 937.000$  g/mol) eine erste Normalspannungsdifferenz. Es zeigt sich, dass sich die molekulare Struktur und damit auch die „Kompaktheit“ des Polymerknäuels - die einen entscheidender Faktor für die Elastizität der Polymerlösung ist – nicht nur von der Molmasse abhängig ist. Das Chitosan 8 (DDA 0,79) und 9 (DDA 0,75) weist einen wesentlich geringeren durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad auf als die Chitosane 2 (0,97) und 3 (0,97). Durch die höhere Hydrophobierung der Chitosanen mit geringen durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad, entsteht eine kompaktere Knäuelstruktur in Lösung, durch die die Elastizität auch schon bei geringerer Molmasse hervorgerufen wird.

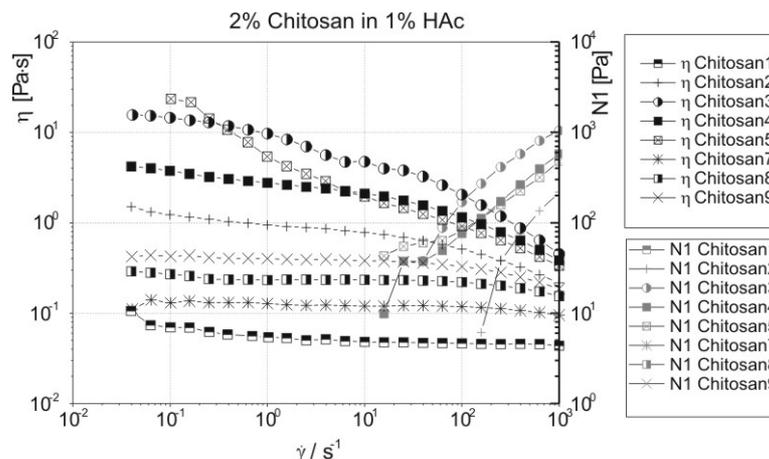


Abbildung 57: Vergleich der Fließeigenschaften einer 2 % Chitosanlösung in einer 1 % HAC-Lösung (Probe 1-9)

Bei der 2 % Chitosanlösung zeigt sich hingegen ein anderes Bild (Abbildung 57). Hier weist die hochmolekulare Chitosanprobe 9 mit einem vergleichsweise niedrigen Deacetalisierungsgrad eine wesentlich geringere Viskosität auf, als die anderen hochmolekularen Chitosane mit hohem Deacetalisierungsgrad (z.B. 3,4). Die ermittelten ersten Normalspannungsdifferenzen (N1) treten bei der 2 % Chitosanlösung bei allen untersuchten Chitosanen auf.

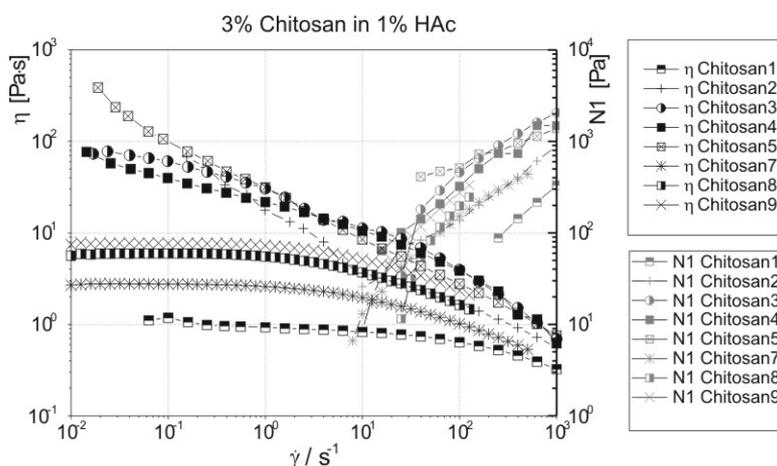


Abbildung 58: Vergleich der Fließeigenschaften einer 3 % Chitosanlösung in einer 1 % HAC-Lösung (Probe 1-9)

Dieser Effekt nimmt mit zunehmender Chitosankonzentration noch zu (siehe Abbildung 58). Bei zunehmend höher konzentrierten Chitosanlösungen wird die Viskoergiebigkeit nur noch in einer untergeordneten Rolle durch die Molmasse beeinflusst. Es zeigt sich, dass bei hohen Konzentrationen die Viskoergiebigkeit hauptsächlich durch den durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad beeinflusst wird. So zeigen insbesondere die Chitosanproben mit einem hohen DDA einen sehr hohe Viskoergiebigkeit (Probe 2,3,4,5). Im Gegensatz dazu zeigen die Chitosanproben mit geringem DDA (auch bei hoher Molmasse) einen geringe Viskoergiebigkeit (Probe 7,8,9).

Durch die unterschiedlichen Verhältnisse zwischen Chitosan und der verwendeten Säure wird die Kationizität des Chitosans beeinflusst. Die Aminogruppe des Chitosans geht unter Aufnahme eines Hydroniumions in die kationische Form über.

<b>Lösung</b>	<b>Säure</b>	<b>Chitosan (DDA 100 %)</b>
1 % Chitosan	2,7	1
2 % Chitosan	1,3	1
3 % Chitosan	0,89	1

Es kann also bei einer 3 % Chitosanlösung in einer 1 % Essigsäure nur 89 % des Chitosan in die kationische Form überführt werden. Bei einer 1 % Chitosanlösung liegt hingegen noch Säure bei maximaler Kationizität des Chitosans vor. Hierbei zeigt sich insbesondere bei den Chitosanen mit geringem Deacetalisierungsgrad eine wesentlich geringere Viskoergiebigkeit. Die ermittelte Fließgrenze der Chitosanprobe 5 bei geringen Schergewindigkeiten ist auf die Bildung von Überstrukturen durch enthaltenen Proteine zurückzuführen.

Bei den Chitosanen 7, 8 und 9 handelt es sich um technische Chitosane, die hauptsächlich für den kosmetischen Einsatzbereich eingesetzt werden. Bei diesen Chitosanen liegen die Kosten für ein Kilo bei ca. 45 €. Diese Chitosane entsprechen in Ihrer Molmasse und dem Deacetalisierungsgrad weitestgehend den industriell verwendeten Chitosan. Für die Herstellung von Membranen wurden daher hauptsächlich diese technischen Chitosane verwendet, um die Rohstoffkosten für eine potentielle kommerzielle Nutzung gering zu halten.

Für die technischen Chitosanproben wurden weitergehende Schermessungen bei 25 °C durchgeführt. Es wurde zur Untersuchung der Viskositätsergiebigkeit des Chitosans in Abhängigkeit zur verwendeten Säure die Konzentration der Essigsäure von 0,75 % - 5 % in einer 3 % Chitosanlösung variiert.

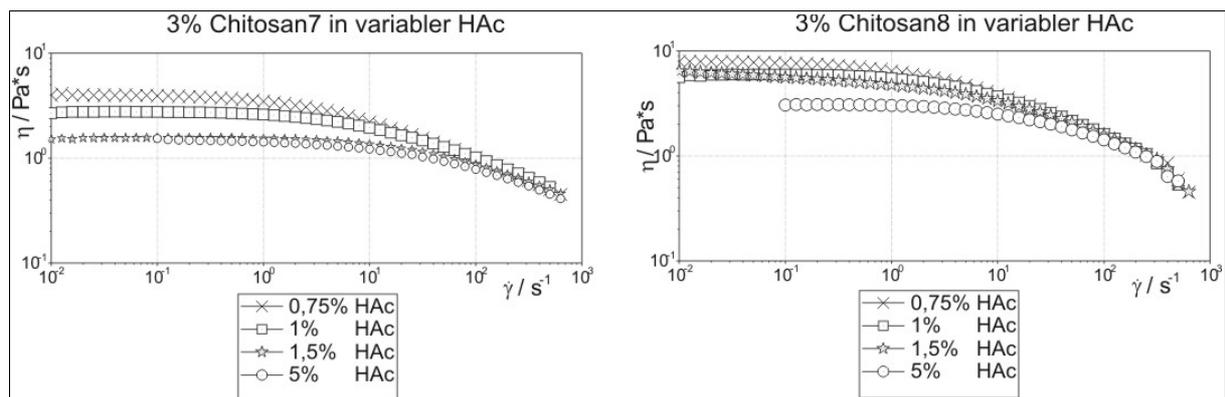
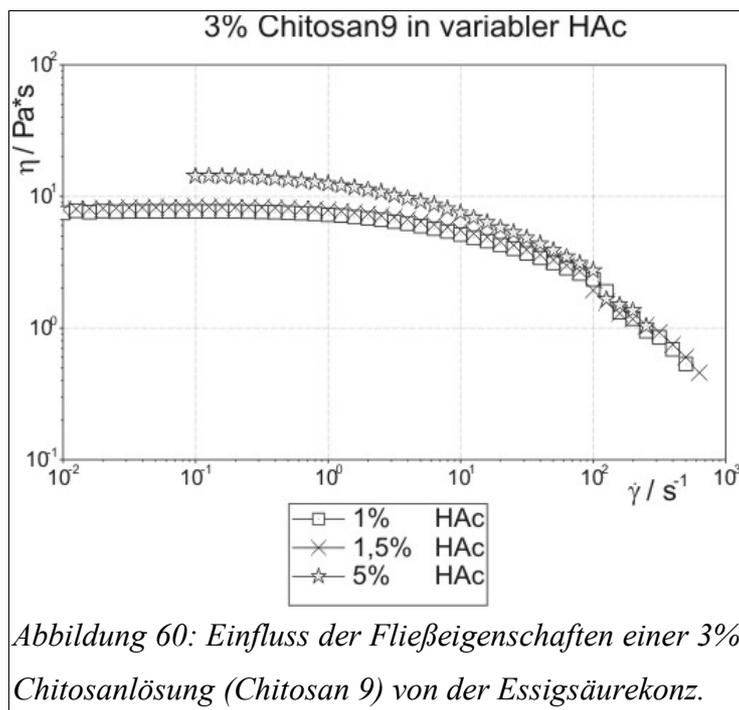


Abbildung 59: Einfluss der Fließeigenschaften einer 3 % Chitosanlösung (Chitosan 7 und 8) von der Essigsäurekonzentration die zwischen 0,75 % bis 5 % Eingestellt wurde.

In Abbildung 59 sind Chitosanproben mit ähnlichen Deacetalisierungsgrad (Chitosan 7: 84 % Chitosan 8: 79 %) und unterschiedlichen Molmassen aufgetragen. Bei beiden Proben zeigt sich eine geringere Viskositätsergiebigkeit in Lösungen mit einem höheren Säuregehalt. Bei genauerer Betrachtung von Chitosan 7 zeigt sich, dass eine Erhöhung der Säurekonzentration von 1,5 % auf 5 % die Viskosität der Lösung nur geringfügig beeinflusst. Bei Chitosan 8 zeigt sich jedoch eine deutliche Viskositätsabnahme bei der Erhöhung der Säurekonzentration. Mit zunehmender Säurekonzentration wird immer mehr Chitosan durch Aufnahme eines Hydroniumions in die kationische Form überführt. Dies sollte zu einer zunehmenden Aufweitung des Polymerknäuels in der Lösung führen und damit auch zu einer

Viskositätserhöhung. Es ist jedoch noch ein zweiter Aspekt zu berücksichtigen. Durch einen geringeren durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad des Chitosans gibt es größere Bereiche, an denen durch Protonierung keine kationische Ladung erzeugt werden kann. Hieraus resultiert eine größere Kettensteifigkeit und damit verbunden auch eine höhere Viskositätsergiebigkeit.

Chitosan 7 mit dem höchsten Deacetalisierungsgrad weist bei geringen Säurestärken durch nicht ausreichende Protonierung viele neutrale Bereiche in der Polymerkette auf. Dieser Beitrag der Kettensteifigkeit und Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen scheint in diesem Fall größer zu sein als die Polymerknäuelaufweitung durch zunehmende Säurekonzentration. Bei höherer Säurekonzentration wird die Polymerkette stärker protoniert und die Kettensteifigkeit nimmt ab. Durch die geringe Molmasse ist die Viskositätsergiebigkeit auch schon bei 1,5 % Essigsäure im Gegensatz zu Chitosan 8 stark herabgesetzt.



Chitosan 9 weist die höchste Molmasse und den geringsten Deacetalisierungsgrad auf. Hier kommt es zu einem Anstieg der Viskositätsergiebigkeit mit der Säurekonzentration (Abbildung 60). Durch den geringen Deacetalisierungsgrad dieser Probe werden die Polymerketten bei geringen Säurekonzentrationen nicht in einem ausreichenden Maße in den kationischen Zustand überführt. Dadurch kommt es vermutlich zur Ausbildung von Mikrogelen in der ansonsten klaren Lösung. Insbesondere die Zunahme an

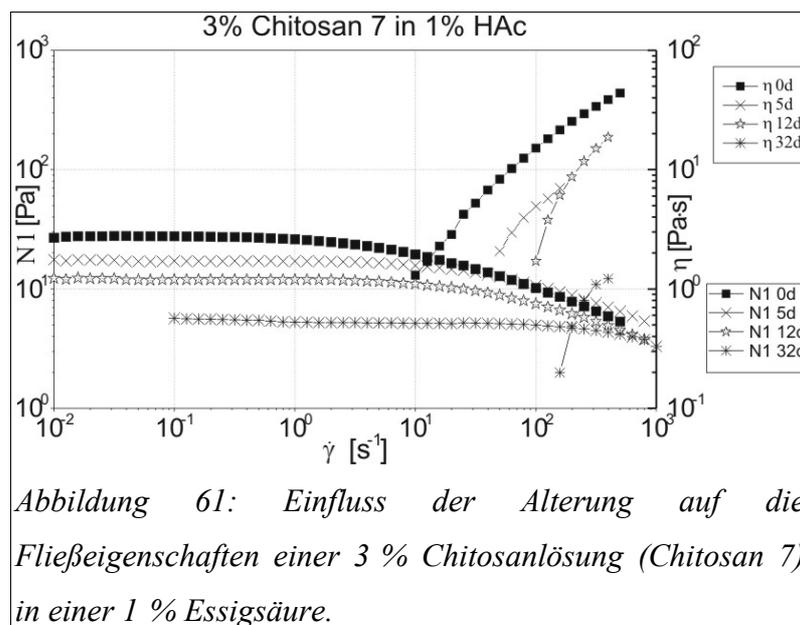
Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen dem Chitosan mit hohem Anteil an Chitin ausbilden können, können zu solchen Clustern führen. Erst bei einer Säurekonzentration von 5 % werden diese Bereiche weitestgehend gelöst.

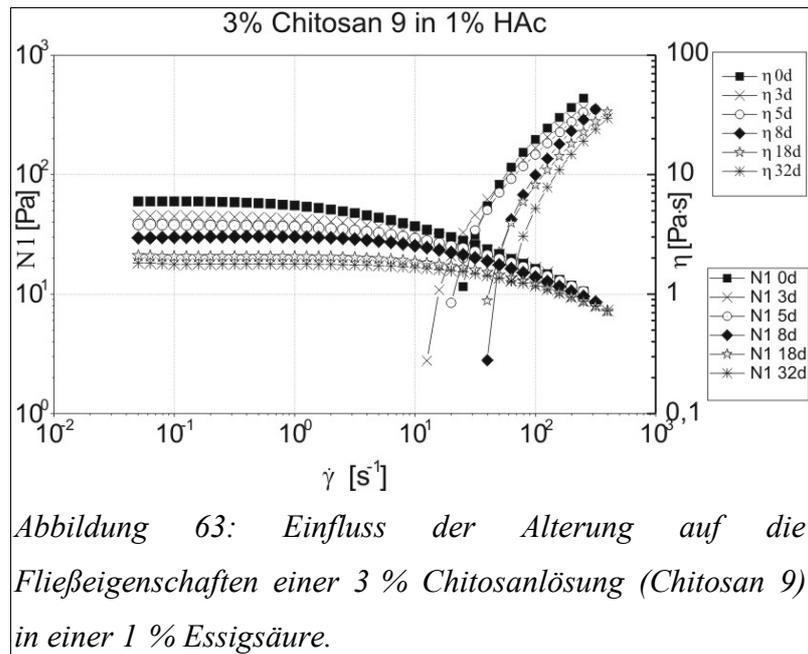
### Alterung

Es wurde zunächst subjektiv festgestellt, dass die frisch bereiteten Chitosanlösungen schon nach wenigen Tagen eine Reduzierung der Viskoergiebigkeit zeigt. Diese Reduzierung der Viskoergiebigkeit kann als Ursache einen Molmassenabbau haben. Die Molmasse kann durch folgenden Faktoren abgebaut werden:

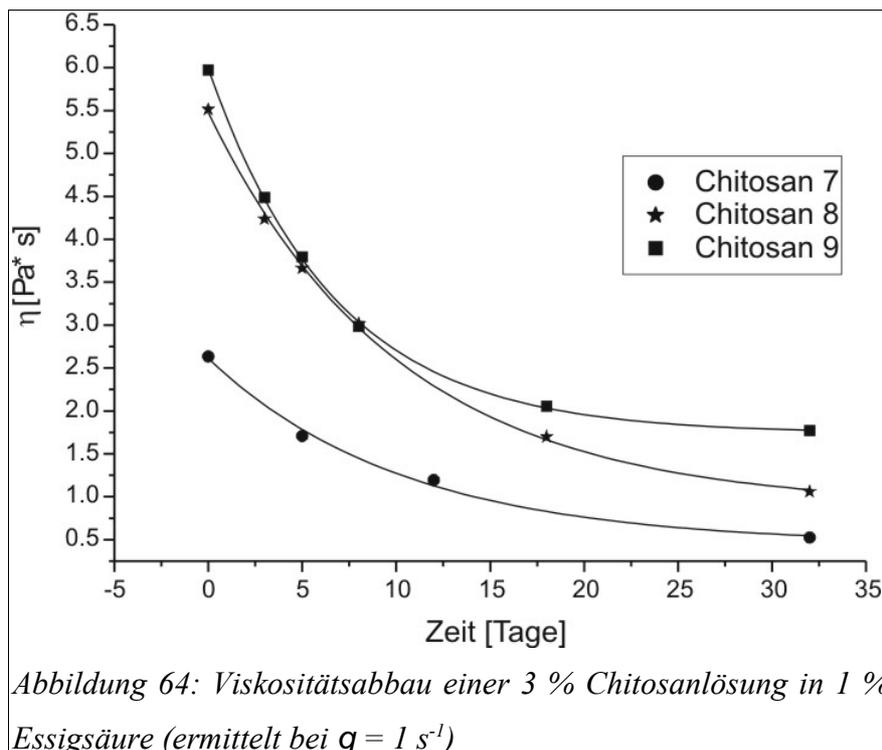
- mikrobiologischer Abbau (Enzyme, Bakterien, Pilze)
- säure katalysierter Abbau
- Strahlung, Wärme
- oxidativer Abbau (z.B. Sauerstoff)

Es wurden aufgrund dessen, Stabilitätsuntersuchungen mit verschiedenen Chitosanen durchgeführt. Hierbei wurden die Lösungen in einer Braunglasflasche, bei Raumtemperatur, an einem dunklen Ort gelagert, um eine Degradation der Polymerkette durch Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung zu verhindern. Es wurden zunächst verschiedene Chitosanproben über einen Zeitraum von 32 Tagen vermessen (Abbildung 61-Abbildung 63).





Es kommt innerhalb dieser Zeitspanne zu einem exponentiellen Abfall der Viskosität über den gesamten Schergeschwindigkeitsbereich. Die Normalspannung 1. Ordnung (N1) verschiebt sich außerdem zu höheren Schergeschwindigkeiten. Dieses Verhalten weist auf einen Molmassenabbau in Lösung hin (siehe Abbildung 61-Abbildung 63).



In Abbildung 64 ist die Viskositätsabnahme einer 3 % Chitosanlösung (Chitosan 7, 8 und 9) in einer 1 % Essigsäure dargestellt. Die Viskositätsverringern und der damit verbundene Molmassenabbau zeigt einen exponentiellen Verlauf. Dies ist aufgrund der nur geringen Essigsäurekonzentration verwunderlich. Rein rechnerisch kann das verwendete Chitosan ca. 15 mmol der Säure zur Protonierung der Amingruppe verwenden. Es würde dann nur noch eine restliche Essigsäurekonzentration von ca. 1,7 mmol/l vorliegen.

### Mikrobieller Abbau

Verschiedene Mikroorganismen können insbesondere natürliche Polymere zersetzen. Deshalb wurde die Chitosanlösung auf eventuellen mikrobiologischen Befall untersucht. Hierzu wurde ca. 250  $\mu\text{l}$  frische und ca. 14 Tage alte Chitosanlösung auf einem sogenannten „all count“ Nährboden mit Hilfe eines Dringalskispatel aufgetragen und bei 36 °C einen Woche kultiviert. Nach Ablauf dieser Wachstumszeit konnte keinerlei Verkeimung des Nährbodens nachgewiesen werden. Es befanden sich also keine Mikroorganismen innerhalb der Lösung. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich Mikroorganismen in der Lösung befinden, die keinen optimalen Wachstumsbedingungen auf dem „all count“ Nährboden vorfinden. Deshalb wurde zu den Chitosanlösungen ca. 200 ppm Natriumazid gegeben um eventuell vorhandene Mikroorganismen abzutöten.

Um zu überprüfen ob sich aus Chitosanacetaten bzw. Chitosanlactaten die wasserlöslich sind, langzeitstabile Lösungen herstellen lassen, wurden 3 % Chitosanlösungen die 0,75 % Essigsäure bzw. 1,2 % Milchsäure enthalten, gefriergetrocknet. Die erhaltenen Chitosanacetate bzw. Chitosanlactate wurden in dem Wasser gelöst das 200 ppm  $\text{NaN}_3$  enthält, um eine Beeinflussung von Mikroben auszuschließen.

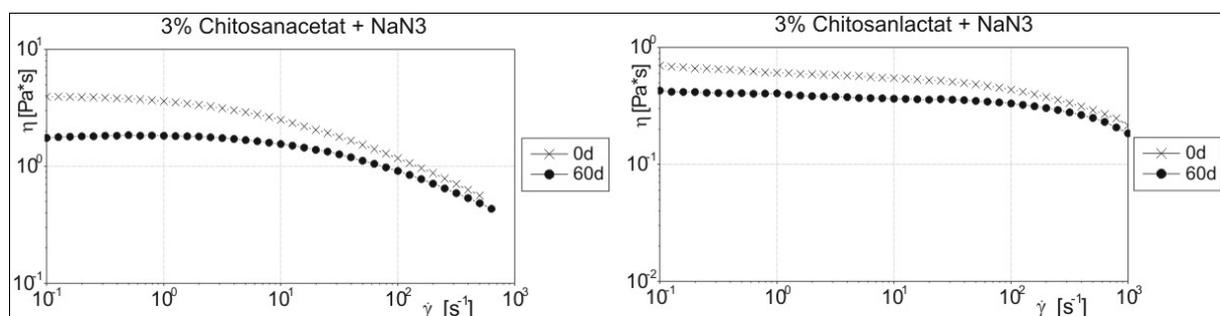


Abbildung 65: Einfluss der Alterung auf die Fließeigenschaften einer 3 % Chitosanacetat- bzw. Chitosanlactat-Lösung (Chitosan 9).

Auch hier zeigt sich in Abbildung 65 eine Reduzierung der Viskosität mit der Zeit, diese ist jedoch wesentlich geringer als die aus Abbildung 61-Abbildung 63). Auch bei diesen Lösungen entsteht durch die chemische Gleichgewichtseinstellung - in der Lösung hervorgerufen durch das enthaltene Chitosanacetat bzw. Chitosanlactat - eine saure Lösung. Durch den pKs von 6,3 des Chitosans wird ein Teil des z.B. Acetates in der Lösung durch die chemische Gleichgewichtseinstellung zur Essigsäure umgesetzt.

Da alle anderen Faktoren eliminiert wurden, führt anscheinend auch eine geringe Säurekonzentration durch katalytische Aldolspaltung der glucoseanalogen Monomereinheit des Chitosans zu einem Bindungsbruch und damit auch zu einem Abbau der Molmasse.

### **3.3 Poly-Diallyldimethylammoniumchlorid**

Im historischen Kontext handelt es sich bei Polykationen mit einer quaternären Stickstoffeinheit um die technisch wichtigsten und am häufigsten genutzten wasserlöslichen Polyelektrolyte. Bei Poly-DADMAC (Poly-Diallyldimethylammoniumchlorid) handelt es sich um das erste technisch genutzte Polykation mit einer quaternären Stickstoffeinheit. Es wurde 1951 von G. B. Butler aus Diallyldimethylammoniumchlorid (DADMAC) hergestellt und beschrieben [111]. Die Untersuchungen der Kinetik der Polymerisation und die Strukturklärung erfolgten in den Achtzigern. Das Forschungsinteresse ist bis heute ungebrochen. Dies liegt zum einen an der einzigartigen chemischen Struktur und zum anderen an dem weiten Applikationsbereich von Poly-DADMAC. Die primären technischen Anwendungsgebiete liegen in den Bereichen der Flockungshilfsmittel, Entwässerung, Coagulation, Retention, Flotation, Symplexmembranen und anderen ähnlichen Trennprozessen.

#### **3.3.1 Herstellung und molekularer Aufbau**

Poly-DADMAC wird hauptsächlich in einer zweistufigen Reaktion hergestellt. Hierbei wird erst aus Dimethylchlorid und Allylchlorid in einer alkalischen wässrigen Lösung das

---

[111] Butler G.B., Ingley F.L.; J. Am. Chem. Soc., (1951), 72, S. 894

Monomer Diallyldimethylammoniumchlorid hergestellt (siehe Abbildung 66). Alternative Verfahren zur Herstellung des Monomers, bei denen z.B. Diallylaminocyanid eingesetzt wird, sind untersucht worden. Diese konnten sich in der technischen Herstellung jedoch nicht durchsetzen. Die Wahl der Monomerherstellung beeinflusst maßgeblich die Produktqualität des Endproduktes, so dass drei unterschiedliche Qualitäten erzeugt werden können.

- Festes DADMAC
- wässrige DADMAC-Lösung mit Natriumchlorid
- wässrige DADMAC-Lösung ohne Natriumchlorid

Die anschließende radikalische Homopolymerisation von DADMAC (siehe Abbildung 66) ist in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln wie z.B. Aceton, 1-Methyl-2-pyrillidon, Tetramethylharnstoff oder Dimethylformamid möglich. Da die Monomerlöslichkeit in diesen Lösungsmitteln limitiert ist und das resultierende Polymer nur eine Löslichkeit in Wasser, Essigsäure und Methanol aufweist, wird bei der technischen Herstellung in einer wässrigen Lösung gearbeitet.

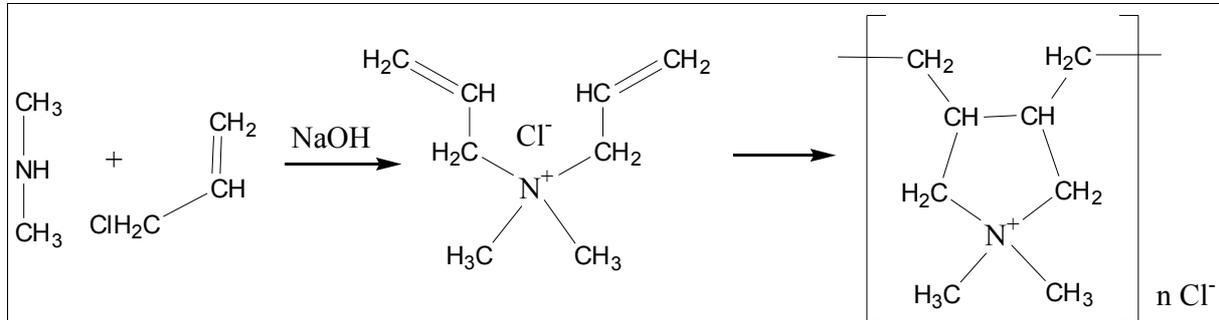


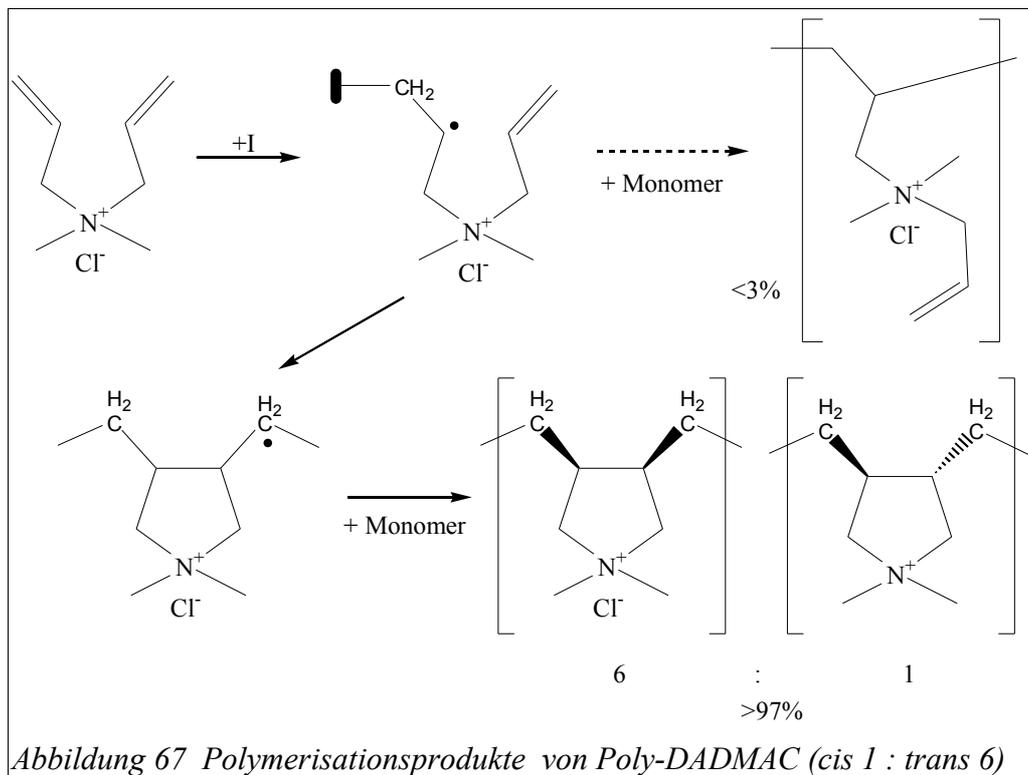
Abbildung 66: Herstellung des Monomers und anschließende radikalische Polymerisation

Für die Herstellung von Symplexmembranen wurde technisches Poly-DADMAC mit dem Handelsnamen Polyquad eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine wässrige Poly-DADMAC Lösung ohne Natriumchlorid.

Butler et. al. postulierte 1960 die Bildung eines verknüpften sechsgliedrigen zyklischen Systems für Poly-DADMAC. Insbesondere mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie wurden jedoch ausnahmslos fünfgliedrige Ringsysteme [112][113] gefunden (siehe Abbildung 67).

[112] Ottenbrite R.M., Shillady D.D., Polymeric amines and ammonium salts, (1980) Pergamon Press, Oxford, S. 143

[113] Masterman T.C., Dando N.R., Weaver D.G., Seyferth D., J. Polym. Sci., Part B: Polym. Physics, Vol. 32, (1994), S. 2263



Diese quaternären pyridinium Ringe liegen in einem Verhältnis von 1:6 in einer cis- bzw. trans-Konfiguration vor. Die Ringe sind über Ethylenbrücken an der 3,4-Position miteinander verknüpft. Umfassende Veränderungen hinsichtlich der Reaktionsbedingungen (Variation des Lösungsmittels, der Initialisierung und der Temperatur) haben gezeigt, dass sich die Ringgröße und das 6:1 Verhältnis zwischen der cis- und trans-Substitution nicht beeinflussen lässt [114] [115]. Durch unterschiedliche Lokalisierungsmöglichkeiten des Radikals während des Polymerisationsprozesses kann es zur Bildung von nicht zyklischen Produkten kommen (siehe Abbildung 67). Der Anteil dieser Nebenprodukte steigt mit zunehmender Temperatur und der Monomerkonzentration an. Die Bildung dieser Nebenprodukte kann durch Polymerisieren des gereinigten Monomers unter milden Reaktionsbedingungen annähernd ausgeschlossen werden (<math><1\%</math>). Es muss noch erwähnt werden, dass auch schon eine geringe Konzentration der offenkettigen Struktur von z.B. ca. 3 mol % Methyltriallylammoniumchlorid im Poly-DADMAC zu einer starken Quervernetzung führt, die unlöslich in Wasser ist [116].

Durch die umfassenden Strukturuntersuchungen dieser Verbindungen wurde auf eine NMR-

[114] Lancaster J.E., Bacchei L., Panzer H.P., J. Polym. Sci, Polym. Lett., Vol. 14,(1976), S. 549

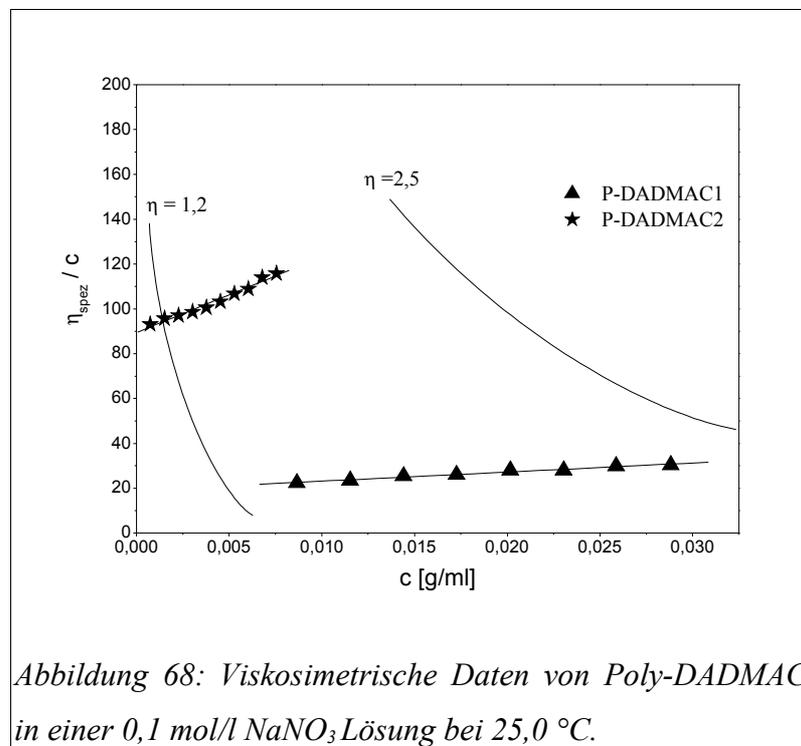
[115] Wandrey C., Jarger W., Reinisch G., Hahn M., Engelhard G., Jancke H, Ballschuh D., Acta Polym, Vol. 32, (1981), S. 179

[116] EP 0265710, Jaeger W., Wandrey C., Hahn M., Ballschuh D., Ohme R., Staack R., Biering H., (1987)

Untersuchung verzichtet und von der oben gezeigten ausgegangen.

### 3.3.2 Viskosimetrie

Der Staudinger-Index ( $[\eta]$ ) wurde durch eine Konzentrationsreihe mit Hilfe eines Ubbelohde-Viskosimeters des Typs Ic bestimmt. Als Lösungsmittel für die Viskosimetrie wurde eine 0,1 mol/l Natriumnitratlösung mit 200 ppm Natriumazid verwendet. Anschließend wird die Lösung durch einen 20  $\mu\text{m}$  Nylonfilter filtriert. Hierdurch werden effektiv größere Bestandteile aus der Lösung entfernt.



Die viskosimetrischen Daten der untersuchten Proben (Abbildung 68) weisen eine lineare Abhängigkeit auf. Es ist somit möglich den Staudingerindex für die untersuchten Proben zu ermitteln.

Die Tabelle 17 gibt eine Übersicht der viskosimetrisch ermittelten Daten des für die Symplexherstellung eingesetzten Poly-DADMACs.

Poly-DADMAC	P-DADMAC1	P-DADMAC2
Trockengehalt [%]	37,6	38,2
$[\eta]$ [ml/g]	20,2	87,3
$M_{\eta}$ [g/mol]	8.000	42.800

<b>Poly-DADMAC</b>	<b>P-DADMAC1</b>	<b>P-DADMAC2</b>
DP	63	340
$k_H$	0,87	0,49
$k_H^* [\eta]^2$	358	3.740
$c_{\text{kritisch}} (\text{visko.}) [\%]$	12	2,8
Knäueldurchm. [nm] (visko.)	12,8	36
Knäuelvol. [nm <sup>3</sup> ]	1.100	25.800

*Tabelle 17: Übersicht der viskosimetrisch ermittelten Daten des für die Symplexherstellung eingesetzten Poly-DADMACs.*

## 4 Membranen

### 4.1 Allgemeines

Wenn man die wirtschaftliche Entwicklung in den letzten Jahren verfolgt, stellt man fest, dass die Nachfrage nach saubereren und sichereren Produkten und Prozessen gestiegen ist. Dies ist wiederum nur durch Einschränkung der Materialien und Energieressourcen realisierbar. Von den meisten Regierungen wird ein effizienterer Umgang mit Materialien und natürlichen Ressourcen gefordert, deshalb sind die Hauptaufgaben, Verschwendungen und Umweltverschmutzungen zu vermeiden, Lebensqualitäten zu verbessern und die Umwelt zu schützen. Im Rahmen dieser Aufgabenstellung spielen Stofftrennprozesse eine wichtige Rolle. Trennverfahren unter Einsatz von Membranen haben heute verstärktes Interesse gefunden,

1. da sie einen geringen Energieeinsatz benötigen,
2. da mit speziellen - auf das Trennproblem abgestimmten - Membranen sehr günstige Selektivitäten zu erzielen sind und
3. da sie schonende Trennungen bei niedriger Temperatur ermöglichen.

Der Begriff „Membran“ (lat.: dünnes Häutchen) wurde erstmals am Ende des 19. Jahrhunderts für Trennmateriale in Diffusions- und Osmoseexperimenten verwendet.

Aber auch bei der Heilungsunterstützung von Wunden haben sich Membranen bereits bewährt. Für diesen Anwendungsbereich sollten die Membranen einen hohen Flüssigkeitstransport gewährleisten ohne den Wundgrund auszutrocknen. Des Weiteren muss eine geringe Gasdurchlässigkeit sichergestellt werden, damit sich keine anaeroben Mikroorganismen in dem Wundbett ansiedeln können. Außerdem muss eine solche Wundauflage gewebeverträglich sein und sollte bei Verwendung von Kunststoffen keine toxischen Monomere oder Hilfsstoffe enthalten.

Bei organischen Membranen handelt es sich im allgemeinen um polymere Netzwerke. Die Erzeugung eines Netzwerkes führt zu einer Quellbarkeit der Membranen in Lösungsmitteln ohne jedoch die Membran aufzulösen. Das Netzwerk kann physikalisch durch Verschlaufungen oder chemisch durch den Einsatz eines Vernetzers gebildet werden.

### Vernetzungsreaktion z.B. Chitosanmembran:

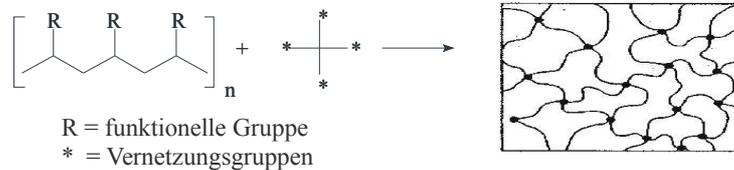


Abbildung 69: Kovalent vernetzte Membran mit einem mindestens bifunktionalen Vernetzer

Wie in Abbildung 69 abgebildet, werden die funktionellen Gruppen des Polymers mit einem mindestens bifunktionellen meist sehr reaktiven Vernetzer zu dem chemisch verknüpften Netzwerk hergestellt. Der Vernetzer sollte eine kleine Molmasse aufweisen, damit er gut durch die Polymerketten diffundieren kann und die funktionellen Gruppen des Vernetzers müssen mit den funktionellen Gruppen des verwendeten Polymers möglichst quantitativ eine permanente kovalente Verbindung eingehen.

Der Vorteil dieser chemisch verknüpften Netzwerke liegt in der absoluten Unlöslichkeit dieser Netzwerke gegenüber Lösungsmitteln. Hierdurch kann bei der Wundversorgung sichergestellt werden dass keine Polymere in die Wundflüssigkeit gelangen.

### Symplex Reaktion z.B. Symplexmembranen

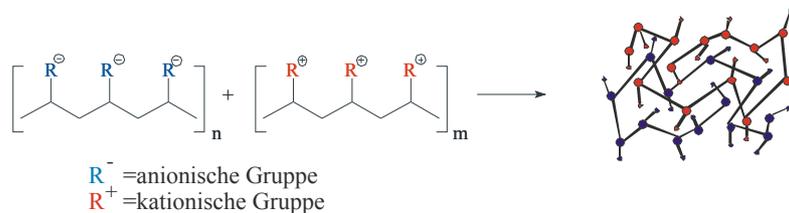


Abbildung 70: Symplexbildung zwischen Polyelektrolyten mit entgegengesetzter Ladung

Bei der Symplexreaktion werden Polyelektrolyte mit entgegengesetztem Vorzeichen zu den entsprechenden Symplexen umgesetzt (Abbildung 70). Das entstandene Netzwerk wird maßgeblich durch die coulombschen Wechselwirkungen zwischen den Polyelektrolyten bestimmt. Durch die im Vergleich zu der kovalenten Verknüpfung labileren ionischen Verknüpfungspunkte kann die Symplexmembran auch leichter von Lösungsmitteln oder höherwertigen Salzen aufgelöst werden.



Ein Sonderfall stellt die biochemische Herstellung von Netzwerken mit *Acetobacter xylinum* dar, bei denen ein physikalisches Netzwerk entsteht (Abbildung 71). Es entsteht so mikrobiologisch hochkristalline, hochgequollene Cellulose, bei der die einzelnen Cellulosefäden verschlauft und verflochten ineinander vorliegen. Es handelt sich hierbei um ein physikalisches Netzwerk bei dem die Verschlaufungen durch Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen den einzelnen Polymerfilamenten ausbilden, fixiert werden.

## 4.2 Symplexe

Als Symplex bezeichnet man einen Komplex aus entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten. Die Wechselwirkungen zwischen den anionischen Polyelektrolyten auf der einen Seite und den kationischen Polyelektrolyten auf der anderen Seite sind hauptsächlich ionischer Natur. Neben den coulombschen Wechselwirkungen sind aber auch noch andere Kräfte wie, Van der Waals-, Dipol- Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zu berücksichtigen [117][118][119].

So wird die Netzwerkstruktur der Symplexe maßgeblich durch die Eigenschaften der

[117] W. Oppermann, Th. Schulz, Interaction Between oppositely charged Polyelectrolytes in aqueous Solution, Macromol. Chem. - Macromolecular Symposia, Vol. 39, (1990), S. 293 – 299

[118] V- A. Kabanov, A.-B. Zezin, U.-V. Izumrudov, T.-K. Bronitch et al., Structure formation and Gelation Phenomena in Solutions of Ternary Interpolyelectrolyte Complexes, Macromol. Chem. - Macromol. Symposium, Vol. 39, (1990), S. 155 - 169

[119] Wang Hanfu, Li Wenjun, Lu Yuhua, Wang Zhiliang, Studies on chitosan and poly(acrylic acid) interpolymer complex. I. Preparation, structure, pH-sensitivity, and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semi-interpenetrating polymer network, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 65, (8), (1997), S. 1445-1450

---

Polyelektrolyte bestimmt.

Eine Beeinflussung der Stärke der coulombschen Wechselwirkung kann hervorgerufen werden von der:

- Ladungsdichte
- Art der ionischen Gruppe
- Molmasse
- Molmassenverteilung

Außerdem kann die Struktur durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Mediums, in dem die Reaktion stattfindet, beeinflusst werden. Bei der Zugabe von Salzen in das Reaktionsmedium beeinflussen zwei gegenläufige Effekte die Struktur der Symplexe. Der Aussalzeffekt, erhöht durch Aggregation die Partikelmasse und der elektrische Abschirmeffekt, führt über eine Quellung zu einer Auflösung der Symplexe. Welcher Effekt überwiegt ist von anderen Systemparametern abhängig [120] [121] [122].

In der Literatur werden zwei Grenzstrukturen für Symplexe beschrieben [123].

Das Leiter-Modell ist eine idealisierte Vorstellung der coulombschen Wechselwirkung zwischen einem Polyanion und einem Polykation. Es wird von fixierten ionischen Verknüpfungspunkten ausgegangen, bei denen eine positive Ladung eine negative neutralisiert. Bei der Verwendung von sehr kurzen Polymeren bzw. Oligomeren mit einer hohen Ladungsdichte wie z.B. Polyacrylsäure zeigen Molekular-Modelling-Berechnungen dieser Verbindungen eine heliziale Struktur, die dem Leiter-Modell sehr nahekommen (siehe Abbildung 72 und Abbildung 73).

---

[120] Tsuchida Eishun, Yamamoto Kimihisa, Shouji Eiichi, Electrophilic reaction of phenyl bis(phenylthio) sulfonium cation as an active species for the oxidative polymerization of diphenyl disulfide, *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry*, Vol A31, (11), (1994), S. 1579-1589

[121] Lee Kueir-Rarn, Lai Juin-Yih, Pervaporation of aqueous alcohol mixtures through a membrane prepared by grafting of polar monomer onto nylon 4, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 57, (8), (1995), S. 961-968

[122] Dautzenberg Horst, et.al., Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 875 (Bioartificial Organs II), (1999), S. 46-63

[123] Dautzenberg H. et al., *Polyelektrolytes - Formation, Characterisation and Application*, Gardener Cincinnati, (1994)

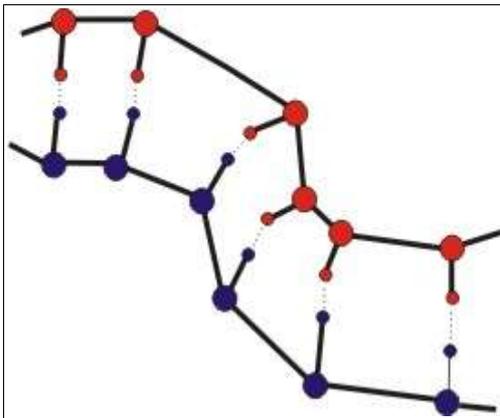


Abbildung 73: Leitermodell eines Symplex

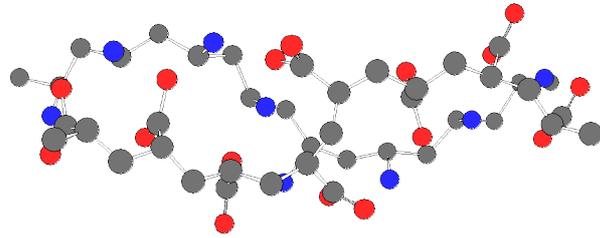


Abbildung 72: Molekülorbital-Berechnung eines Polykations und eines Polyanions

Hierbei stellen in Abbildung 72 die roten „Kugeln“ Sauerstoffatome, die blauen Stickstoffatome und die grauen Kohlenstoffatome dar. Es wurden hierbei Oligomere von Polyacrylsäure und Polyamin jeweils in ihrer ionischen Form zur Molekülorbital-Berechnung verwendet.

Das chaotische Modell geht von einer statistischen Ladungskompensation zwischen den Polyelektrolyten aus (Abbildung 74).

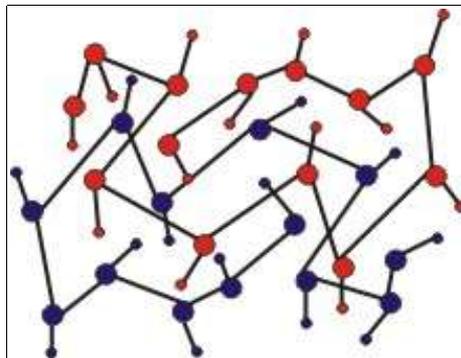


Abbildung 74: chaotisches Modell eines Symplexes

Durch die schnelle Entwicklung von Mikroprozessoren ist es möglich, mit einem handelsüblichen Computer molekulare Strukturberechnungen in einem zeitlich akzeptablen Rahmen durchzuführen. So wurden mit Hilfe einer Molekular Modeling Software eine 3 dimensionale Struktur eines Symplexes aus jeweils 16 Grundeinheiten von Chitosan als Polykation und Sulfoethylcellulose als Polyanion berechnet (Abbildung 75). Die Berechnung

berücksichtigt die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen (z.B. Ionische-WW, Van-der-Waals-WW, Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen den Molekülen. Der Einfluss des Lösungsmittelsystem mit seinen vielfältigen Wechselwirkungen wird nicht berücksichtigt. Verbunden mit den Erkenntnissen der Lösungsstruktur von wässrigen Polyelektrolytlösungen ist es möglich, eine alternative Strukturvorstellung zu entwickeln.

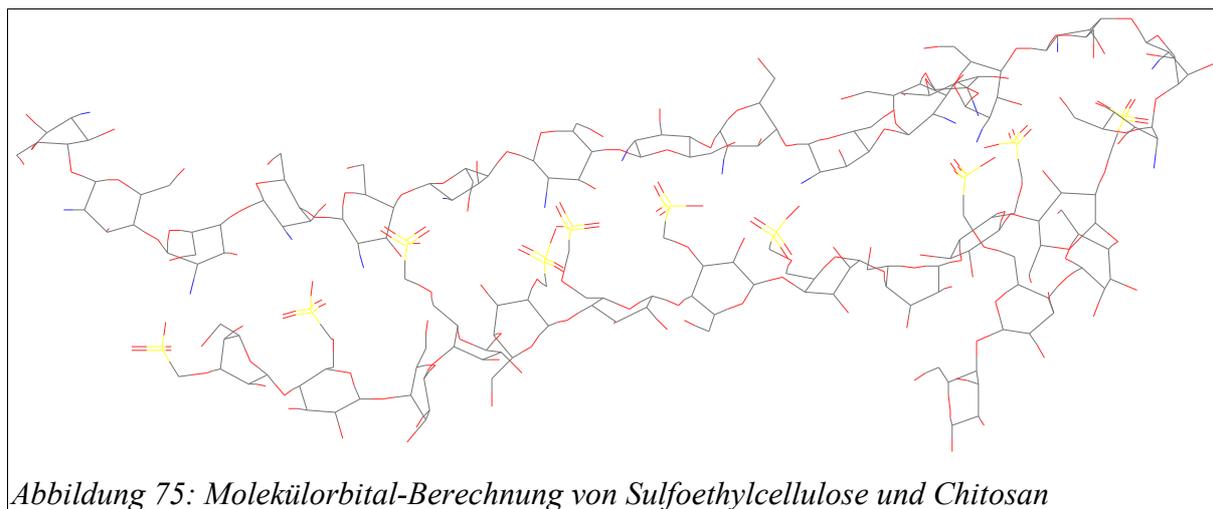


Abbildung 75: Molekülorbital-Berechnung von Sulfoethylcellulose und Chitosan

Die berechnete Struktur zeigt eine weitgehend gestreckte, helicale Struktur des Symplexes. Die Lösungsstruktur von wässrigen Polyelektrolytlösungen zeigt oberhalb von der kritischen Polykonzentration eine Durchdringung und Verschlaufung der Polymerketten untereinander. Wenn nun bei der Symplexbildung das entgegengesetzt geladene Polymer in die Lösung eindiffundiert, lagern sich die Polymermoleküle aneinander, um eine 1:1 Ladungsabsättigung zu erreichen. Nach den Ergebnissen der MO-Berechnungen sollte sich eine helicale Struktur der Polyanionen und Polykationen bilden, die jedoch aufgrund Ihrer Länge ähnlich wie in der Lösungsstruktur ineinander verschlauft vorliegt (siehe Abbildung 76 und Abbildung 77). Durch positive und negative Überschussladungen an den Polymerketten können sich nun zusätzliche Verknüpfungspunkte bilden und es entsteht so ein polymeres Netzwerk (siehe Abbildung 77).

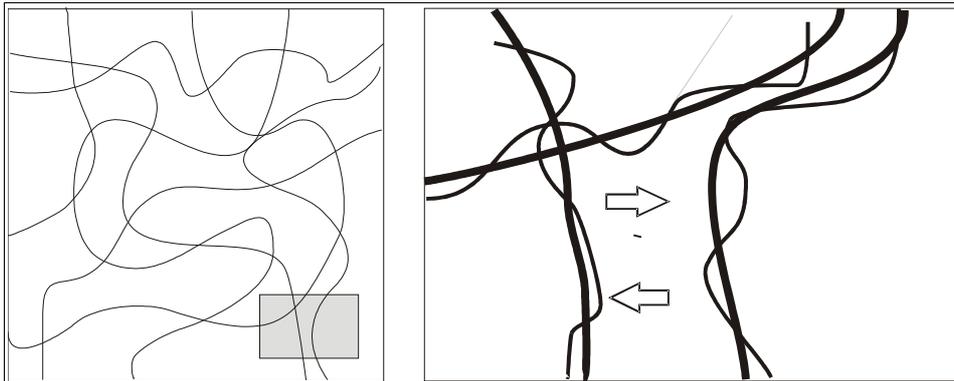


Abbildung 76: links Lösungsstruktur, rechts Bildung zusätzlicher Verschlaufungen und Verknüpfungspunkte nach der Symplexbildung

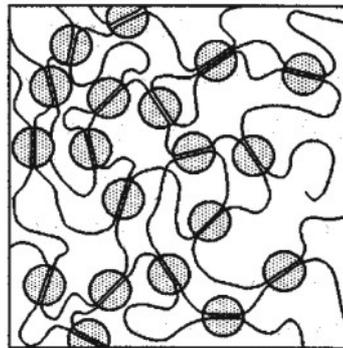


Abbildung 77: Symplex Netzwerk die grau unterlegten Bereiche zeigen die ionischen Verknüpfungsbereiche

Es ist davon auszugehen, dass die wirklichen Strukturen im Bereich zwischen diesen Grenzfällen zu finden sind, wobei das Chaotische-Modell aufgrund der großen Entropie leicht zu bevorzugen ist.

Symplexmbranen zeichnen sich durch Eigenschaften aus, die sie sehr wertvoll für die Anwendung in Trennprozessen machen:

- Unlöslichkeit in Wasser und anderen Lösungsmitteln
- Löslichkeit nur in bestimmten trimeren Gemischen aus Wasser, organischen Lösungsmitteln und starken Elektrolyten, die einen sogenannten ionischen Schirm ausbilden
- akzeptable Trennfaktoren bei hohem Permeatfluss
- in technischen Maßstab einfach herstellbar und gut handhabbar

- hohe Selektivität
- chemische und bakterielle Resistenz
- hohe Quelfähigkeit in Wasser

Durch dieses Eigenschaftsprofil ist es möglich, mit Symplexmembran in technischen Anwendungen Alkohol-Wasser-Mischungen mit einer hohen Selektivität bei gleichzeitig hohem Permeatfluss zu trennen [124]. Diese Eigenschaftsprofile, insbesondere die hohe Quelfähigkeit und Selektivität gegenüber wässrigen Systemen, lassen vermuten, dass diese Symplexe auch in der Wundheilung hilfreich sein könnten.

Symplexmembranen können durch eine spontane Grenzflächenreaktion zwischen den wässrigen Lösungen der Polyelektrolyte erzeugt werden. Bei dieser Herstellungsvariante verläuft die Grenzflächenreaktion und somit auch die Bildung eines Symplexes schon bei Raumtemperatur innerhalb von Sekundenbruchteilen. Dies kann mit einem einfachen Versuchsaufbau gezeigt werden, bei der eine z.B. wässrige Lösung eines Polyanions unter intensivem Rühren in eine polykationische Lösung getropft wird. Es entstehen Symplex Kapseln die stark an „Froschlauch“ (Kapselgröße = Tropfengröße) erinnern. Es muss sich also die Membran bereits um die eingetropfte, polyanionische Lösung ausgebildet haben bevor sie den Rührer erreicht, an dem sie sonst dispergiert werden würde.

In den Kapseln befindet sich noch nicht umgesetzte Polyelektrolytlösung, die mit der Zeit durch Diffusionsprozesse durch die Symplexmembran nach außen gelangt. Dies führt zu einer milchigweißen Trübung der Polyelektrolyt-Lösungen (siehe Abbildung 78).



Abbildung 78: kinetische Betrachtung der Symplexbildung - (< 1 s spontane Symplexbildung)

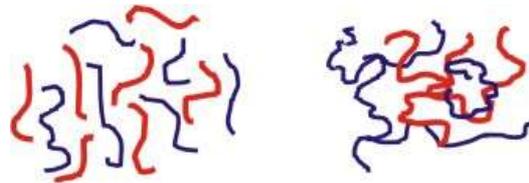
Die Membranbildung erfolgt durch ein wechselseitiges Ineinanderdiffundieren der Reaktionspartner, wobei sich der im Reaktionsmedium unlösliche Symplex ausbildet. Dieser

[124] Susanne Knop, W.-M. Kulicke, Dissertation, Synthese und Charakterisierung von Symplex-Membranen zur Pervaporation von Alkohol-Wasser-Mischungen, Universität Hamburg, 2000

Vorgang läuft wie bereits beschrieben innerhalb kurzer Zeiträume und weitreichend ab, so dass großflächige mechanisch stabile Gebilde erhalten werden. Die Eigenschaften der Membranen sind sowohl von den eingesetzten Polyelektrolyten als auch von dem Reaktionsmedium abhängig [125].

### **Einfluss der Molmasse:**

Bei einer geringen Molmasse der Polyelektrolyten kann sich keine klare durchsichtige Membran aufgrund fehlender Verhakungsmöglichkeiten der Polymerketten untereinander ausbilden. Wird sowohl ein niedermolekulares Polyanion als auch ein niedermolekulares Polycation zur Reaktion gebracht, entstehen Strukturen, die dem Leitermodell nahekommen. Durch die fehlenden Verschlaufungsmöglichkeiten und die Kompensation der Ladung der Polyelektrolyten, fällt aus der wässrigen Lösung ein weißer Feststoff aus. Solche niedermolekularen Polyelektrolyte können deshalb als Flockungshilfsmittel oder für Polyelektrolyttirationen eingesetzt werden.



*Abbildung 79: Symplexmodell Netzerkennung durch coulombsche WW.*

Werden für die beiden Ausgangskomponenten hochmolekulare Verbindungen gewählt, entsteht eine klare Membran, aufgrund ausreichender Verhakungsmöglichkeiten der Polymere untereinander (Abbildung 79). Durch die Grenzflächenreaktion, die bei der Herstellung der Membranen durchgeführt wird, müssen jedoch die Polyelektrolyten durch die spontan entstandene Symplexmembran hindurchdiffundieren. Eine hohe Molmasse der Polyelektrolyten verringert die Diffusionsgeschwindigkeit durch die Membran drastisch, hierdurch lassen sich nur sehr dünne oder gar keine Membranen ausbilden (siehe Abbildung 80).

[125] Dunn E. J., Zhang X., Sun D., Goosen M. F. A., Synthesis of N-(aminoalkyl)chitosan for microcapsules, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 50 (2), (1993), S. 353-365

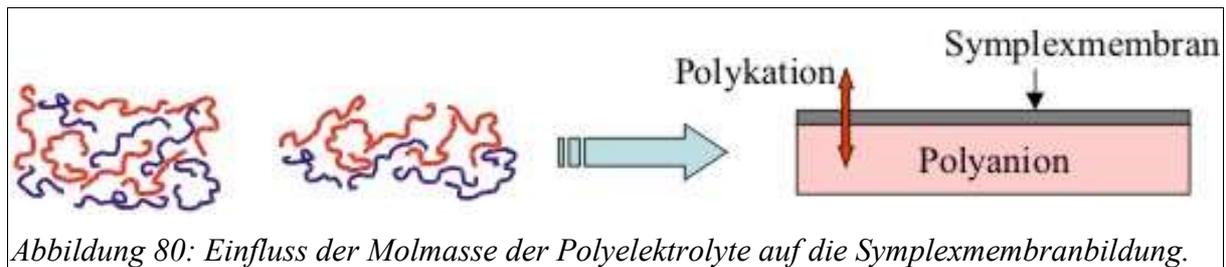


Abbildung 80: Einfluss der Molmasse der Polyelektrolyte auf die Symplexmembranbildung.

Die Ladungsdichte der Komponenten beeinflusst die Lösungseigenschaften der Polyelektrolyte und die Netzwerkstruktur der Symplexe (Abbildung 81). Ist der Substitutionsgrad der Polyelektrolyte zu niedrig, kann das Polymer nicht in wässrigen Systemen gelöst werden. Ist die Ladungsdichte zu hoch - dies betrifft insbesondere die polyanionischen Komponente - bilden sich keine glasklaren Membranen sondern nur unzusammenhängende Flocken. Durch die hohe Ladungsdichte werden sehr kompakte Netzwerke erhalten, die nicht mehr in einem ausreichend gequollenen Zustand vorliegen und somit weiße teilkristalline Bereiche aufweisen oder sogar aus der Lösung ausfallen.

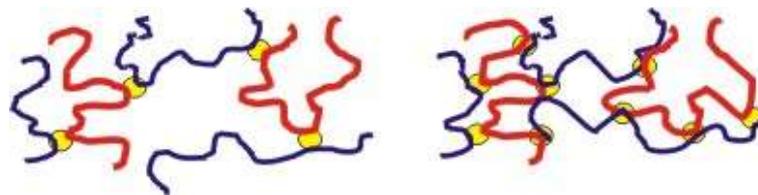


Abbildung 81: Einfluss der Ladungsdichte auf die Netzwerkpunkttdichte.

Die Viskosität der Ausgangslösung, die auf einen geeigneten Träger aufgebracht wird und anschließend in einem Tauchbadverfahren über eine Grenzflächenreaktion zu den Symplexen umgesetzt wird, sollte in einem bestimmten Bereich liegen. Bei zu dünnflüssigen Lösungen besteht die Gefahr, dass der aufgezogene gleichmäßige Film reißt wenn er in das Tauchbad gegeben wird. Eine hohe Viskosität der Lösung verlangsamt stark die Diffusionsgeschwindigkeit der Komponenten. Dies führt zu einer Verlängerung der Reaktionszeiten.

Der pH-Wert des Mediums übt einen Einfluss auf die Ladungsdichte der Komponenten aus. Polyanionen, die meist als funktionelle Gruppe eine Sulfonsäure enthalten, bauen erst durch die Abgabe eines Hydroniumions ihre Ladungsdichte auf. Ein alkalisches Medium erleichtert die Abgabe eines Hydroniumions und erhöht hierdurch die Ladungsdichte der Komponente. Ein saures Medium verringert die Abgabe eines Hydroniumions und erniedrigt hierdurch die

Ladungsdichte des Polyanions. Bei Polykation wie z.B. Chitosan, bei der die Ladungsdichte durch die Protonierung der Amin-Gruppe erst aufgebaut wird, gilt der oben beschriebene Zusammenhang antiproportional. So wird bei Verwendung von Chitosan als Polykation erst eine Wasserlöslichkeit in sauren Lösungen erreicht, da sich erst bei einem pH Wert von ca. 4-5 das Gleichgewicht auf der Seite des kationischen Chitosans befindet. Die eingesetzte Säure, z.B. Essigsäure, wird hierbei für die Protonierung der Amin-Gruppe verbraucht und es entsteht das entsprechende Salz des protonierten Chitosans (siehe auch Abbildung 82).

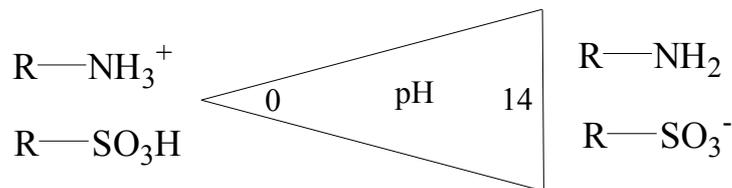


Abbildung 82: *pH Abhängigkeit der Ladungsdichte von Polyelektrolyten.*

Die Reaktionszeit spielt eine untergeordnete Rolle da die wachsende Membran einen zunehmend größeren Diffusionswiderstand erzeugt, da die Dicke der Membranen bei maximal 30  $\mu\text{m}$  liegen und die Kinetik der Symplexbildung wie oben beschrieben sehr schnell ist, kann bei einer Reaktionszeit von 1 Stunde davon ausgegangen werden, dass die Komponenten vollständig reagiert haben.

Die Reaktionstemperatur kann durch die Verwendung von Wasser als Medium von 0  $^\circ\text{C}$  bis 100  $^\circ\text{C}$  variiert werden. Eine Temperaturerhöhung erhöht naturgemäß die Kinetik der Reaktion, so dass sich die Membranen schneller herstellen lassen. Dies kann insbesondere bei der technischen Herstellung von Membranen ein entscheidender Faktor bei der Reduktion der Produktionskosten sein. Für die durchgeführten Laborsynthesen verläuft die Symplexmembbranbildung ausreichend schnell, so dass bei Raumtemperatur gearbeitet werden kann.

### 4.3 Kovalente und physikalische Netzwerke

Polymere Netzwerke sind neben den verzweigten, gefropften, kammförmigen, sternförmigen und cyclischen Makromolekülen in die Gruppe der nicht-linearen Makromoleküle einzuordnen.

Dabei wird unter einem Netzwerk ein hochverzweigtes Makromolekül verstanden, bei dem alle Kettensegmente in hohem Maße miteinander und mit der makroskopischen Phasengrenze über viele durch das Makromolekül führende permanente Pfade verknüpft sind. Je nach der Art dieser permanenten Pfade wird zwischen kovalenten und physikalischen Netzwerken unterschieden. Während beim kovalenten Netzwerk die permanenten Pfade kovalente Bindungen darstellen, werden bei einem physikalischen Netzwerk einige dieser Bindungen durch physikalische Wechselwirkungen hervorgerufen.

Einen entscheidenden Beitrag zur Stabilität eines physikalischen Netzwerkes eines polymeren Materials leisten resonanzstabilisierte Strukturen (z.B. aromatische und heteroaromatische Gruppen) sowie sekundäre Valenzkräfte (z.B. inter- oder intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und starke Dipol-Dipol Wechselwirkungen). Die Beweglichkeit der Kettensegmente wird maßgeblich durch die Zahl der Netzwerkpunkte beeinflusst.

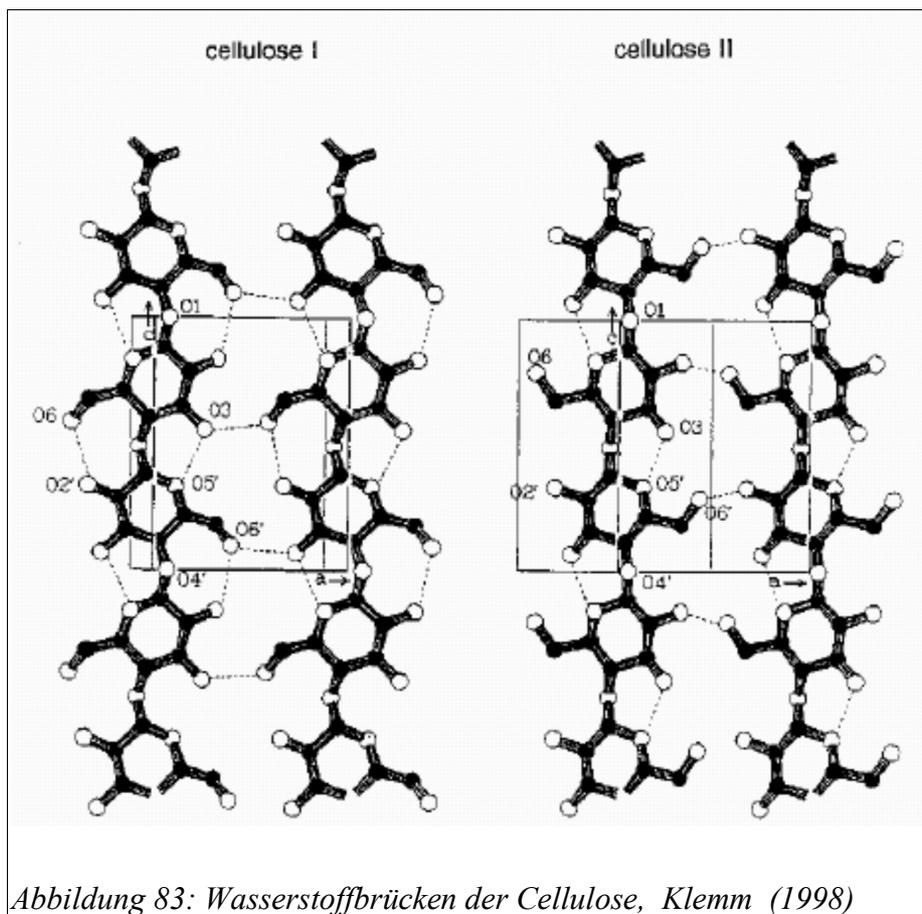
Physikalische Netzwerke sind dadurch gekennzeichnet, dass die Vernetzung reversibel ist. Dies ermöglicht z.B. ein Aufbrechen der Vernetzungsstellen beim Erwärmen. Dadurch werden die Materialien anders als kovalent vernetzte Duomere und Elastomere thermoplastisch verformbar. Dies gilt jedoch nicht für die hier verwendeten Biopolymere, die Ihre Verknüpfungspunkte hauptsächlich durch Wasserstoffbrücken aufbauen. Ein weiterer Unterschied zwischen kovalenten und physikalischen Netzwerken ist, dass letztere nicht in allen Flüssigkeiten quellen, sondern sich auflösen, wenn es zu Wechselwirkungen zwischen den Molekülen der fluiden Phase und den Vernetzungsstellen kommt.

Vor allem bei Biopolymeren, wie der hier verwendeten Cellulose oder Chitosan, spielen Wasserstoffbrückenbindungen eine entscheidende Rolle. Bei der Cellulose wird die Steifheit der Celluloseketten durch intramolekulare Wasserstoffbrücken bestimmt, welche nach Marchessault und Liang (1960) zwischen O(3)H und O'(5) sowie zwischen O(6)H und O'(2) H (Blackwall et al., 1977) angeordnet sind.

Neben den intramolekularen Wasserstoffbrücken wird die Anordnung der Celluloseketten durch intermolekulare Wasserstoffbrücken bestimmt. Vergleichbares gilt auch für das Chitosan, das analog zur Cellulosestruktur aufgebaut ist.

Die Anordnung der Wasserstoffbrücken in den Cellulosemodifikationen Cellulose I und II ist in Abbildung 83 dargestellt. Als wichtigste Wasserstoffbrücke für die Netzwerkbildung und damit auch für das chemische Verhalten der Cellulose muss die intermolekulare Brücke aufgefasst werden [126].

Auch in Polyamidfasern wie Nylon, Perlon und Kevlar tragen Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilität der Materialien bei.

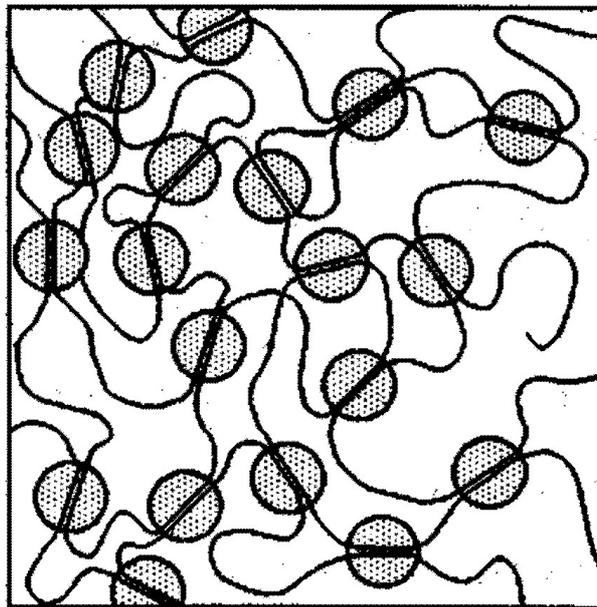


So genannte Verhakungsnetzwerke sind rein mechanisch miteinander verbunden. Beispiele sind die Makromoleküle in einer Polymerschmelze, die oberhalb einer kritischen Molmasse, der sogenannten Entanglement-Molmasse, miteinander verschlungen und verworren sind. Bei verarbeitungsbedingten Deformationen können sie daher nicht vollständig voneinander abgleiten. Sichtbar wird dies beim Spritz- oder Spinnprozess: In den engen Düsen können sie aufgrund von Verhakung ihre bevorzugte Konformation des undeformierten Knäuels nicht erreichen. Sie stehen unter Spannung und nehmen beim Verlassen der Düse sofort eine

[126] Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W., Comprehensive Cellulose Chemistry, Wiley-VCH Weinheim, Vol.2, (1998)

thermodynamisch günstigere Form ein. Dadurch weitet sich der Schmelzstrang direkt hinter der Düse auf. Das Phänomen ist in der Technik unter Namen wie Barus- oder Memoryeffekt (bei Schmelzen), Strangaufweitung (beim Extrudieren) oder Schwellverhalten (beim Hohlkörperblasen) bekannt.

Bei den hier verwendeten Chitosan und Cellulose Netzwerken bilden sich demnach neben Verhakungen der Polymere auch Bereiche aus, in denen Wasserstoffbrückenbindungen weitere Verknüpfungspunkte zu dem Netzwerk beitragen. Es entsteht so ein Netzwerk, das teilweise steife Kettensegmente aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen aufweist (Abbildung 84).



*Abbildung 84: Nebervalenzartig aufgebautes Netzwerk. In den grau unterlegten Bereichen bilden sich Netzwerkpunkte durch z.B. Wasserstoffbrückenbindungen aus.*

### **kovalente Netzwerke**

Wachsen lineare Polymere an Orten mit reaktiven funktionellen Gruppen innerhalb der Kette weiter, so kommt es zunächst zur Verzweigung. Dies gilt auch noch im Anfangsstadium, wenn Bindungen zwischen zwei verschiedenen Polymerelementen geknüpft werden. Erst wenn genügend Bindungen zwischen den einzelnen Ketten entstanden sind, bildet sich ein Netzwerk. Man erkennt das daran, dass gelöste Polymere plötzlich unlöslich werden. Der Punkt, an dem in einer Polymerlösung erstmals das Auftreten unlöslicher Gelpartikel beobachtet werden kann, wird als Gelpunkt bezeichnet. Die Gelbildung läuft innerhalb weniger Sekunden bis Minuten ab. Die Vernetzung ist an diesem Punkt noch nicht vollständig; erst im weiteren Verlauf bildet sich das "Riesenmolekül", das alle

Primärpolymermoleküle umfasst (Abbildung 85).

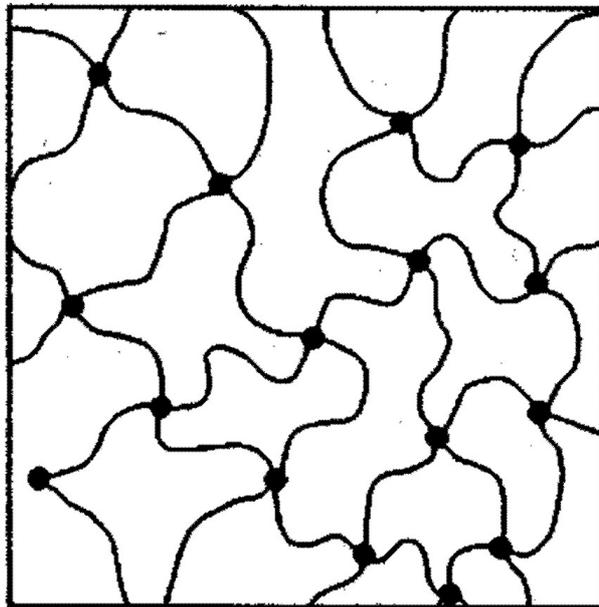


Abbildung 85: Hauptvalenzartig aufgebaute Netzwerke

Zunächst sind alle Moleküle nur mit jeweils einer weiteren Polymerkette verknüpft. Ein Netzwerk entsteht erst, wenn die einzelnen Stränge an mehreren Stellen miteinander verbunden sind. Dies kann durch Erhöhung der Anzahl der Verknüpfungspunkte durch z.B. weitere Vernetzerzugabe oder durch Erhöhung des Polymerisationsgrades der linearen Ketten geschehen.

Bei den in dieser Arbeit hergestellten kovalenten Chitosan-Netzwerken wurde in homogener Lösung, mit Hilfe von Dialdehyden, ein kovalentes Netzwerk erzeugt. Durch thermische Aktivierung entsteht innerhalb weniger Minuten ein vernetztes Hydrogel bei dem die Verknüpfungspunkte hauptsächlich auf einer Imid-Bindung zwischen den Chitosanketten beruht. Des weiteren besteht die Möglichkeit, Chitosanmembranen heterogen mit Epichlorhydrin kovalent zu vernetzen. Diese kovalent vernetzten Chitosanmembranen weisen neben den physikalischen Verknüpfungspunkten nun weitere Verknüpfungspunkte auf, die die Netzpunktdichte zusätzlich erhöhen. Hierdurch ist die Chitosanmembran unlöslich in Lösungsmitteln wie z.B. Essigsäure und des weiteren wird durch die kompakte Netzwerkstruktur das Permeationsvermögen herabgesetzt.

## 5 Synthese und Charakterisierung von hydrophilen Membranen

### 5.1 Bakteriencellulose

Cellulose ist eines der meistverbreitetsten Polymere der Welt. Die molekulare und supramolekulare Struktur dieses Makromoleküls ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen. Die pflanzliche Cellulose, die Hauptquelle dieses nachwachsenden Rohstoffes, wird von einer Vielzahl von Makromolekülen begleitet, wie z.B. Ligninen, Hemicellulosen, Proteinen und anderen Verbindungen biogenen Ursprungs, so dass eine Reindarstellung und Präparation für biologische Anwendungen aufwendig ist.

#### **Eine Alternative ist Bakteriencellulose:**

Hierbei wird aus dem wasserlöslichen nicht toxischen Monosacharid  $\alpha$ -D-Glucose mit nicht pathogenen Mikroorganismen (*Acetobacter xylinum*) hochreine Cellulose innerhalb einiger Tage hergestellt. Als extrazelluläres, von Mikroorganismen gebildetes Stoffwechselprodukt, ist die Bakteriencellulose in ihren Eigenschaften mit Cellulose pflanzlichen Ursprungs vergleichbar. Die Reinheit ist jedoch bedeutend höher, da keine Fremdpolymere oder andere Einschlüsse wie z.B. Lignin, Pectin und Hemicellulose enthalten sind. Ihre übermolekulare Struktur verleiht der Bakteriencellulose einen sehr hydrophilen Charakter, eine hohe Absorptionsfähigkeit, eine Ultra-feine Netzwerkstruktur und eine gute mechanische Festigkeit im feuchten Zustand [127][128][129][130].

Unter den cellulosebildenden Mikroorganismen ist die gram-negative aerobe Species *Acetobacter xylinum* von besonderer Bedeutung. Diese wurde bereits 1886 von Brown beschrieben [131][132]. Hierbei erkannte er, dass es sich bei einer gallertartigen Masse, die

---

[127] Jonas R., Farah L.F., Produktion and application of microbial cellulose, Polym. Degrad. Stab., Vol.59, (1998), S. 101-106

[128] RossP., MayerR., Benziman M., Cellulose biosynthesis and function in bacteria, Microbiol. Rev., Vol. 55, (1991), S. 35-58

[129] Cannon R.E., Anderson S.M., Biogenesis of bacterial cellulose, Crit. Rev. Microbiol., Vol. 17, (6), (1991), S. 435-447

[130] Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura N. et. al., The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, J. Mater Sci., Vol. 24, (1989), S. 3141-3145

[131] Brown A.J., On an acetic ferment which forms cellulose, J. Chem. Soc., Vol. 49, (1886), S. 172-186

[132] Brown A.J., The chemical action of pure cultivation of bacterium aceti., J. Chem. Soc. Vol. 49, (1886), S. 432-439

sich während einer Essigsäure-Fermentation an der Oberfläche bildete um Cellulose handelte. Aufgrund dieser Eigenschaften besteht ein großes Interesse an speziellen Anwendungen in verschiedenen Wirtschaftszweigen, z.B. in der Nahrungsmittelindustrie (als Überzug, Bindemittel, Dickungsmittel oder Suspensionsvermittler), in der Elektronik (als Lautsprechermembran (Sony)) und als Papierzusatz und Zusatz in Textilfasern. Vor allem in der Medizin eröffnen sich z.B. in Produkten zur Wundversorgung als zeitweiliger Hautersatz, als Verbandsmaterial für Brand- und andere Verletzungen [133], in chirurgischen Materialien, als Behandlungskissen, als Gewebe- und Organumhüllung, als Ersatz für innere Hohlgane [134], als Membranen verschiedener Permeabilität oder als Übungsmaterial für das mikrochirurgische Training, neue und interessante Applikationsfelder.

Durch geeignete Wahl der Bakterienstämme der Gattung *Acetobacter xylinum* kann an der Grenzfläche zwischen dem Luftsauerstoff und einem statischen, aeroben Nährmedium eine Bakteriencellulosemembran direkt erzeugt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bakteriencellulose-Bildung fünf grundlegende enzymatische Schritte beinhaltet [135][136][137] (siehe Abbildung 86).

---

[133] Fontana J.D. et. al, *Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute*, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 24/25, (1990), S. 253-263.

[134] Klemm D., Schumann D., Uhardt U., Marsch S., *Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery*, progress in Polymer Science, Vol. 26, Issue 9, (2001), S. 1561-1603.

[135] Jonas R., Farah L.F., *Produktion and application of microbial cellulose*, Polym. Degrad. Stab. (1998), Vol. 59, S. 101-106

[136] De Wulf P., Joris K., Vandamme E.J., *Improved cellulose formation by *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconase synthesis*, J. Chem. Technol. Biotechnol, (1996), Vol. 67, S. 376-380

[137] Samon S., Hudson S.M., *Crystal morphology, biosynthesis, and physical assembly of cellulose, chitin and chitosan*, JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys., (1997), Vol. C37, Issue 2, S. 199-279

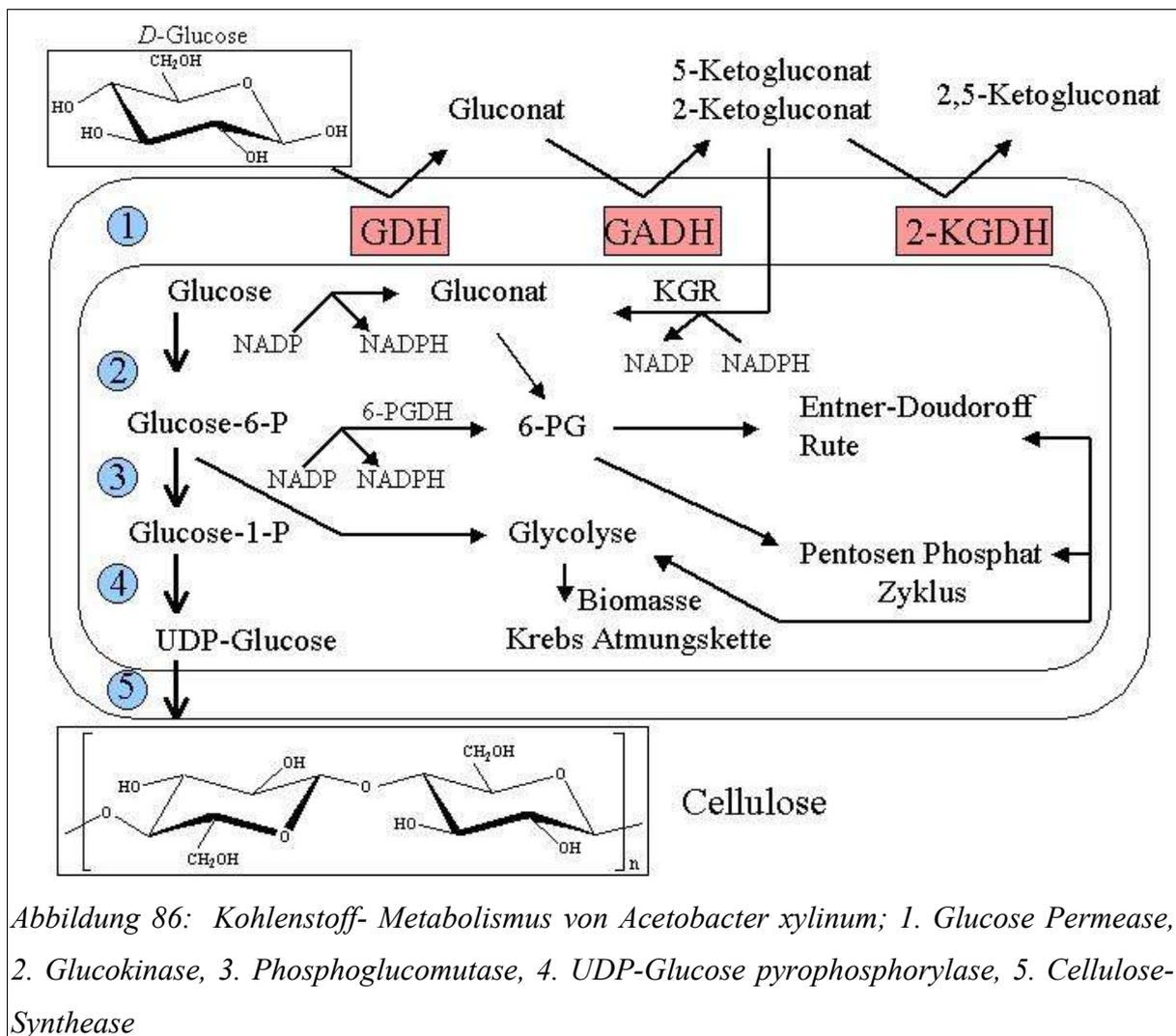


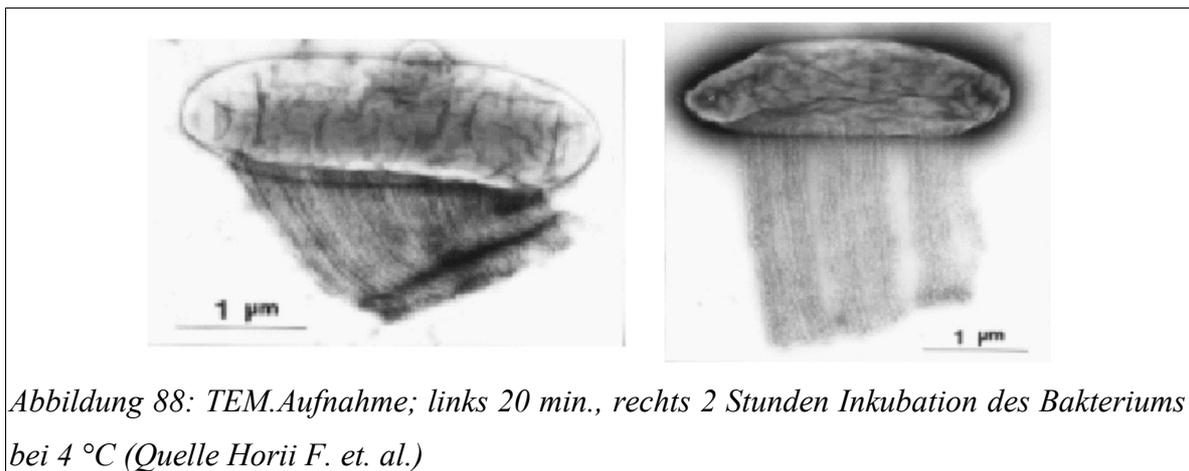
Abbildung 86: Kohlenstoff- Metabolismus von *Acetobacter xylinum*; 1. Glucose Permease, 2. Glucokinase, 3. Phosphoglucomutase, 4. UDP-Glucose pyrophosphorylase, 5. Cellulose-Synthase

Die Transformation von *D*-Glucose zu UDP-Glucose (1,4- $\beta$ -*D*-Glycosyltransferase) via Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat führt zur Addition von UDP-Glucose an das Ende der wachsenden Polymerkette mit Hilfe von Cellulose-Synthase. Die Cellulose-Synthase wird als essenzielles Enzym für den Syntheseprozess benötigt. Es ist in einen komplizierten Regulationsmechanismus eingebunden, der die Aktivierung und Inaktivierung des Enzyms steuert [138].

*Acetobacter xylinum* produziert die Cellulose zwischen äußerer und Cytoplasma-Membran. Im ersten Schritt der Celluloseproduktion bilden sich 6-8 Monomereinheiten große Glucan Ketten, die aus Poren an der Oberfläche von *Acetobacter xylinum* austreten. Diese subelementären Fäden vereinigen sich in einem zweiten Schritt zu Mikrofibrillen, die sich wiederum zu einem einzelnen verflochtenem Band vereinigen (siehe Abbildung 87).



Aus dem kristallographischen Blickwinkel betrachtet, handelt es sich bei dem sich bildenden verflochtenem Celluloseband, das eine Länge zwischen 40-60 µm und eine rechtshändige Verdrillung mit einer Periodizität von 0.6–1 µm aufweist, um Cellulose des Typs I. Nach einer Inkubation der Mikroorganismen bei 4 °C für 20 min. bzw. 2 Stunden bildet *Acetobacter xylinum* kammartige Cellulosefäden (siehe Abbildung 88).



Es sind deutlich die einzeln austretenden subelementaren Mikrofibrillen aus dem Bakterium zu erkennen. Es bildet sich hierbei eine kammartige Struktur. Hierbei nimmt die linke Form eine Übergangsstruktur von der verflochtenen bandartigen Struktur (Abbildung 87) zu der rechten hochgradigen kammartigen Struktur an. Diese Cellulose kristallisiert als Typ II. Es zeigt sich, dass die Bewegung der Mikroorganismen bei normalen Kultivierungsbedingungen (28 °C) die einzeln austretenden Cellulosefäden zu einem einzelnen verflochtenen Celluloseband zusammenfügen, das in der Typ I - Modifikation kristallisiert [139].

Diese miteinander verwobenen Bänder bilden die Bakteriencellulosemembran. Dieser Synthesemechanismus hilft den aeroben Bakterien sich in der sauerstoffreichen

[139] Hirai A., Horii F., Cellulose Assemblies by *Acetobacter Xylinum*, ICR Annual Report, Vol. 6, (1999), S. 28-29

Oberflächenschicht aufzuhalten. Des weiteren schützt das Cellulosenetzwerk die Mikroorganismen vor ultraviolettem Licht. Insbesondere bei der Besiedelung von Obst oder Früchten wird durch die Cellulose ein Wasserreservat aufgebaut, das vor dem Austrocknen schützt. Iguchi et al. postulierte, dass die Bakterien einen „Käfig“ konstruieren, in den sie sich selbst einsperren, um sich vor Fraßfeinden und Schwermetallen zu schützen, wobei die Versorgung mit Nährstoffen durch Diffusion gesichert ist [140].

Diese Form der Cellulose konnte in der Wundheilung bereits mit Erfolg eingesetzt werden.



Bakteriencelluloseflächen wurden im Bereich der Großtierklinik des Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. eingesetzt. Die gereinigte und sterilisierte Cellulose wurde im feuchten Zustand auf Wunden bei Pferden aufgelegt und mit einem Verband stabilisiert (siehe Abbildung 89). Die Verwendung von Bakteriencellulose als Wundauflage gewährleistete dabei eine gute Wundheilung mit geringer Hypergranulation [141].

*Abbildung 89:*

Des weiteren wurden getrocknete Bakteriencellulosefolien an Humanpatienten für verschiedene Traumatisierungen der Dermis wie z.B. Verbrennungen 2. Grades, Ulkus Cruris, Gesichts-Peeling, Nähte, und Versorgung von Wunden nach Karzinomentfernung - um nur einige zu nennen - eingesetzt [142][143][144][145][146].

[140] Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A., Bacterial cellulose – a masterpiece of nature’s arts. J. Mater Sci., Vol. 35, (2000), S. 261-270

[141] Schmauder H-P., Frankenfeld K., Lindner B., Hornung M., Ludwig M., Mülverstedt A., Bakteriencellulose – ein interessantes Biomaterial, Bioforum, Vol. 23, (7/8), (2000) S. 484-486

[142] Pitanguy I., Brentano J.M.S., Bos H., Salgado F. Mazzarone F., Rev. Bras. Cir., Vol. 78, (1), (1988). S. 67-78

[143] Castro O.C., Ribeiro Filho A.S., Nogueira V.M., HFA-Publ. Tech. Cient. (Brasilia), Vol. 3, (3), (1988), S. 209-232

[144] Pires M.C., Reis V.M.S., Gatti T.R., Pegas J.R.P., Guerra J.M.M., Sapiere A., VI World Congress of Dermatology, Rio de Janero, Rev. Bras. Dermatology (1989)

[145] Gattaz Sobrinho A., Rev. Bras. Cir., Vol. 79, Issue 1, (1989), S. 45-51

[146] Mayall R.C., Mayall A.C.D.G., Rocha H.C., XIX World Congress of the International Society for Cardiovascular Surgery, Toronto, Rev. Bras. Angiol., (1989)

Es konnte so bei insgesamt über 300 Anwendungen folgendes festgestellt werden:

- schnelle Schmerzreduktion,
- beschleunigte Wundheilung,
- gute Adhäsion an das Wundbett,
- abnehmendes postoperatives Unbehagen,
- die Auflage stellt eine effiziente Barriere gegen pathogene Mikroorganismen dar,
- eine Wundinspektion gestaltet sich aufgrund der Transparenz einfach,
- schnellere Wundheilung. Hiermit verbunden Zeit- und Kostenreduktion,
- feuchtes Wundmilieu aufgrund verbessertem wundexudat Rückhaltevermögens,
- sehr gute Wundheilungseigenschaften bei Spalthautentnahmewunden und Brandwunden.

Wegen der geringen Elastizität der Bakteriencellulose ist eine Anwendung in Bereichen mit hoher Beweglichkeit nicht ratsam.

Aufgrund der sehr guten Eigenschaften - insbesondere bei der Versorgung von Probelmwunden - gibt es seit Ende 2004 ein amerikanisches Unternehmen (Xcell) das Bakteriencellulose für den Einsatz in der Wundheilung herstellt. Diese Wundauflagen werden im feuchten Zustand verwendet. So liegen auch neuere klinische Untersuchungen für eine „niemals getrocknete“ Bakteriencellulose vor die insbesondere bei der Versorgung chronischer Wunden sehr gute Resultate zeigt [147].

Da somit keine kommerzielle Quelle für Bakteriencellulose Membranen zur Verfügung stand wurden diese im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von *Acetobacter xylinum* auf mikrobiologischem Wege hergestellt.

### 5.1.1 Herstellung

Bakteriencellulose wird unter aeroben Bedingungen mit Hilfe des Bakteriums *Acetobacter xylinum* gewonnen. Hierzu wird eine Nährlösung eingesetzt, die als Kohlenstoffquelle  $\alpha$ -D-Glucose und als Stickstoffquelle eine Mischung aus Pepton und Hefe-Extrakt enthält.

---

[147] Effectiveness of a Biocellulose Wound Dressing for the Treatment of Chronic Venous Leg Ulcers: Results of a Single Center Randomized Study Involving 24 Patients, Alvarez O., et.al., Wounds, Vol. 16, No.7, July 2004, S. 23

Außerdem wird wegen Freisetzung von Gluconsäure und 5-Keto-gluconsäure in den ersten Tagen der mikrobiologischen Erzeugung der Cellulose durch die Bakterien ein Zitronensäure-Phosphat Puffer zu der Nährlösung hinzugegeben. Diese Nährlösung bestehend aus:

(w/w %) 2 %  $\alpha$ -D-Glucose, 0,5 % Hefe Extrakt, 0,5 % Pepton, 0,27 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,115 % Zitronensäure (wasserfrei), (pH = 6),

wird nach den Entdeckern des Nährmediums und der ersten zielgerichteten Erzeugung von Bakteriencellulose Hestrin-Schramm-Medium genannt [148] . Vielfältige Untersuchungen hinsichtlich der eingesetzten Stickstoffquelle des Nährmediums (Pepton- und Hefe-Extrakt) haben gezeigt, dass ein Austausch der Stickstoffquelle durch z.B. kostengünstigere Ammonium- oder Nitratsalze oder andere Stickstoffquellen wie z.B. Fleischextrakt das Bakterienwachstum hemmt [149] . Es kommt hierdurch zu keiner oder einer geringeren Erzeugung von Bakteriencellulose. Es können jedoch weitere Zusätze zu dem Nährmedium wie z.B. Ethanol oder Koffein die Cellulosebildung stark erhöhen [150] . Eine Modifizierung der Kohlenstoffquelle ( $\alpha$ -D-Glucose) durch regiospezifische Derivate der Glucose an der 2,3 und 6 Position ist möglich. Hierbei wird direkt mikrobiologisch das entsprechende Cellulosederivat erzeugt [151] . Eine Derivatisierung an der 1 oder 4 Position der Glucose verhindert das Zellwachstum, da die für die Bildung der Cellulose wichtigen Positionen nicht zur Verfügung stehen [152] .

Durch geeignete Wahl der Bakterienstämme der Gattung *Acetobacter xylinum* kann an der Grenzfläche zwischen dem Luftsauerstoff und dem Nährmedium eine Bakteriencellulose Membran direkt erzeugt werden.

---

[148] Hestrin S., Schramm M., Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, Biochem J., Vol. 58, (1954), S. 345-352

[149] Son H.J., Heo M.S., Lee S.J., Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures, Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 33, (2000) S. 1-5

[150] Fontana J.D. et al., Nature of Plant Stimulators in the Produktion of *Acetobacter xylinum* („Tea Fungus“) Biofilm Used in Skin Therapy, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol 28/29, (1991), S. 341-351

[151] Schmauder H.P., Einfeld L., Geyer U., Klemm D., Biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* using of Glucose and modified carbon-source, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., Vol 57, Issue 4a, (1992), S. 1797-1800

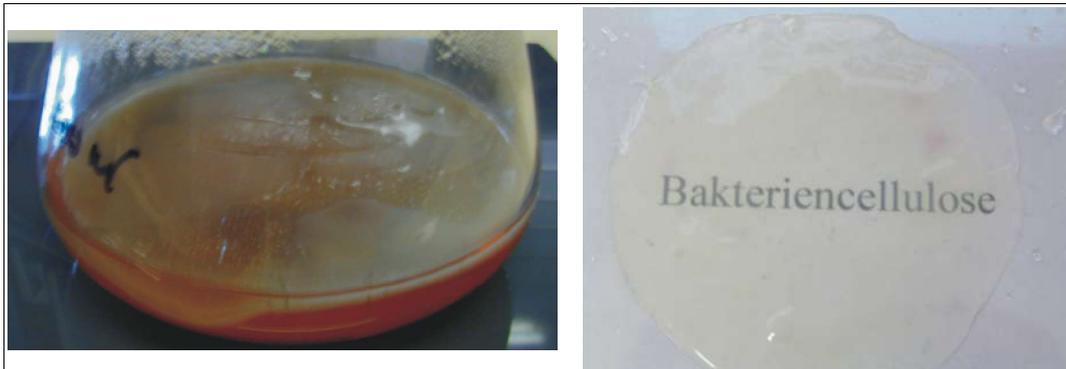
[152] Geyer U., Klemm D., Schmauder H-P., Kinetics of the Utilization of Different C Sources and the cellulose Formation by *Acetobacter xylinum*, Acta Biotechnol. Vol. 14, Issue 3, (1994), S. 261-266

Es wurden gefriergetrocknete Bakterien der Spezies *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 und ATCC 23769 verwendet. Um diese Mikroorganismen, die bereits seit 1992 auf diese Weise konserviert worden waren, auf Ihre Aktivität zu überprüfen wird ca. 20 mg der gefriergetrockneten Bakterien in 3 ml Hestrin-Schramm Medium suspendiert. Anschließend werden 100 µl dieser Suspension auf einen Nährboden gegeben, der zuvor aus Agar und dem Hestrin-Schramm-Medium bereitet wurde, und die Suspension mit Hilfe eines Glasstabes ausgestrichen. Zur Überprüfung wurde der sogenannte drei Ösensausstrich durchgeführt um eine Verdünnung der Bakteriensuspension auf dem Nährboden zu erreichen. Nach einer Kultivierungszeit von 2 bis 6 Tagen bei 30 °C unter aeroben Bedingungen sind weiße einzeln zu lokalisierende Bakterienkulturen zu erkennen. Es wurde keinerlei Fremdverkeimung festgestellt (siehe Abbildung 90).



Abbildung 90: von links nach rechts: Zustand der *Acetobacter xylinum* Kolonien des Typs ATCC 10245 nach 2 Tagen, 6 Tagen, 6 Tagen (Draufsicht).

Für die eigentliche Herstellung der Bakteriencellulose wurde in einem 250 ml Erlenmeyerkolben ca. 60 ml Hestrin-Schramm-Medium gegeben. In diese Lösung wurden direkt die Bakterienkulturen des Nährbodens mit Hilfe eines Glasstabes gegeben oder alternativ 1 ml einer Suspension aus den gefriergetrockneten Bakterien und dem Hestrin-Schramm Medium der Lösung zugefügt. Nach einer Kultivierungszeit von ca. 7 Tagen ist im ausreichenden Maße Cellulose entstanden. Bei Verwendung von *Acetobacter xylinum* ATCC 23769 entsteht Bakteriencellulose in Form nicht zusammenhängender Flocken. Bei Verwendung von *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 entsteht an der Grenzfläche zwischen dem Nährmedium und dem Luftsauerstoff eine zusammenhängende ca. 5-10 mm dicke Schicht aus Bakteriencellulose. Der Trockengehalt dieser erzeugten Membran (60 ml einer 2 % Glucose-Nährlösung) weist nur ein Gewicht von ca. 90 mg auf. Dies entspricht einer Produktionsrate von nur 7,5 % für die Cellulose, der restliche Teil der Glucose wird anderweitig Verstoffwechselt.



*Abbildung 91: Bakteriencellulose- Membranen: links Nährlösung nach 7. Tagen bei 30 °C, rechts Zustand der Membran nach dem Reinigen.*

Die Bakteriencellulose wurde nun entnommen. Mit saugfähigen Tüchern oder durch Pressen wurde der größte Teil der Nährlösung, die in der Bakteriencellulose enthalten ist, entfernt. Anschließend wurde die Membran in eine ca. 0,1-1 mol/l NaOH Lösung gegeben um die restliche Nährlösung auszuwaschen. Durch die Verwendung einer verd. Natronlauge kommt es zu einer Quellung des Netzwerkes. Hierdurch lässt sich die Bakteriencellulose effektiver von der Nährlösung und den Bakterien befreien. Die Qualität des Waschprozesses kann über eine Stickstoffuntersuchung (Elementaranalyse) der Bakteriencellulose kontrolliert werden, da nur die Bakterien und die Nährlösung Stickstoff enthält.

Bei der Bakteriencellulose handelt es sich um hochkristalline Cellulose die in einem hochgequollenen Zustand vorliegt. Durch die spezielle Morphologie der mikrobiologisch erzeugten Cellulose weist diese einen extremen Wassergehalt von ca. 98 % auf. Beim Trocknen der Membran auf z.B. einem Teflonträger bildete sich ein ca. 20 µm dicker milchiger trüber Film aus. Durch den Trocknungsprozess wird die spezielle Morphologie der Membran zerstört, ein erneuter Rückquellversuch zeigte ein geringes Wasseraufnahmevermögen.

#### **Konservierung der verwendeten Bakterien:**

Um *Acetobacter xylinum* über einen langen Zeitraum zu konservieren bietet sich insbesondere die Gefriertrocknung der Bakterienkulturen an. Dieses Verfahren wurde schon 1954 von Hestrin und Schramm [148] benutzt und wird bis heute bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) angewendet.

Für die Isolierung der Bakterien aus der Cellulosematrix wird ein Zitronensäure-Phosphat-

Puffer (0,01 mol/l, pH = 6) verwendet. In allen Phasen der Reinigung sollte die Temperatur <6 °C gehalten werden, um eine höhere Aktivität der Bakterien zu gewährleisten. Die Bakteriencellulose wurde ca. 1 min in einem Mixer mit der 5 fachen Menge der Pufferlösung zerkleinert. Diese Suspension wird durch vier Lagen eines Seihtuchs filtriert. Das Filtrat wurde anschließend zentrifugiert. Der entstandene Niederschlag kann mit Glasperlen erneut dispergiert werden und erneut mit ca. 5 ml des Puffersystems gewaschen werden. Diese Suspension wird erneut durch mehrere Lagen eines Seihtuchs filtriert. Nach anschließender Zentrifugation wird der Niederschlag mit 1-2 ml des Puffersystems versetzt eingefroren und gefriergetrocknet. Die erhaltenen gefriergetrockneten Bakterien enthalten ca.  $10^9$  aktive Zellen pro mg der Trockenmasse. Im evakuierten, verschlossenen Zustand zeigen die so präparierten Zellen auch noch nach einer Lagerungszeit von >10 Jahren eine ausreichende Aktivität. Ein Beweis hierfür ist, dass die verwendete *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 Probe die auf diese Weise seit 1992 konserviert wurde noch eine ausreichende Aktivität zeigte.

### 5.1.2 Herstellung von dien- und dienophil-modifizierter Bakteriencellulose

Bakteriencellulose kann nicht unter Erhalt der Membranstruktur in einem nachgeschalteten heterogenen Verfahren mit z.B. Furanderivaten (Dien) modifiziert werden. Um eine Umsetzung der hochmolekularen und hochkristallinen Bakteriencellulose zu ermöglichen, ist es unerlässlich, die Bakteriencellulose zuvor mit Hilfe einer 20-40 % Natronlauge zur aktivierten Alkalicellulose umzusetzen. Bei diesem Prozess wird durch ein Herabsetzen der Wasserstoffbrückenbindungen eine amorphe, quellfähige Cellulose erzeugt, die erst eine nachträgliche Umsetzung (z.B. Veresterung) gestattet. Hierdurch verändert sich jedoch die Netzwerkstruktur der Bakteriencellulose maßgeblich d.h., die Membran ist einem sehr starken Schrumpfungsprozess ausgesetzt. Hierdurch entsteht sehr kompakte, harte und unflexible Bakteriencellulose, die sich durch diese morphologischen Veränderungen nicht mehr als Membran eignet.

Es bietet sich jedoch eine Alternative zur Herstellung von dien oder dienophil modifizierten Membranen an. Aus der Literatur ist bekannt, dass *Acetobacter xylinum* auch Derivate der Glucose verstoffwechseln kann. So besteht die Möglichkeit dien- oder dienophil- Derivate der Glucose herzustellen, und diese ganz oder teilweise in das Nährmedium als Kohlenstoffquelle zu geben. Zur Erzeugung von Bakteriencellulose, die mit Dienen oder Dienophilen

modifiziert ist, wurde Glucose in einem mehrstufigen Verfahren regiospezifisch an der 3-Position mit Furan-2-carbonsäurechlorid als Dien oder mit Acrylsäure als Dienophil substituiert. Durch regiospezifische Substitution bleiben die C1- und C4-Position, die für eine Verknüpfung mit der Cellulose notwendig sind, unbeeinflusst.

Die zu synthetisierenden Glucosederivate sollen als Kohlenstoffquelle für *Acetobacter xylinum* dienen. Das Bakterium gewinnt seine Energie durch  $\beta$ -1,4-Verknüpfung von Glucose zu Cellulose. Es muss demzufolge eine regioselektive Substitution des Glucosemoleküls erfolgen, da die C1- und C4-Positionen nicht substituiert werden dürfen, weil hierdurch die Verknüpfung zur Cellulose verhindert wird.

Es können aus mikrobiologischer Sicht die 2, 3 und 6-Positionen der Glucose mit Dienen oder Dienophilen modifiziert werden. Diese Form von Synthesen kann nur über Schutzgruppenchemie erfolgen. Es wurde wegen der leichten und kostengünstigen Verfügbarkeit der Ausgangsverbindungen und der kürzesten Syntheseroute die 3-Position der Glucose mit Dienen oder Dienophilen substituiert. Die Herstellung dieser modifizierten Glucose wird im nachfolgenden genau beschrieben.

### 5.1.2.1 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose

Es wird von 1,2,5,6-Di-O-isopropyliden-D-Glucose ausgegangen und in einer zweistufigen Reaktion über das Zwischenprodukt 1,2,5,6-Di-O-isopropyliden-3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose das Endprodukt 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose erzeugt. Es handelt sich bei dem Endprodukt um eine Verbindung, die bislang nicht in der Literatur beschrieben ist.

Analoge Umsetzungen mit z.B. Benzylchlorid an der 3-Position des geschützten Zuckers sind schon seit längerem in der Literatur beschrieben. So konnten die dort verwendeten Durchführungen für diese Synthese teilweise übertragen werden [153] [154] [155] [156].

---

[153] Gent P.A., Gigg R., Synthesis of Benzyl and Allyl Ethers of D-Glucopyranose, Carbohydrate Research, Vol. 49, (1976), S. 325-333

[154] Meyer W., Schulz N., Kreimeier R., Synthese, Strukturaufklärung trans-verknüpfter 3,6-Anhydro-1,2-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-hexofuranosen, Liebigs Ann. Chem., (1994), S. 337-346

[155] Limousin C., Cléophas J., Loupy A., Petit A., Synthesis of Benzoyl and Dodecanol derivatives from Protected Carbohydrates under Focused Microwave Irradiation, Tetrahedron, Vol. 54, (1998), S. 1367-1378

[156] Gramera R.E., Bruce R.M., Hirase S., Whister R.L., Synthesis of 5-Amino-5-desoxy Derivates of L-Idose, Notes, (May, 1963), S. 1401-1403

### 5.1.2.2 Herstellung von 1,2-5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(2-Furanat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose

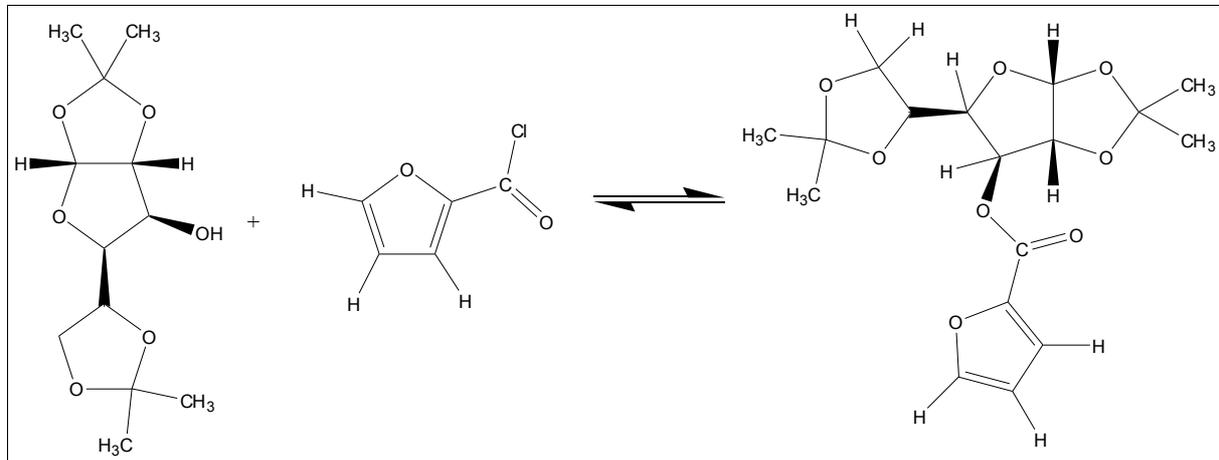


Abbildung 92: 1,2,5,6-Di-*O*-isopropyliden-*D*-glucose (links) wird mit 2-Furancarbonsäurechlorid zu 1,2-5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(2-Furanat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose (rechts) umgesetzt.

In einen 1 l Rundkolben werden 50,06 g (192 mmol) 1,2,5,6-Di-*O*-isopropyliden-*D*-glucose eingewogen und in 600 ml Pyridin bei Raumtemperatur gelöst. In diese Lösung wird unter leichter Kühlung 23 ml (233 mmol) Furan-2-carbonsäurechlorid langsam eingetropft. Bei zu starker Kühlung kann das Furan-2-carbonsäurechlorid an der Eintropfstelle ausfallen. Nach dem Eintropfen des Furan-2-carbonsäurechlorid in die Lösung wird die Kühlung entfernt und die Lösung wird ca. 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Es entstand eine rote Lösung die mit ca. 100 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt wird. Nach Abwarten der Kohlendioxydentwicklung wird die Lösung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers im Ölpumpenvakuum bis zur Bildung eines roten Sirups eingeengt.

Der so erhaltene Sirup wird in 300 ml Dichlormethan aufgenommen und einmal mit ca. 100 ml einer verdünnten Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend dreimal mit ca. 100 ml dem. Wasser ausgeschüttelt (pH-Neutralität).

Die wässrige Phase wird zweimal mit ca. 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die so erhaltene organische Phase wird anschließend zweimal mit dem. Wasser ausgeschüttelt.

Die vereinigten organischen Phasen werden mit ca. 5 g Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und anschließend mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 40 °C im Vakuum bis zur

Trockene eingeengt.

Der erhaltene rote Sirup wird in einen 2 L Rundkolben gegeben und mit ca. 1,4 l Heptan kurz bis zum Sieden erhitzt. Hierbei löst sich der größte Teil des Sirups im heißen Heptan. Die Lösung wird dekantiert um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Die Lösung wird möglichst langsam abgekühlt und gegebenenfalls werden beim Abkühlen noch einige Impfkristalle zu der Lösung hinzugefügt. Die Lösung wird für 2 Tage in den Kühlschrank bei 4 °C gegeben. Aus der Lösung sind weiße Kristalle ausgefallen. Anschließend wird zur Erhöhung des Temperaturgradienten - bei diesem Reinigungsverfahren - die Suspension über Nacht in einen Tiefkühlschrank bei -18 °C gegeben. Der entstandene Kristallbrei wird mit Hilfe eines Büchnertrichters von dem Lösungsmittel abgetrennt und anschließend am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Vakuum getrocknet.

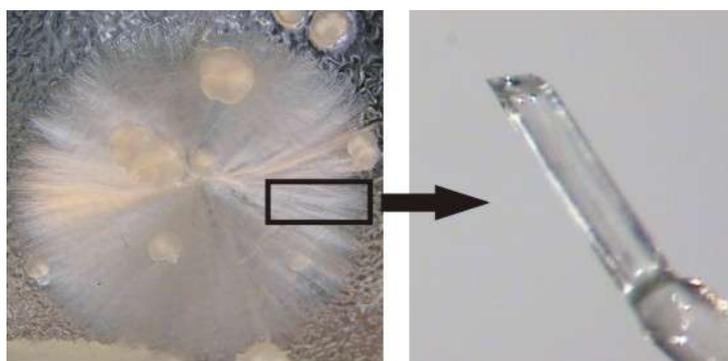
Es wurden 61,84 g (175 mmol) 1,2-5,6-Di-O-isopropyliden-3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose mit einer Reinheit von 99 % erhalten. Dies entspricht 90,8 % der theoretisch möglichen Masse.

### **Röntgenstrukturanalyse:**

Bei diesem noch nicht in der Literatur beschriebenen Produkt konnten zusätzlich Einkristalle erzeugt werden, mit denen es möglich war, eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen. Da bei dem oben beschriebenen Fällungsprozess die geringere Löslichkeit von 1,2-5,6-Di-O-isopropyliden-3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose in Heptan bei niedriger Temperatur ausgenutzt wurde, sollte eine langsame Absenkung der Temperatur nur wenige Kristallite bilden. Diese wenigen Kristallite können dann als Kristallisationskeime in der übersättigten Lösung fungieren, so dass sich wenige große Kristalle - im Idealfall sogar Einkristalle - ausbilden können. Hierzu wurden ca. 2 g des oben erhaltenen Produktes säulenchromatographisch mit 4 % Methanol in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als Laufmittel gereinigt. Anschließend wird das so gereinigte Produkt in einem 50 ml Rundkolben in ca. 30 ml warmen Heptan gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit Tüchern und Aluminiumfolie gut isoliert und in Ruhe ca. 6 Stunden langsam abgekühlt. Anschließend wurde der Rundkolben mit der so isolierten Flüssigkeit über Nacht in den Kühlschrank bzw. Tiefkühlschrank gestellt. Es sind rosettenförmige feine weiße kristalline Nadeln in der Lösung entstanden. Für die Röntgenstruktur-Untersuchungen ist es unbedingt erforderlich, dass die Kristalle direkt aus

der Lösung entnommen werden und nicht abgesaugt oder getrocknet werden, da sie hierdurch zerstört werden können.

Aus der Mutterlauge wurde mit Hilfe eines Polarisationsmikroskop die Kristallauswahl und die Kristallpräparation durchgeführt. Nach der Auswahl eines geeigneten Kristalls wurde dieser auf die Spitze einer dünn ausgezogenen Glaskapillare geheftet und in den Goniometerkopf eingespannt. Der Goniometerkopf wurde umgehend auf das Diffraktometer montiert (siehe Abbildung 93).



*Abbildung 93: Nadelförmige Kristalle in Büschelform (links), präparierter Einkristall für die Röntgenuntersuchung*

Durch einen Stickstoffstrom einer angeschlossenen Tieftemperaturanlage wurde der Kristall auf  $-120\text{ °C}$  gekühlt. Nach der Zentrierung des Kristalls im Röntgenstrahl wurde zunächst seine Streufähigkeit, mit  $\text{Mo-K}_\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 71.073\text{ nm}$ ) durch ein Diffraktometer mit Flächenzähler der Firma Bruker (SMART CCD), geprüft. Nach der Messung auf dem SMART CCD wurden die aufgenommenen Frames mit dem Programm SAINT [157] ausgelesen. Die Absorptionskorrektur erfolgte mit dem Programm SADABS [158].

Die Bestimmung der Raumgruppe, aufgrund von systematischen Auslöschungsbedingungen, wurde mit dem Programm XPREP [159] vorgenommen. Anschließend konnte das Phasenproblem mit Hilfe der direkten Methode durch das Programm SHELXS-97 [160] gelöst werden. Zur Strukturverfeinerung wurde das Programm SHELXL-97 [161] herangezogen. Alle Nichtwasserstoffatome wurden mit anisotropen Temperaturfaktoren verfeinert. Wasserstoffatome wurden in idealen Positionen berechnet (Reiter-Modell).

[157] Bruker Industrial Automation, SAINT 6.02 A, Program for data reduction, (2000)

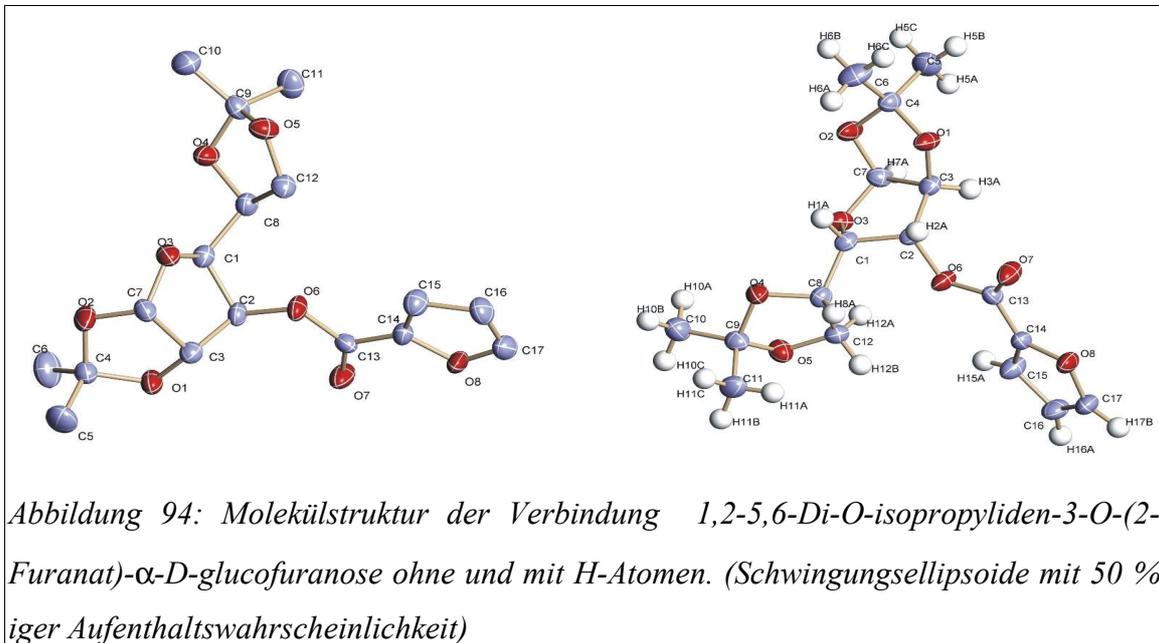
[158] SADABS, Program for area detector absorption corrections, Siemens Analytical X-Ray Instruments

[159] G. Sheldrick, SHELXTL-NT V 5.1, Bruker Crystallographic Research Systems, Bruker Analytical X-Ray Instr. Inc., Madison, Wisconsin, USA, (1997)

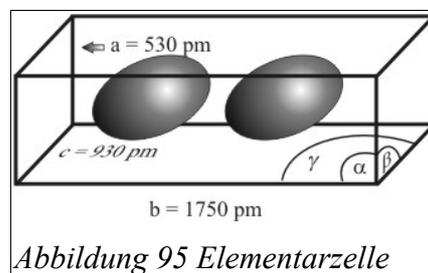
[160] G. Sheldrick, SHELXS-97, Program for Crystal Structure Refinement, Universität Göttingen, (1997)

[161] G. Sheldrick, SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, Universität Göttingen, (1997)

Strukturzeichnungen wurden mit dem Programm XSHELL [162] angefertigt.



In Abbildung 94 sind die Sauerstoffatome durch rote und Kohlenstoffatome durch blaue Schwingungsellipsoide symbolisiert. Die Wasserstoffatome werden durch weiße Kugeln dargestellt. Es wurden zwei unterschiedliche Perspektiven gewählt, um einen besseren räumlichen Eindruck zu erhalten. Hierbei kristallisiert 1,2-5,6-Di-O-isopropyliden-3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose monoklin in der Raumgruppe  $P2_1$  nach Hermann-Maugain. Die Seitenlängen der Elementarzelle, die sich aus zwei Molekülen (durch die zwei Elipsoiden symbolisiert) zusammensetzt, betragen für  $a = 530$  pm,  $b = 1750$  pm und  $c = 930$  pm (siehe Abbildung 95). Die Bindungswinkel betragen für  $\alpha$  und  $\gamma$   $90^\circ$  für  $\beta$  jedoch  $91.65^\circ$ .



Der an der 3 Position (C2 in der Abbildung) über einen Ester gebundene Furanring steht senkrecht zu der Ringebene der Glucofuranose. Die Isopropylidenschutzgruppe an der 1,2-Position (C7, C3 in der Zeichnung) ist im rechten Winkel zur Glucofuranose angeordnet,

wobei hierbei der Ringsauerstoff (O3) der Glucofuranose zur entgegengesetzten Seite aus der Ringebene herausragt. Die Isopropylidenschutzgruppe an der 5,6-Position (über C8 an die Glucofuranose gebunden) liegt - wie der Furanester - auf der gegenüberliegenden Seite der Ringebene der Glucofuranose im Bezug auf die 1,2 gebundene Isopropylidenschutzgruppe.

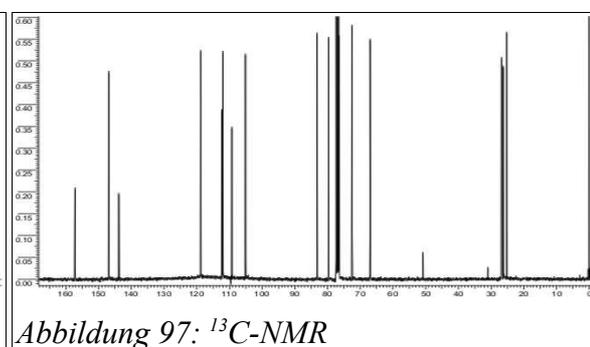
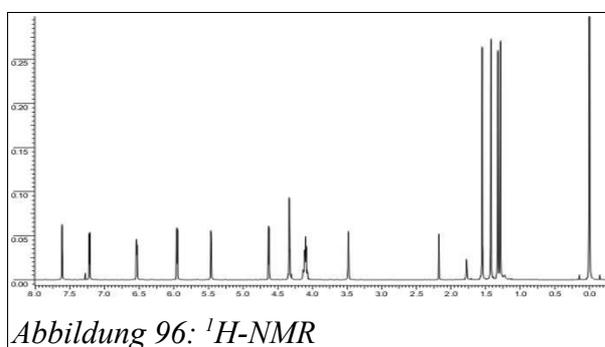
Durch die direkte Nachbarschaft der an C3 und C7 gebundene Isopropylidengruppe zu dem Acetal der Furanose werden für die Bindungsabstände der C-O Bindung ( $C3-O1 = 141,2 \pm 0,28$  pm und  $C7-O2 = 142,1 \pm 0,27$  pm) geringere Werte erhalten als für die Isopropylidengruppe, die an C1 gebunden ist ( $C8-O4 = 144,0 \pm 0,20$  pm und  $C12-O5 = 143,2 \pm 0,18$  pm). Der geringste Bindungsabstand in diesem Molekül liegt in der Carbonylgruppe vor, und weist einen typischen Wert von  $120,9 \pm 0,18$  pm für die O7-C13 Bindung auf. Die längsten Bindungen liegen für die C-C Bindungen in dem Molekül vor, und liegen z.B. für die C9 - C10 Bindung bei 151,6 pm. Der Bindungsabstand zwischen dem verbrückenden Sauerstoff des Ester (O6) weist durch Mesomerieeffekte einen deutlich verkürzten Bindungsabstand von  $135,2 \pm 0,22$  pm zum Carbonylkohlenstoffatom (C13) auf. Die Verbrückung zur Glucofuranose (C6-C2) weist zum Vergleich einen Bindungsabstand von  $145,2 \pm 0,26$  pm auf.

### Analytik:

Dünnschichtchromatographie: 95 % Dichlormethan : 5 % Methanol

Produkt: 0,78                      UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Edukt : 0,51                      UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Zur besseren Zuordnung der einzelnen Signale soll Abbildung 98 dienen.

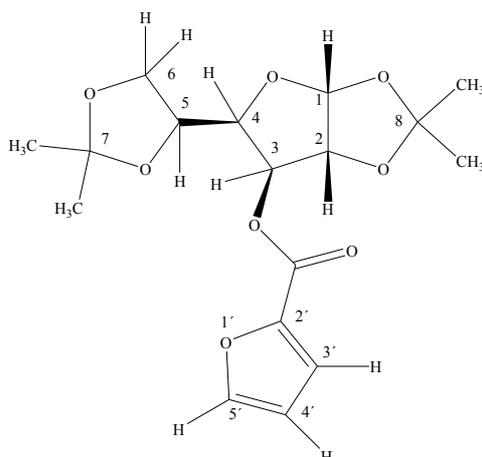


Abbildung 98: Strukturformel von 1,2-5,6-Di-O-isopropyliden-3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 4,10 (m, 2H, 6); 4,63 (d,  $J_{2,1} = 3,7\text{Hz}$ , 1H, 2); 5,46 (d,  $J_{3,4} = 1,8\text{ Hz}$ , 1H, 3); 5,95 (d,  $J_{1,2} = 3,6\text{ Hz}$ , 1H, 1); 6,53 (q,  $J = 1,8\text{ Hz}$ , 1H, 4'); 7,21 (d,  $J_{3',4'} = 3,3\text{ Hz}$ , 1H, 3'); 7,61 (d,  $J_{4',5'} = 1\text{Hz}$ , 1H, 5') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100,62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,00 (TMS), 25,14 ( $\text{CH}_3$ ); 26,17 ( $\text{CH}_3$ ); 26,77 ( $\text{CH}_3$ ); 26,84 ( $\text{CH}_3$ ); 67,10 (6); 75,10 (3); 76,50 (5); 83,26 (4); 85,08 (2) 105,26 (1); 109,65 (8) 112,32 (7); 127,4 (2'); 131,8 (3); 164,9 (Carbonyl) ppm.

### 5.1.2.3 Herstellung von 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose

Es sind in der Literatur viele Verfahren zur sauren Abspaltung von Diisopropylidenschutzgruppen bei ähnlichen Substanzen beschrieben, von denen sich für die hergestellte Verbindung nur wenige eignen [163] [164] [165] [166]. Entweder wird nur eine Isopropylidenschutzgruppe abgespalten oder es erfolgt im hohen Maß eine Esterspaltung, die

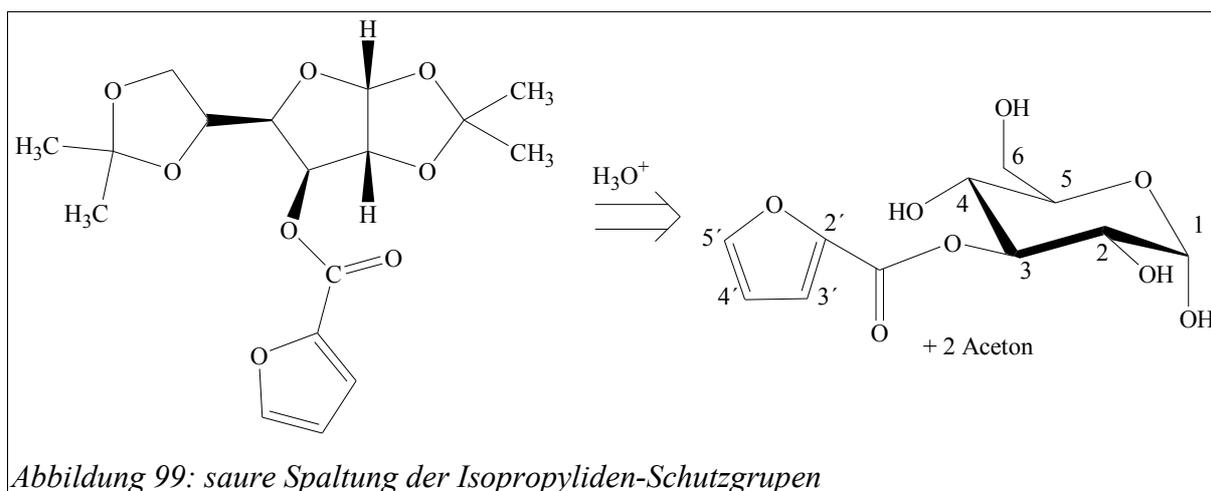
[163] David S., de Sennyey G., Synthèse des 1-(5-Désoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)cytosine et 1-(2,5-Didésoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine, et de leurs phosphates. Contribution À l'étude de la spécificité d'une pibonucléotide-réductase de mammifère, Carbohydrate Research. Vol 77, (1979), S. 79-97

[164] Haga M., Takano M., Tejima S., Diisopropylidene acetals of D-Allose and D-ribo-Hexulose (D-Psicose), Carbohydrated Res., Vol 14, (1970), S. 237-244

[165] Wadouachi A. et. al., Carbohydrated Res., Vol. 238, (1993), S. 327-334

[166] Somanathan R., Tappa H.D., Smith K.M., Synthesis of Buchananine a Novel Pyridine Alkaloid, J. Org. Chem., Vol. 45, (1980), S. 4999-5000

zur Abspaltung des Furans führt und so geringe Produktausbeuten erzeugt. So erfolgt z.B. bei der häufig verbreiteten Methode, Schutzgruppen in einer heißen salzsauren Lösung abzuspalten, auch im hohen Maße die Esterspaltung [167]. Nach umfassenden Voruntersuchungen konnte mit einer abgewandelten Durchführung von Lemieux [168] die Abspaltung der Schutzgruppen unter Erhalt der Diene oder Dienophile an der 3-Position erfolgen.



17 g (48 mmol) 1,2-5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(2-Furanat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose wurde in einen 500 ml Dreihalsrundkolben eingewogen und in ca. 200 ml Methanol gelöst. Diese Lösung wurde bis zum Sieden erhitzt und es wurden innerhalb von ca. 10 min. 100 ml einer 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde 30-90 Minuten unter leichtem Rückfluss gehalten. Es muss eine ständige Reaktionskontrolle z.B. mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden um die Reaktion unmittelbar nach Abspaltung der Schutzgruppen zu beenden.

Zur Aufarbeitung bzw. zum schnellen Beenden der Reaktion bieten sich zwei Methoden an: Die noch heiße Lösung wurde in 400 ml einer wässrigen Aufschlämmung mit 31,5 g Bariumhydroxyd-octahydrat gegeben und ca. eine halbe Stunden intensiv gerührt. Durch die schnelle Neutralisation der Säure kam auch die Esterspaltung schnell zum Erliegen. Es wurde

[167] Yamauchi N., Kakinuma K., Enzymatic carbocycle Formation im microbial Secondary Metabolism. The Mechanism of the 2-Deoxy-scyllo-inosose Synthase Reaktion as a Crucial Step in the 2-Desoxystreptamine Biosynthesis in Streptomyces Fradiae, J. Org. Chem. Vol. 60 (1995), S. 5614-5619

[168] Lemieux R.U., Bose R.J., Reactions of 2-Acetoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-(2,6-dichlorobenzoyl)-*D*-glucal, Tri-*O*-acetyl-3-desoxy- $\alpha$ -*D*-erythro-hex-3-enopyranosyl chloride, and related Compounds, Canadian Journal of Chemistry, Vol 44, (1966), S. 1855-1862

gegebenfalls noch Bariumhydroxyd zugegeben bis ein pH-Wert von 6-7 eingestellt wurde. Aufgrund des sehr feinen Bariumsulfates wurde die Lösung bei 10.000 U/min für 30 min. zentrifugiert (Filtrieren ist ungeeignet). Der klare Überstand wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C stark eingeeengt mit ein wenig dem. Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung eines Ionentauschers zum neutralisieren der Reaktionslösung dar. Hierbei muss unbedingt ein basischer Ionentauscher verwendet werden, der mit Hydroniumionen beladen ist. Herkömmliche Ionenaustauscher, die meist mit Natriumionen oder Chloridionen beladen sind, würden zur Bildung von wasserlöslichen Salzen führen, die nur sehr schwer aufgrund der hohen Polarität des Produktes abzutrennen sind.

Die noch heiße Lösung wurde in ca. 300 ml eiskaltem Wasser eingegossen und es wurde ca. 200 ml Ionentauscher (Typ III, OH<sup>-</sup>, starke Base) hinzugegeben. Die Lösung wurde einige Minuten geschwenkt und kontinuierlich der pH-Wert überprüft. Bei Erreichen eines neutralen pH-Wertes wird die Lösung mit Hilfe eines Büchnertrichters filtriert. Das leicht gelbe Filtrat wird am Rotationsverdampfer bei 40 °C stark eingeeengt, mit ein wenig dem. Wasser versetzt und gefriergetrocknet. Bei dieser Aufarbeitungsform muss ein störender Amingeruch des Produktes in Kauf genommen werden.

Eine Säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes gestaltet sich aufgrund der hohen Polarität und der damit verbundenen schlechten Löslichkeit im Elutionsmittel als schwierig und ist nur für geringe Mengen geeignet. Elutionsmittel 70 % Ethanol – 30 % Diethylether.

Es wurde 10,3 g (37,6 mmol) glasartige, amorphe 3-*O*-(2-Furanat)- $\alpha$ -*D*-glucopyranose mit einer Reinheit von 80 % erhalten. Bei dem größten Teil der Verunreinigung handelt es sich um Glucose. Dies entspricht 62,7 % der theoretisch möglichen Masse.

### **Analytik:**

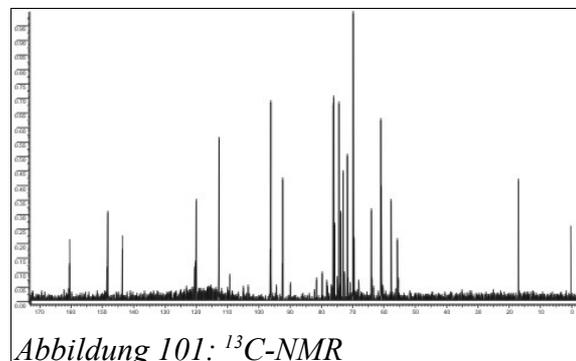
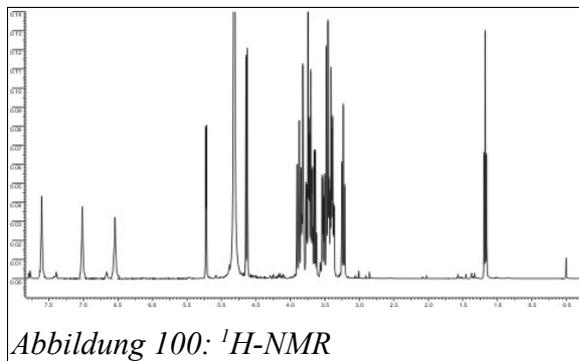
Dünnschichtchromatographie: 80 % Dichlormethan : 20 % Methanol

Glucose : 0,01	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Produkt: 0,18	UV/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Acetonglucose: 0,42	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Aceton-furan-glucose: 0,61

UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Edukt : 0,90

UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Zur besseren Zuordnung der Signale siehe Abbildung 99.

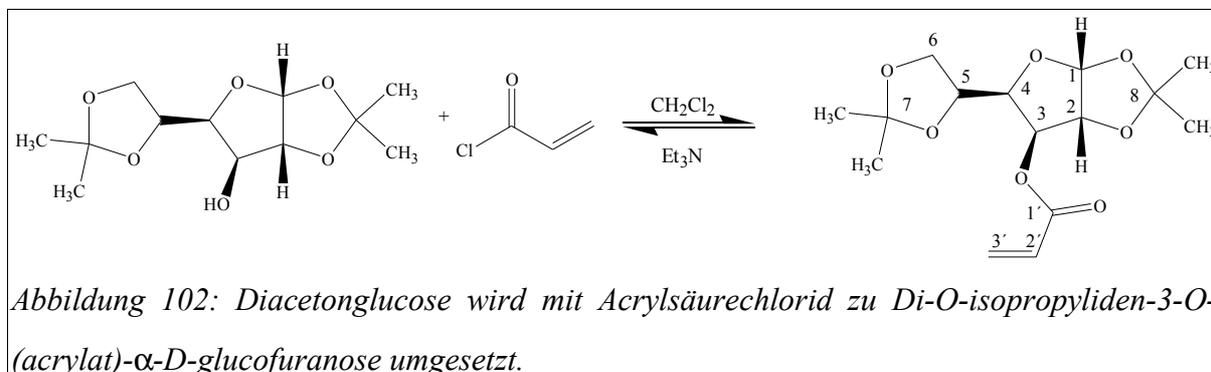
<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,19 (t, 3H, CH<sub>3</sub> Verunreinigung ); 3,25 (q, 2H, 6); 3,33-3,92 (m, 8H,); 4,66 (d, 1H, 1); 5,25 (d, 1H, 1); 6,67 (q, 1H, 4'); 7,40 (d, 1H, 3'); 7,76 (d, 1H, 5') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0,00 (TMS); 61,06 (6); 69,90 (4); 73,07 (2); 74,45 (5); 76,27 (3); 96,23 (1); 112,06 (4'); 120,06 (3'); 143,67 (2'); 148,31 (5'); 160,56 (Carbonyl) ppm.

#### 5.1.2.4 3-O-Acrylat-glucoopyranose

3-O-Acrylat-glucoopyranose wurde wie schon die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucoopyranose in einer zweistufigen Reaktion aus Diacetonglucose hergestellt.

### 5.1.2.5 Herstellung von Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(acrylat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose



Aus der Literatur ist ein Herstellungsverfahren für Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(acrylat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose bekannt. [169] [170] [171].

In einen Dreihalsrundkolben wurden 42,50 g (163 mmol) 1,2-5,6-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -*D*-glucose eingewogen und in 220 ml Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurde 34 ml (245 mmol) Triethylamin gegeben. Der Kolben wurde mit einem CaCl<sub>2</sub> Rohr versehen und auf -20 °C gekühlt. Zu der gekühlten Lösung wurde langsam 15 ml (180 mmol) Acrylsäurechlorid hinzugegeben und noch 2 Stunden bei einer Temperatur von ca. 0°C gehalten. Anschließend wurde die Lösung bei 40–50 °C ca. 16 Stunden gerührt. Es ist eine rot-braune Lösung entstanden, die einmal mit ca. 100 ml einer verd. Natriumhydrogencarbonat Lösung und anschließend dreimal mit ca. 100 ml dem. Wasser ausgeschüttelt wurde. Die organische Phase wurde mit NaSO<sub>4</sub> (wasserfrei) getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Es wurde ein roter Sirup erhalten der wie in Kapitel 5.1.2.2 beschrieben mit Heptan umkristallisiert wird.

Auch von diesem Produkt wurde versucht, mit dem in Kapitel 5.1.2.2 beschriebenen Verfahren zur Erzeugung von Kristallen für die Röntgenstrukturanalyse, Einkristalle zu erzeugen. Es wurden jedoch leider Kristalle von zu geringer Qualität erzeugt, um sie

[169] Krishna P.R., Kannan V., Ilangovan A. Scharman G.V.M., Asymmetric Baylis-Hillman reaction using sugar acrylates-synthesis of optically active  $\alpha$ -methylene- $\beta$ -hydroxy alkanooates, *Tetrahedron Asymmetry*, Vol. 12, (2001), S. 829-837

[170] Ouchi T., Jokei S., Chikashita H., Synthesis of 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-[3-(uracil-1-yl)propionoyl]- $\alpha$ -*D*-glucofuranose and 1,2-mono-*O*-isopropylidene-6-*O*-[3-(uracil-1-yl)propionoyl]-  $\alpha$ -*D*-glucofuranose, *J. Heterocyclic Chem.*, Vol. 19, (1982), S. 935

[171] Koßmehl G., Volkheimer J., Synthesis of Polymerizable Hexose Derivates, *Liebigs Ann. Chem.* (1989), S. 1127-1130

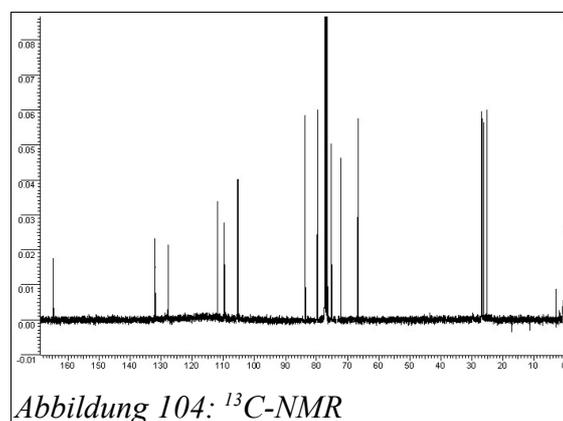
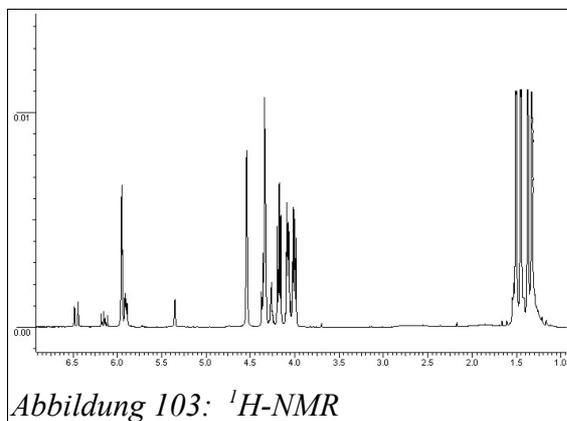
weiterführenden Röntgenstruktur-Untersuchungen zuzuführen.

Es wurde 36.4 g (116 mmol) kristalline 1,2-5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(acrylat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose erhalten. Dies entspricht 71 % der theoretisch möglichen Masse.

### Analytik:

Dünnschichtchromatographie: 85 % Dichlormethan : 5 % Methanol

Produkt: 0,74	UV/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Edukt : 0,57	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

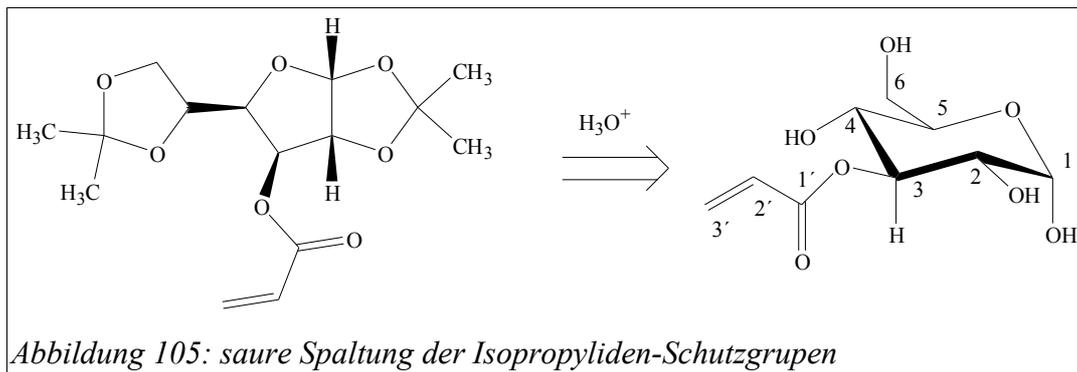


Zur besseren Zuordnung der Signale siehe Abbildung 102.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,54 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 4,01 (dd, 1H, 6); 4,09 (dd, 1H, 6), 4,17 (dd, 8,7 Hz, 4,5 Hz, 1H, 4) 4,34 (m, 1H, 5); 4,54 (d,  $J_{2,1}$  = 3,7Hz, 1H, 2); 5,35 (d,  $J_{3,4}$  = 1,8 Hz, 1H, 3); 5,90 (dd,  $J$  = 10,5 Hz, 1,5 Hz 1); 5,95 (d,  $J_{1,2}$  = 3,6 Hz, 1H, 3'); 6,18 (dd,  $J$  = 17,4 Hz, 10,5 Hz 1H, 2'); 6,47 (dd,  $J$  = 17,4 Hz, 1,5 Hz 1H, 3') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0,00 (TMS), 25,16 (CH<sub>3</sub>); 26,21 (CH<sub>3</sub>); 26,84 (CH<sub>3</sub>); 26,88 (CH<sub>3</sub>); 67,2 (6); 72,5 (3); 75,2 (5); 79,8 (4); 83,4 (2); 105,3 (1) 109,3 (8); 111,8 (7); 127,4 (2'); 131,8 (3'); 164,9 (Carbonyl) ppm.

### 5.1.2.6 Herstellung von 3-*O*-Acrylat-*D*-glucose



Die Abspaltung der Schutzgruppe und die Aufarbeitung des Produktes erfolgt analog zu der Durchführung in Kapitel 5.1.2.3.

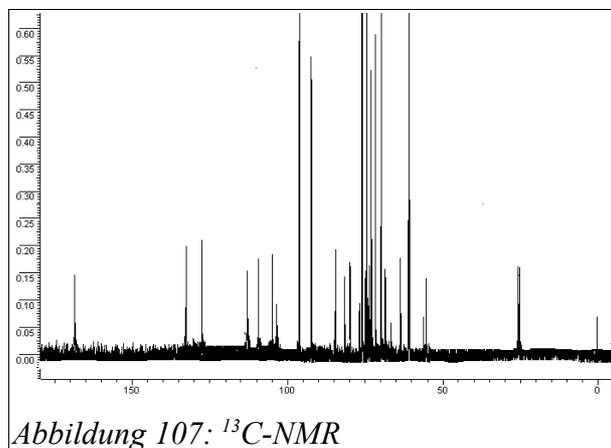
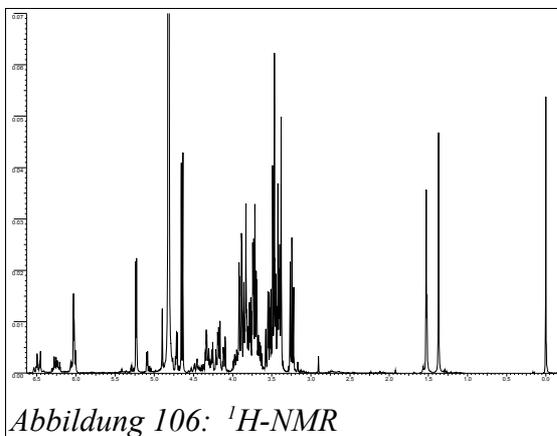
Es wurden 36,4 g (116 mmol) 1,2-5,6 Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-(acrylat)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose eingesetzt und 12,4 g (53 mmol) 3-*O*-Acrylat-*D*-glucose als Anomerengemisch in Form eines glasartigen Feststoffs erhalten. Die Reinheit beträgt 66 % bei der Hauptverunreinigung handelt es sich um Glucose. Dies entspricht 30,4 % der theoretisch möglichen Masse.

### Analytik:

Dünnschichtchromatographie: 80 % Dichlormethan : 20 % Methanol

Produkt: 0,14      UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Edukt : 0,81      UV/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 1,37 (s, C8-CH<sub>3</sub>); 1,53 (s, C8-CH<sub>3</sub>); 3,25 (q, 2H, 6); 3,38-3,92

(m, 8H<sub>s</sub>); 4,66 (d, J = 7,8 Hz 1H, 1); 5,25 (d, J = 3,8 Hz 1H, 1); 6,03 (d, J<sub>1,2</sub> = 3,5 Hz, 1H, 3'); 6,23 (dd, J = 17,4 Hz, 10,4 Hz 1H, 2'); 6,47 (dd, J = 16,7 Hz, 15 Hz 1H, 3') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100,62 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,00 (TMS); 60,9 (αβ-C6); 69,9 (αβ-C4); 71,7 (α-C2); 73,1 (α-C5); 74,4 (β-C2); 76,3 (β-C5); 79,9 (α-C3); 84,6 (β-C3); 92,4 (α-C1); 96,2 (β-C1); 127,6 (2'); 132,9 (3'); 168,7 (Carbonyl) ppm.

### 5.1.2.7 Herstellung modifizierter Bakteriencellulose

Zur Erzeugung der modifizierten Bakteriencellulose wird im Hestrin-Schramm Medium die Glucose ganz oder teilweise durch die modifizierte Glucose ersetzt. Hierzu wird 5 g des modifizierten Zuckers in 100 ml dem. Wasser gelöst. Diese Lösung wird durch einen Nylonfilter (Rückhaltevermögen ca. 20 µm) filtriert um grobe Bestandteile abzutrennen. Anschließend wird die Lösung unter Druck durch einen 0,45 µm Nitrocellulosefilter filtriert. Die so vorgereinigte Lösung wird durch einen sterilen Spritzenaufsatz mit 0,45 µm Porengröße direkt in das autoklavierte Hestrin-Schramm-Medium gegeben. Dieses wurde zuvor aus 1,25 g Pepton, 1,25 g Hefe Extrakt, 0,7g Natriumhydrogenphosphat und 0,3 g Zitronensäure und 150 ml dem. Wasser hergestellt.

Durch Mischen der ursprünglichen Standard-Nährlösung und dem Hestrin-Schramm-Medium aus den modifizierten Zuckern, können verschiedene Glucose Konzentrationen der Nährlösung eingestellt werden. Nach dem Impfen der Nährlösung mit *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 und einer Kultivierungszeit von 7 Tagen konnte bei Verwendung von 3-O-(2-Furanat)-α-D-glucopyranose als Kohlenstoffquelle die entsprechende 2-Furanatcellulose erzeugt werden. Bei Verwendung von 3-O-Acrylat-glucopyranose als Kohlenstoffquelle, die in den Nährlösungen in Konzentrationen von 10-100 % vorlagen, konnte kein Cellulosederivat erzeugt werden. Anscheinend zeigt dieses Glucosederivat eine Zelltoxizität gegenüber den verwendeten Mikroorganismen, so dass kein Polymer erzeugt wird.

Die Aufarbeitung der erhaltenen Membranen erfolgt durch Waschen mit dem. Wasser.

Einen NMR-Spektroskopische Untersuchung des Produktes gestaltet sich aufgrund der vermutlich hohen Molmasse schwierig. Des weiteren sind deuterierte Lösungsmittelsysteme für die erhaltenen Produkte unbekannt bzw. sehr kostenintensiv (1ml Lösungsmittel > 100€).

Eine vergleichsweise einfache Analytische Methode stellt die Elementaranalyse dar. Hierbei

wird der prozentuale Anteil der Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff miteinander ins Verhältnis gesetzt. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Elementaranalyse an einer „normalen“ Bakteriencellulose, an einer Bakteriencellulose die als Referenz dient (Biofill), und an einer modifizierten Bakteriencellulose bei der die Glucose im Nährmedium durch 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose ersetzt wurde, dargestellt.

Element	<i>Gehalt berechnet [%]</i>	<i>Gehalt gefunden [%]</i>	<i>Verbindung</i>
C	44,45	43,90	Bakteriencellulose aus <i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 10245
H	6,22	6,64	
N	0	0,56	
C	44,45	43,42	Bakteriencellulose Referenz (Biofill)
H	6,22	6,47	
N	0	0	
C	51,57	46,3	3-(2-Furanat)-cellulose 100 %
H	4,72	5,2	
N	0	ca. 3	

*Tabelle 18: Ergebnisse der Elementaranalyse an einer „normalen“ Bakteriencellulose (oben), an einer Bakteriencellulose die als Referenz dient (Biofill) (mitte), und an einer modifizierten Bakteriencellulose bei der die Glucose im Nährmedium zu 100 % durch 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucopyranose ersetzt wurde (unten).*

Die beiden oberen Ergebnisse der Elementaranalyse in Tabelle 18 weisen eine Abweichung von den berechneten Werten - für Kohlenstoff von 0,55-1,03 % und für Wasserstoff von 0,25-0,42 % auf. Bei der oberen Probe wird zusätzlich 0,56 % Stickstoff nachgewiesen. Dieser Stickstoffgehalt beruht auf der Anwesenheit von Bakterien in der Cellulose die durch den Waschprozess nicht entfernt wurden. Bei der 3-(2-Furanat)-cellulose werden wesentlich geringere Werte für die untersuchten Elemente ermittelt als durch die Berechnung zu erwarten ist. Außerdem fällt auf dass diese Membranen einen hohen Stickstoffgehalt von ca. 3 % aufweisen. Dies ist durch enthaltene Bakterien in der Membran zurückzuführen. Bei dem Waschprozess, der in diesem Fall nur mit dem Wasser und nicht mit einer 0,1-1 mol/l Natriumhydroxidlösung durchgeführt wurde, werden wesentlich weniger Bakterien entfernt. Durch diesen hohen Stickstoffgehalt in den Membranen werden naturgegeben auch der Gehalt für Kohlenstoff und Wasserstoff in unbekannter Weise beeinflusst. Dies kann auch ein Grund

für die ca. 5,3 % geringeren Werte für Kohlenstoff und ca. 0,5 % höheren Werte für Wasserstoff sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bakterien nur im verminderten Maße die modifizierte Glucose zur Cellulose umgewandelt haben. Es zeigt sich jedoch bei der 3-(2-Furanat)-cellulose im Vergleich zur „normalen“ Bakteriencellulose eine Tendenz zu höheren Werten für Kohlenstoff und niedrigeren Werten für Wasserstoff. Durch die hohe Schwankungsbreite der Elementaranalyse insbesondere durch den hohen Stickstoffgehalt kann kein durchschnittlicher Substitutionsgrad für die 3-(2-Furanat)-cellulose bestimmt werden.

### 5.1.3 Ultraschallabbau von Bakteriencellulose

Die Bakteriencellulose hat eine sehr hohe Molmasse, und wegen ihrer Kristallinität wird ein elektrophiler Angriff erschwert. Da die Bakteriencellulose hochgequollen vorlag, wurde versucht, die Bakteriencellulose heterogen mit Hilfe von Ultraschall abzubauen. Andere Abbauarten wie z.B. saurer-, alkalischer- oder enzymatischer-Abbau erweisen sich für Cellulose, die sich u.a. in einer Mischung aus N,N-Dimethylacetamid (DMAc) und 9 % Lithiumchlorid löslich ist, aufgrund von Nebenreaktionen mit dem Lösungsmittel als sehr problematisch. In der Literatur sind eine Reihe anderer Lösungsmittel für Cellulose beschrieben, wie z.B. Trifluoressigsäure, eiskalte Lauge oder Tetramethylammoniumhydroxid. Diese Lösungsmittel verhalten sich jedoch nicht inert gegenüber Cellulose. Andere Lösungsmittelsysteme wie z.B. Salzschnmelzen eignen sich nicht zur Untersuchung der Molmasse. Ein alternatives, inertes Lösungsmittelsystem stellt eine Mischung aus 8 % Lithiumchlorid in 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinon (DMI) dar, jedoch liegt für dieses Lösungsmittelsystem zur Zeit noch keine  $[\eta]$ -M-Beziehung vor [172]. Das verwendete Lösungsmittelsystem reagiert empfindlich auf geringe Wassergehalte in der Cellulose oder im Lösungsmittel [173]. Die Bakteriencellulose wurde deshalb mit einem Verfahren, das als Lösungsmittelaustausch bekannt ist, gelöst. Hierzu wurden zunächst die Bakteriencellulosemembranen gefriergetrocknet. Diese gefriergetrockneten Membranen wurden anschließend einen Tag in demineralisiertem Wasser gequollen. Hiernach wurden die

---

[172] Tamai N., Tatsumi D., Matsumoto T., Rheological Properties and Molecular Structure of Tunicate Cellulose in LiCl/1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone, *Biomacromolecules*, Preprint, (2004)

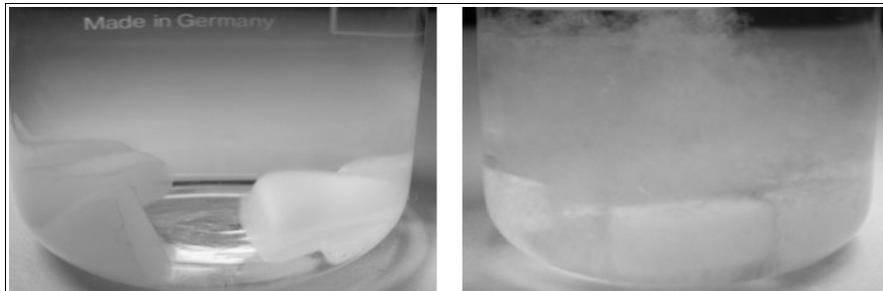
[173] Chrapava S., Touraud D., Rosenau T., Potthast A., Kunz W., The investigation of the influence of water and temperature on the LiCl/DMAc/cellulose system, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol. 5, (2003), S. 1842–1847

Membranen ca. 4 Stunden in Methanol suspendiert, das Lösungsmittel verworfen und mit frischem Methanol nochmal einen Tag unter Rühren suspendiert. Am darauf folgenden Tag wird das Methanol verworfen und gegen wasserfreies N,N-Dimethylacetamid (DMAc) ausgetauscht. Es wird wie beim Methanol verfahren. Das wasserfreie N,N-Dimethylacetamid wurde durch Zugabe von frisch regeneriertem 4 Å Molsieb und einer 24 stündigen Einwirkdauer erhalten.

Anschließend wird das DMAc im Ölpumpenvakuum bei 60 °C ca. 3 Stunden entfernt. Diese „vorgetrockneten“ Proben werden zwei weitere Tage Gefriergetrocknet [174].

Die so vorbehandelten Proben werden in einer Lösung aus 9 % LiCl in N,N-Dimethylacetamid (wasserfrei) über einen Zeitraum von 8 Tagen bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Magnetrührers in Lösung gebracht. Für die viskosimetrische Bestimmung der Molmasse ist es ausreichend, dass ca. 20 mg Bakteriencellulose in 100 Lösungsmittel gelöst werden.

Die hergestellte Lösung und die hochgequollenen Membranen im heterogenen Zustand wurden ca. 2 Stunden bei äußerer Kühlung von -10°C ultraschalldegradiert.



*Abbildung 108: Bakteriencellulosemembran vor (links) und nach (rechts) der Ultraschalldegradation.*

In der Lösung sind nach der heterogenen Beschallung Cellulosefasern zu erkennen. Die Bakteriencellulosestücke haben sich in Form und Größe jedoch nicht verändert. Es werden nur die größeren Bestandteile der Bakteriencellulose für die weiterführenden Untersuchungen verwendet.

#### **5.1.4 Molmassenbestimmung an Bakteriencellulose**

[174] Ishii D., Tatsumi D., Matsumoto T., Effect of Solvent Exchange on the Solid Structure and Dissolution Behavior of Cellulose, *Biomacromolecules*, Vol. 4, (2003), S. 1238-1243

Die homogen oder heterogen ultraschalldegradierte und die nicht behandelte Bakteriencellulose wurde zur Bestimmung der Molmasse viskosimetrisch untersucht. Die Bakteriencellulose wurde in Dimethylacetamid, das 9 % Lithiumchlorid enthält, gelöst (näheres zum Lösungsverfahren siehe 5.1.3).

Zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen wurde die Lösung drucklos durch einen Glasfilterfritte (Por. 1) filtriert. Aufgrund der guten Löslichkeit von Cellulose in diesem Lösungsmittel darf keinesfalls ein herkömmlicher Papierfilter verwendet werden.

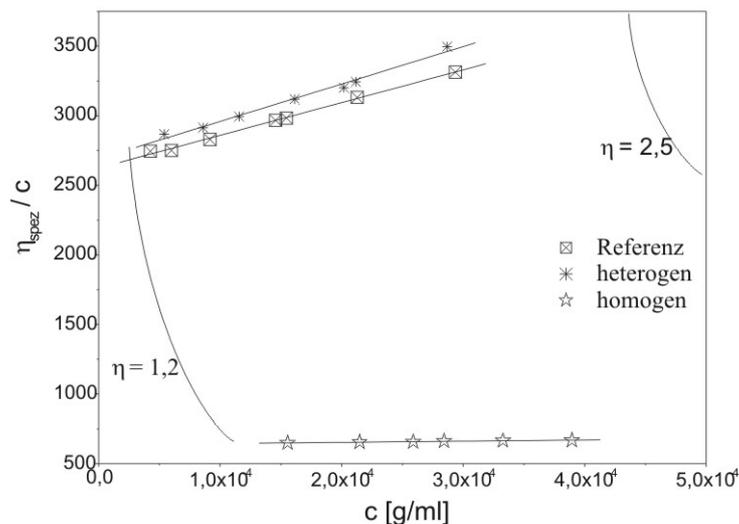


Abbildung 109: viskosimetrische Messwerte der unbehandelten (Referenz) und der homogen bzw. heterogen Ultraschallabgebauten Bakteriencellulose.

Es zeigt sich, dass es nicht möglich ist, hochgequollene Bakteriencellulose heterogen mit Hilfe von Ultraschall abzubauen (Abbildung 109). Die viskosimetrischen Untersuchungsergebnisse die in Tabelle 19 angegeben sind, zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied zwischen der Referenzprobe und der heterogen mit Ultraschall behandelten Probe. Die homogen gelöste Bakteriencellulose kann mit Hilfe von Ultraschallenergie aufgebrochen und degradiert werden, wodurch sich die die Molmasse auf ca. ein Drittel reduziert.

Bakteriencellulose	Referenz	heterogen Abgebaut	homogen Abgebaut
$[\eta]$ [ml/g]	2.624	2.690	635
$M_{\eta}$ [g/mol]	1.390.000	1.420.000	423.000
DP	8.600	8.780	2.610

<b>Bakteriencellulose</b>	<i>Referenz</i>	<i>heterogen Abgebaut</i>	<i>homogen Abgebaut</i>
$k_H$	0,34	0,37	0,21
$k_H^* [\eta]^2$	2.352.433	2.688.785	85.174
$c_\eta^* [\%]$	0,095	0,092	0,39
Knäueldurchmesser [nm] (vis.)	168	171	70
Knäuelvol. [nm <sup>3</sup> ]	2.510	2.630	185

*Tabelle 19: Übersicht der viskosimetrischen Daten von Bakteriencellulose*

Die viskosimetrische Molmasse  $M_\eta$  wurde über folgende Beziehung errechnet:

$$[\eta] = 1,28 \cdot 10^{-4} \cdot M^{1,19} \quad [175]$$

Die Bakteriencellulose weist nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen bei 28 °C eine viskosimetrische Molmasse von rund 1,4 Millionen g/mol auf und zählt damit zu den sehr hochmolekularen Cellulosen. Da ein ionisches Lösungsmittel zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen verwendet wurde, liegt das Einzelmolekül in einem stark aufgeweiteten Zustand vor ( $a = 1,19$   $[\eta]$ -M-Beziehung). Hieraus resultieren die sehr großen Polymerknäueldurchmesser von ca. 170 nm bei nicht abgebauter Cellulose.

### 5.1.5 Quellung

Bei Bakteriencellulose-Membranen (BC-Membranen) wird das Quellvermögen maßgeblich durch den Aufarbeitungsprozess beeinflusst. Eine BC-Membran, die nach dem Herstellungsprozess nicht getrocknet wurde, enthält eine sehr große Menge Flüssigkeit. Ein Trocknen der BC-Membranen an der Luft erzeugt einen dünnen Film, der nur eine geringe Rückquellbarkeit aufweist. Selbst eine schonende Gefriertrocknung der BC-Membranen reduziert aufgrund einer Netzwerkveränderung die Quellfähigkeit gegenüber Wasser. In Abbildung 110 ist der Wassergehalt bzw. die Quellfähigkeit von BC-Membranen dargestellt die nach der Herstellung unterschiedlich aufgearbeitet wurden.

[175] Mc Cormick, C.L.; Callais, P.A.; Hutchinson, B.H., Jr.; Solution Studies of Cellulose in Lithium Chloride and N,N-Dimethylacetamide; *Macromolecules*, Vol. 18, (1985), S. 2394-2401

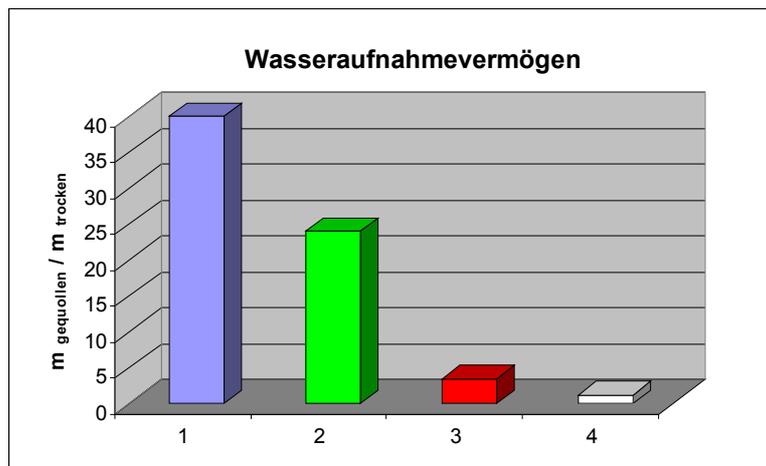


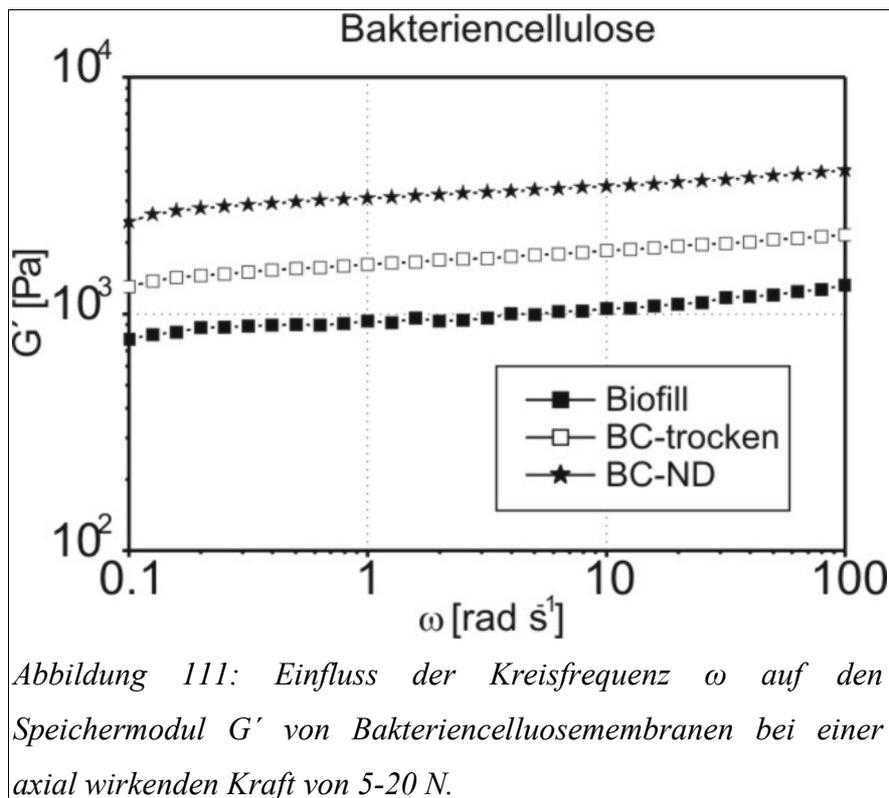
Abbildung 110: Wasseraufnahmevermögen von Bakteriencellulose-Membranen – (1) „never dried“; (2) gefriergetrocknet (Rückquellbarkeit); (3) 3 Stunden bei 60°C getrocknet (Rückquellbarkeit); (4) Baumwoll-Linters (Rückquellbarkeit).

Eine „never dried“ BC-Membran liegt nach dem Herstellungsprozess in einem hochgequollenen Zustand vor. Diese Membranen enthalten ca. die 40 fache Menge Wasser in der Netzwerkstruktur (in Abbildung 110 als Quotient  $m_{\text{gequollen}}/m_{\text{getrocknet}}$  angegeben). Die gefriergetrockneten Membranen weisen trotz der faserartigen Struktur einen wesentlich geringere Rückquellbarkeit (24 fach) auf als die „never dried“ Membranen. Dies ist ein Indiz für die Zerstörung der Netzwerkfeinstruktur durch diesen Trocknungsprozess. Die bei 60 °C getrockneten BC-Membranen zeigen eine geringe Rückquellbarkeit von  $m_{\text{gequollen}}/m_{\text{getrocknet}} = 3,5$ . Im Vergleich zu Cellulose die aus Holz oder Baumwolle gewonnen wurde (Baumwoll-Linters) die nur eine Quellbarkeit von 1,18 aufweist, zeigen alle Formen der Bakteriencellulose vermutlich durch die feinere Cellulosestruktur ein wesentlich höheres Rückquellvermögen.

### 5.1.6 Netzwerkstruktur

Bei Bakteriencellulose handelt es sich um ein physikalisches Netzwerk. Die REM-Aufnahmen zeigen, dass die einzelnen Mikrofibrillen miteinander verschlauft sind (siehe Abbildung 114). Diese Verschlaufungen bilden sich, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, durch die Bewegung der BC produzierenden Mikroorganismen. Es wurden an Bakteriencellulose-Membranen Oszilationsmessungen im linear viskoelastischen Bereich

durchgeföhrt, wobei so genannte „never dried“ Membranen, d.h. Bakteriencellulose die nach dem Herstellungsprozess nicht getrocknet werden (BC-ND), bei einer Axialkraft von ca. 5 N im linear viscoelastischen Bereich (1 % Deformation) vermessen wurden. Des weiteren wurden getrocknete Bakteriencellulose Membranen (BC-trocken, Biofill), die vor der Untersuchung in Wasser gequollen wurden, bei einer Axialkraft von ca. 20 N im linear viscoelastischen Bereich (1 % Deformation) vermessen.



Alle Kurvenverläufe der Membranen deuten auf eine permanente Netzwerkstruktur der Bakteriencellulose hin, da der Speichermodul  $G'$  im untersuchten Kreisfrequenzbereich konstant bleibt. Wenn sich die Netzwerkstruktur durch den Trocknungsprozess nicht ändert gilt für die gemessenen Speichermodule folgender Zusammenhang (Gleichung 48):

$$G'_1 = Q \cdot G'_2$$

Gleichung 48

$G'_1$  ist hierbei das Speichermodul einer getrockneten BC-Membran (z.B. BC-trocken) und  $G'_2$  das Speichermodul einer „never dried“ BC-Membran. Bei  $Q$  handelt es sich um den Quellungsfaktor der einen direkte Umrechnung der Werte ineinander erlaubt wenn sich die Netzwerkstruktur der Membranen durch den Trocknungsprozess nicht ändert.

<i>Name</i>	<i>G' [Pa]</i>	<i>M<sub>e</sub> [g/mol]</i>	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub> [cm<sup>3</sup>]</i>	<i>ξ [nm]</i>	<i>Quellung</i>
Biofill (G' <sub>1</sub> )	950	522.000	3.200	2,3E+17	16,3	3,4
BC-trocken (G' <sub>1</sub> )	1691	440.000	2.700	4,1E+17	13,5	4,1
BC-ND (G' <sub>2</sub> )	3112	20.000	123	7,6E+17	11	40,0

*Tabelle 20: Netzwerkstrukturparameter der Bakteriencellulosemembranen in Abhängigkeit des durchgeführten Trocknungsprozess*

Die beiden an Luft getrockneten Bakteriencellulose-Membranen (Biofill, BC-trocken) zeigen vergleichbare Werte bezüglich ihrer Netzwerkstrukturparameter. Bei der Biofill-Membran handelt es sich um eine kommerzielle Probe, die als Vergleichssubstanz dient. Es zeigt sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Membran dieser in Ihren Eigenschaften weitestgehend entspricht. Im Trocknungsprozess kollabiert die sehr feine Netzwerkstruktur aus einzelnen Cellulosefibrillen (siehe auch Morphologie von BC), es bildet sich optisch eine kompakte Struktur, bei der die Cellulosefibrillen miteinander verkleben. Dies zeigt sich auch in der bedeutend geringeren Rückquellbarkeit ( $m_{\text{gequollen}}/m_{\text{getrocknet}} = 3,5$  für die getrockneten zu  $m_{\text{gequollen}}/m_{\text{getrocknet}} = 40$  der „never dried“ Membranen) dieser Membranen in Wasser. In der Oszilationsmessung werden sehr hohe Verhängungsmolmassen bestimmt, die sich mit der Ausbildung von sehr kompakten Domänen (Cellulosefibrillen) aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Netzwerkes erklären lassen. Diese sind für die Oszilationsmessungen aufgrund ihrer sehr geringen Kettenbeweglichkeit nicht zugänglich, und können deshalb nicht erfasst werden. Bei der Messung werden nur die beweglichen Anteile im Netzwerk erfasst, was zu einer hohen Verhängungsmolmasse führt. Bei einer BC-Membran, die nach dem Herstellungsprozess nicht getrocknet (never dried) wurde, sind diese Bereiche nicht so stark ausgeprägt und es wird ein wesentlich geringerer Wert für die Verhängungsmolmasse ( $M_e = 20.000$  g/mol) ermittelt. Hierdurch verringert sich auch der Netzpunktabstand dieser Membranen von 13,5 nm bis 16,3 nm der getrockneten Membranen auf 11 nm im Falle der „never dried“ Membranen. Die Länge eines „Cellulosefadens“ zwischen zwei Verknüpfungspunkten entspricht bei einer mittleren Länge einer Monomereinheit von 415 pm bei  $M_e = 20.000$  g/mol ca. 0,5 µm für die „never dried“ Membran. Dieser Wert liegt deutlich unter den Werten, die bei den REM Aufnahmen (2-5 µm) zu erkennen ist (siehe Kapitel 5.1.8). Dies liegt an der Zerstörung der Feinstruktur dieser Membranen bei Gefriertrocknung, die sich auch durch die geringe Rückquellbarkeit der

Membranen zeigen. So kann davon ausgegangen werden, dass „never dried“ Membranen eine feinere Netzwerkstruktur als gefriergetrocknete Membranen aufweisen, die sich mit Hilfe von Oszillationsmessungen bestimmen lassen.

### 5.1.7 Permeabilität der Bakteriencellulose-Membranen

Es wurde die Gasdurchlässigkeit (Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid) von Bakteriencellulose-Membranen mit der Methode der Druckanstiegsmessung untersucht. Hierbei wurden gefriergetrocknete und bei 60 °C getrocknete BC-Membranen verwendet, die mit Hilfe von *Acetobacter xylinum* (ATCC 10245) nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen im Hestrin-Schramm Medium erhalten wurden. Die Ergebnisse der Permeationsuntersuchung der bei 60 °C getrockneten BC-Membran sind in Abbildung 112 dargestellt.

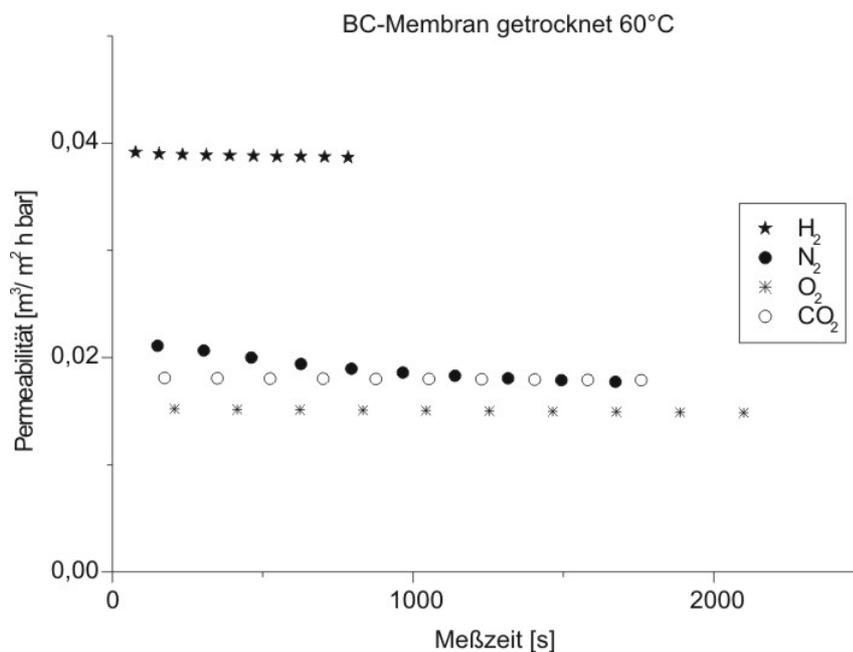


Abbildung 112: Permeabilitäten einer bei 60°C getrockneten BC-Membran die durch *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 hergestellt wurde. (Druckanstiegsmessungen)

Bei den Permeabilitätsuntersuchungen, die in Abbildung 112 und Abbildung 113 gezeigt sind, wurden BC-Membranen eingesetzt die beide mit dem Bakterienstamm (ATCC 10245) unter identischen Kultivierungsbedingungen (7 Tage bei 30 °C) hergestellt wurden. Die BC-Membranen wurden lediglich unterschiedlichen Trocknungsbedingungen ausgesetzt. In Abbildung 112 sind die gemessenen Permeabilitäten einer bei 60 °C getrockneten BC-

Membran dargestellt. Es werden bei dieser Membran, die ein durchsichtig, michtig weißen Film bildet, im Vergleich zu der gefriergetrockneten Membran, die Watte artig ist, um den Faktor 47 geringere Permeabilitäten für Sauerstoff ermittelt. In Tabelle 21 sind die gemessenen Permeabilitäten und Selektivitäten der BC-Membran für verschieden Gase angegeben.

Gas	Permeabilität [ $\text{m}^3/\text{m}^2 \text{ h bar}$ ]	Selektivität
Wasserstoff	0,0388	-
Stickstoff	0,0191	0,49
Sauerstoff	0,0150	0,39
Kohlendioxid	0,0180	0,46

Tabelle 21: Permeabilität und Selektivität von einer bei  $60^\circ\text{C}$  getrockneten BC-Membran.

Die ermittelten Pemeabilitäten dieser BC-Membran bezüglich Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid sind eher gering. Der Unterschied der Selektivität zwischen Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid (0,39 – 0,49) ist gering so das alle Gase durch die Membran permeieren können Die höhere Permeationsfähigkeit von Wasserstoff gegenüber z.B. Sauerstoff ist hauptsächlich auf die geringe Molekülgröße von Wasserstoff gegenüber den anderen Gasen zurückzuführen.

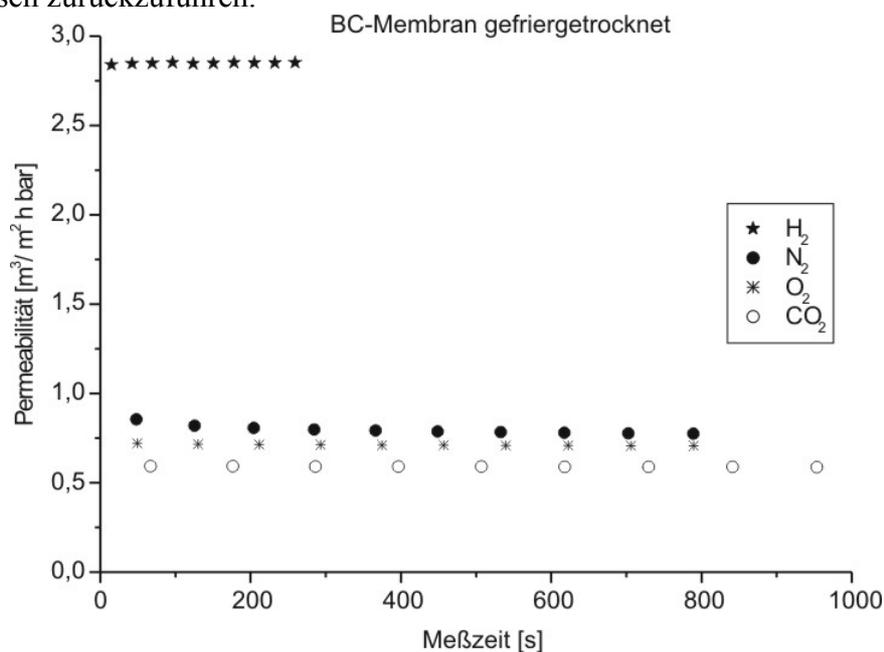


Abbildung 113: Permeabilitäten einer gefriergetrockneten BC-Membran die mit *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 hergestellt wurde. (Druckanstiegsmessungen)

In Abbildung 113 sind die Messergebnisse der Permeabilitäten der gefriergetrockneten BC-Membranen in Abhängigkeit von der Messdauer für unterschiedliche Gase angegeben.

Es werden bei der gefriergetrockneten BC-Membran wesentlich größere Werte für die Permeabilität ermittelt. In Tabelle 22 sind die gemessenen Permeabilitäten und Selektivitäten für verschiedenen Gase angegeben.

Gas	Permeabilität [ $\text{m}^3/\text{m}^2 \text{ h bar}$ ]	Selektivität
Wasserstoff	2,85	-
Stickstoff	0,80	0,28
Sauerstoff	0,71	0,25
Kohlendioxid	0,59	0,21

*Tabelle 22: Permeabilität und Selektivität von einer gefriergetrockneten BC-Membran.*

Es zeigt sich eine Selektivität die nur durch die unterschiedliche Molekülgröße beeinflusst wird, d.h. dass kleine Moleküle (wie Wasserstoff) leichter durch die Membran permeieren können als größere Moleküle (Kohlendioxid). Außerdem wird bei den gefriergetrockneten Membranen ein wesentlich höheres Permeationvermögen (von Faktor 73 für Wasserstoff bis Faktor 28 für Kohlendioxid) festgestellt werden. Dies kann durch die unterschiedliche Morphologie der unter verschiedenen Bedingungen getrockneten Membranen erklärt werden (siehe auch Kapitel 5.1.8). So führt ein Trocknen bei 60°C zu einem kompakten Film, in dem die Cellulosefibrillen dicht gepackt vorliegen. Diese kompakte Struktur vermindert maßgeblich die Permeabilität der Membran im Vergleich zu der gefriergetrockneten Membran. Bei dieser entsteht durch den schonenden Trocknungsprozess eine Watte ähnliche Struktur, bei der die Cellulosefibrillen isoliert und ineinander verschlauft vorliegen. Durch diese lockere Cellulose-Feinstruktur kann auch mehr Gas durch die Membran gelangen und es kommt zu einer Erhöhung der Permeationsfähigkeit.

Für die Wundheilung weisen beide Formen der Membran eine ausreichende Gasdurchlässigkeit (Sauerstoff) auf. Hierdurch kann die Ausbildung eines anaeroben Wundmilieus verhindert werden, das der Wundheilung wegen der Bildung pathogener Keime nicht zuträglich ist.

### 5.1.8 Morphologie der Bakteriencellulosemembranen

Die untersuchte Bakteriencellulose wurde mit dem Bakterium *Acetobacter xylinum* nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen an der Grenzfläche des Hestrin-Schramm Mediums gewonnen. Ein Teil der so erhaltenen Bakteriencellulose wurde nach einem Reinigungsprozess bei 60 °C getrocknet. Der andere Teil wurde im hochgequollenen Zustand (never dried) gefriergetrocknet.

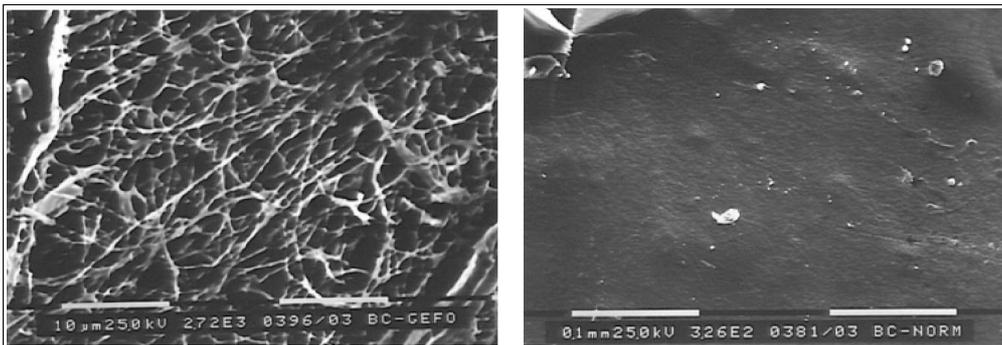


Abbildung 114: REM-Aufnahmen von Bakteriencellulose - links Gefriergetrocknet - rechts bei 60°C getrocknet

Im linken Photo der Abbildung 114 ist die faserartige Struktur der gefriergetrockneten Bakteriencellulose zu erkennen. Die Bakteriencellulose ist im hochgequollenen Zustand (never dried) eingefroren und anschließend gefriergetrocknet worden. Hieraus kann man ableiten, dass auf der linken Aufnahme annähernd die Morphologie des hochgequollenen Zustandes der Bakteriencellulose zu sehen ist. Es kommt jedoch auch durch eine schonende Gefrierdrying der Bakteriencellulose, zu einer Änderung der Netzwerk-Morphologie, die sich in der geringeren Rückquellbarkeit der gefriergetrockneten Membranen zeigt. Die Netzwerkstruktur der „never dried“ Membranen müsste demnach eine noch feinere Netzwerkstruktur als die gefriergetrocknete Membran aufweisen. Das rechte Photo in Abbildung 114 zeigt die gleiche Membran, die bei 60 °C getrocknet wurde. Diese Membran besitzt eine sehr glatte, hügelige und kompakte Oberflächenstruktur. Es zeigt sich, dass die feine Netzwerkstruktur durch diesen Trocknungsprozess zerstört wird. Hierdurch kann auch die geringe Rückquellbarkeit der getrockneten Membran erklärt werden.

### 5.1.9 Zusammenfassung

Die auf mikrobiologischem Weg hergestellte Bakteriencellulose zeigte sich in medizinischen Studien als hervorragend, für die Behandlung verschiedener Wundtypen, geeignet. Seit Ende 2004 ist ein kommerzielles Produkt aus Bakteriencellulose (Xcell) erhältlich. Diese Wundauflagen zeigen herausragende Eigenschaften bei der Versorgung von Spalthautentnahmewunden und Brandwunden.

Durch die mikrobiologische Erzeugung der Bakteriencellulose an der Grenzfläche zwischen dem Nährmedium und dem Luftsauerstoff mit dem gram negativen Bakterium *Acetobacter xylinum* wird direkt die Membran erzeugt. Durch die Wahl der Zusammensetzung des Nährmediums, der Temperatur und des Bakterienstammes kann sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch die Transparenz der Membranen stark verändert werden. Die BC-Membranen zeigen je nach Aufarbeitungsprozess bzw. Trocknungsprozess eine stark unterschiedliche Morphologie. Durch Gefriertrocknung der Bakteriencellulose-Membran entsteht eine faserartige Struktur wobei die Netzwerkmaschen einen Durchmesser von ca. 0,5 µm aufweisen. Durch ein Trocknen bei 60 °C entsteht ein kompakter, milchig-weißer Cellulosefilm. Durch Anordnung der Cellulosefäden zu einen kompakten Film, wird die Gasdurchlässigkeit dieser Membranen im Gegensatz zu den gefriergetrockneten, um den Faktor 47 (für Sauerstoff) herabgesetzt. Durch den Trocknungsprozess wird außerdem die Quellfähigkeit der bei 60 °C getrockneten Membranen stark herabgesetzt. Die einzelnen Cellulosefibrillen liegen näher aneinander und bilden über Wasserstoffbrückenbindungen einen kompakten Film. Hierdurch werden auch die Netzwerkstrukturparameter der Membranen stark beeinflusst. Für den Einsatz der Bakteriencellulose-Membranen in der Wundheilung ergeben sich durch die unterschiedliche Morphologie der Membranen in Abhängigkeit des Trocknungsprozesses verschiedenen Einsatzgebiete. Eine „never dried“ BC-Membran besitzt einen sehr hohen Wassergehalt (ca. 98 %) und eignet sich z.B. um nekrotische Beläge die häufig bei chronischen Wunden vorkommen aufzuweichen. Diese können dann wesentlich leichter durch ein scharfes Wund-Debriment Entfernt werden. Bei 60 °C getrocknete BC-Membranen die einen kompakten Film bilden zeigen, trotz der geringeren Permeationsfähigkeit gegenüber gefriergetrockneten BC-Membranen, bei der Versorgung von Spalthautentnahmewunden hervorragende Ergebnisse.

Eine heterogene Modifizierung der BC-Membranen mit Dienen oder Dieneophilen zwecks nachträglichen Einfügen einer Seitengruppe, mittels einer Diels-Alder-Reaktion, ist unter

Erhalt der Membranstruktur nicht möglich. Durch die hierzu notwendige vorherige Aktivierung der Bakteriencellulose mit Natronlauge zu Alkalicellulose wird die Feinstruktur der Bakteriencellulose zerstört. Dies führt zu einer sehr starken Schrumpfung der Membran, die bei diesem Prozess auch weitere Materialeigenschaften (wie z.B. die Flexibilität) einbüßt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Modifizierung der  $\alpha$ -D-Glucose, die als Kohlenstoffquelle für den Aufbau der Cellulose im Nährmedium dient, die BC-Membran mit Dienen modifiziert werden kann. Hierbei führte lediglich der Einsatz von 3-O-(2-Furanat)- $\alpha$ -D-glucofuranose in verschiedenen Konzentrationen in der Nährlösung zur mikrobiologischen Erzeugung einer Membran. Durch Zugabe von 3-O-Acrylat-D-glucofuranose in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zu der Nährlösung ließ sich keine Bakteriencellulose erzeugen, was vermutlich auf die sehr reaktive Doppelbindung zurückzuführen ist.

Diese Form der Modifizierung der Bakteriencellulose ist durch die aufwendige regiospezifische Synthese der Glucose und die anschließende mikrobiologische Erzeugung, bei der nur ein geringer Teil (ca. 7,5 %) der modifizierten-Glucose zur modifizierten-Cellulose umgesetzt wird, sehr kostenintensiv. Hierdurch eignet sich dieses Verfahren nicht für die kostengünstige Herstellung von Bakteriencellulose, die mit Dienen oder Dienophilen modifiziert werden kann.

## 5.2 Symplexmembranen

Symplexmembranen werden durch eine spontane Grenzflächenreaktion zwischen den wässrigen Lösungen eines Polyanions und Polykations hergestellt. Symplexmembranen quellen sehr stark in wässrigen Systemen. Das Wasseraufnahmevermögen beträgt bis zum 40-fachen der Ausgangsmasse. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass Symplexmembranen hervorragende Trenneigenschaften gegenüber wässrigen alkoholischen Systemen aufweisen. Hierbei konnte insbesondere gegenüber Isopropanol eine hohe Selektivität bei einem gleichzeitigen hohen Durchgangsvermögen erreicht werden. Zur Herstellung der Symplexe werden unbedenkliche Ausgangskomponenten genutzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das erhaltene ionogene Netzwerk keinerlei toxische Eigenschaften aufweist. Hieraus ergeben sich einige potentielle Vorteile für die Versorgung von Wunden.

- 
- Barrierefunktion (Schutz gegen pathogene Keime)
  - hoher Wundflüssigkeitstransport
  - durch hohes Wasseraufnahmevermögen wird die Wunde feucht gehalten.
  - hochtransparent (optische Kontrolle der Wunde möglich)
  - vermutlich physiologisch unbedenklich
  - sehr hoher Gasaustausch ( $O_2$ ;  $N_2$ ;  $CO_2$ )

Ein Nachteil der Symplexmembran ist ihre sehr geringe mechanische Belastbarkeit insbesondere im gequollenen Zustand. Durch eine Verletzung der Membran könnte sonst die Barrierefunktion gegenüber pathogenen Keimen zerstört werden. Es muß für die Applikation der Membranen aus Wundauflagen ein Trägermaterial in die Membranen eingebracht werden um die mechanische Belastbarkeit zu erhöhen. Hierzu eignen sich z.B. Textilien natürlichen oder synthetischen Ursprungs, die dann die mechanische Stabilität maßgeblich beeinflussen. Symplexmembranen wurden trotz Ihres Potentials bis heute nicht für die Wundheilung eingesetzt.

### 5.2.1 Herstellung

Symplexmembranen können durch eine spontane Grenzflächenreaktion zwischen den wässrigen Lösungen der Ausgangskomponenten hergestellt werden. In diesem Fall wurden die Membranen durch eine Oberflächenreaktion der Polyelektrolytlösungen synthetisiert. Mit diesem Verfahren der Fällformation können Membranen ohne Einsatz organischer Lösungsmittel mit gleichmäßiger Schichtdicke erhalten werden. Die Membranbildung erfolgt durch ein wechselseitiges Ineinanderdiffundieren der Reaktionspartner, wobei sich der im Reaktionsmedium unlösliche Symplex ausbildet. Dieser Vorgang läuft sehr schnell und weitreichend ab, so dass ein großflächiges, mechanisch stabiles Gebilde entstehen kann.

Die Eigenschaften der Membranen sind sowohl von den eingesetzten Komponenten als auch von den Reaktionsbedingungen abhängig [176].

---

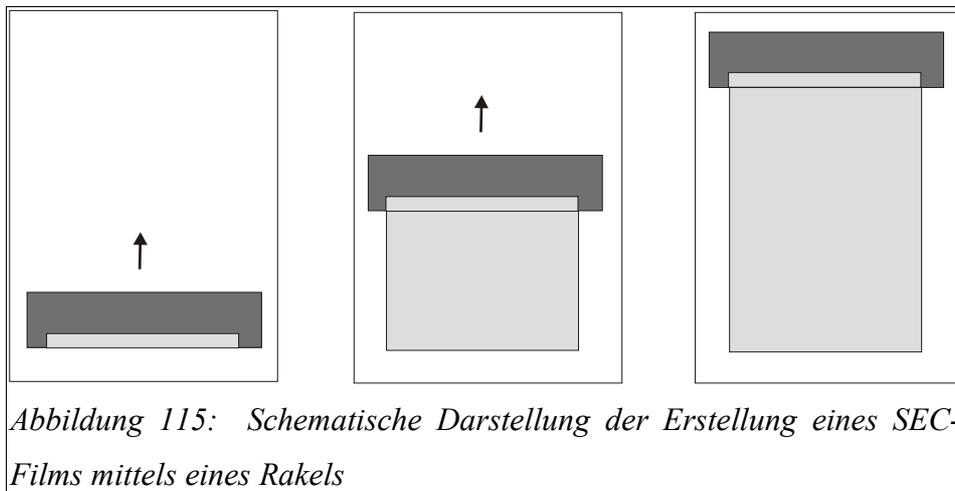
[176] DD 270012 A1, Verfahren zu Herstellung von Membranen aus Polyelektrolytkomplexen, Dauzenberg H., (1989)

**Laborsynthese:**

Für die Herstellung der Membranen wird zunächst die Sulfoethylcellulose in Wasser und das Chitosan in einer 0,75 % Essigsäurelösung gelöst. Nicht gelöste Bestandteile der Ausgangsverbindungen werden durch filtrieren durch eine Glasfilterfritte (P1) von der Lösung abgetrennt.

Die Sulfoethylcellulose-Lösung (Polyanion) (3-4 %) wird mit einem Rakel, der eine gleichmäßige Schichtdicke gewährleistet, auf eine absolut fettfreie Glasplatte gestrichen.

Die bestrichene Glasplatte wird anschließend in die Polykationische-Lösung, 0,5 % Chitosan in einer 0,75 % Essigsäurelösung oder 0,5 % Poly-DADMAC in Wasser, gelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Verwirbelungen auftreten, die den durchgängigen Sulfoethylcellulose-Film zerstören würden. Nach 30-60 min. hat sich die Membran gebildet.



Nach Herausnahme aus dem Reaktionsbad und gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser wird die Membran auf eine PE-Folie überführt. Sonst würde beim Trocknen bei Raumtemperatur die Membran an der Glasplatte festkleben und nicht mehr von ihr entfernt werden können. Das Wechseln der Grundlage stellt ein Problem dar, da die Membran sehr empfindlich ist und aufgrund der mechanischen Einwirkungen sehr leicht zerreißt.

Um die Membran auf die PE-Folie zu überführen wird die Membran leicht vorgetrocknet. Auf diese Membran wird die PE-Folie gelegt. Die Membran bleibt jetzt an der PE-Folie „haften“ und kann so rückstandsfrei von der Glasplatte abgezogen werden.

Anschließend wird die Symplexmembran bei Raumtemperatur getrocknet. Im getrockneten Zustand ist die Symplexmembran leicht trübe und „knistert“ bei Bewegung. Sie ist im Gegensatz zum feuchten Zustand relativ stabil und kann gut gehandhabt werden ohne zu zerreißen.



*Abbildung 116: Symplexmembran links feucht auf der „Synthesplatte“, rechts getrocknet*

### **Technische Herstellung:**

Bei der technischen Herstellung von Symplexmembranen wird eine Polyelektrolytlösung auf einen geeigneten Träger gegeben. Als Träger kann saugfähiges Cellulosegewebe verwendet werden, wenn nur die mechanische Stabilität erhöht werden soll ohne die Permeationseigenschaften der Symplexmembran zu verändern. Alternativ kann auch als Träger Polyvinylidenfluorid (PVDF) eingesetzt werden, das die Permeationseigenschaften bezüglich der Selektivität und des Permeatflusses bei wässrigen Alkohol- und Keton-Systemen zusätzlich erhöht [177].

Für die Applikation der Symplexmembranen als Wundauflagen ist eine hohe Selektivität gegenüber wässrigen Alkoholsystemen nicht relevant. Deshalb kann ein kostengünstiger Träger aus einem biovertäglichen Material eingesetzt werden. Hierfür kommen unter anderem Gewebe oder Fasern aus Cellulose, Viskose, Seide, Nylon, Wolle, Polyurethan, und Polyester in Betracht.

Eine der entgegengesetzt geladenen Polyelektrolytlösungen wird auf einen geeigneten Träger

[177] Scharnagl N.; Peinemann K.-V.; Wenzlaff A.; Schwarz H.-H.; Behling R.-D.; Dehydration of organic compounds with SYMPLEX composite membranes, *Journal of Membrane Science*, (1996), 113(1), S. 1-5

aufgerakelt und anschließend durch die andere Polyelektrolytlösung gezogen. Hierbei bildet sich nun der Symplex auf dem Trägermaterial aus. Durch eine wiederholte Anwendung können gegebenenfalls auch dickere Symplexe auf dem Träger erzeugt werden. Die so hergestellte Symplexmembran wird in Wasser gewaschen um nicht reagierte Bestandteile aus der Symplexmembran zu entfernen. Diese wird anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

## 5.2.2 Symplexbildungsverhalten

Es wurden aus fünf verschiedenen Sulfoethylcellulosen mit Chitosan und Poly-DADMAC eine Reihe von Symplexmembranen hergestellt. Vorrausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Konzentration von 2-3 % der Sulfoethylcellulose in dest. Wasser für die Symplexbildung einen ausreichend viskosen Film auf der Syntheseplatte bildet und des weiteren ein Optimum für die Diffusion der Komponenten ineinander darstellt. Die Konzentration des verwendeten Polykations, das im Reaktionsbad im Überschuss vorliegt, hat kaum einen Einfluss auf die Struktur und Permeationseigenschaften der Symplexmembran [178]. Es wurde bei der Herstellung eine 2-3 % Sulfoethylcellulose mit einer Schichtdicke von 0,25 mm und 0,5 mm auf die Syntheseplatte aufgerakelt. Diese so beschichtete Platte wird anschließend in eine 0,5 % Lösung des Polykations gegeben. Bei der Verwendung von Chitosan als Polykation wurde eine 0,5 % Essigsäure verwendet. Aufgrund der verschiedenen Molmassen und Ladungsdichten der verwendeten Proben konnte nicht mit jeder Ausgangsverbindung eine zufriedenstellende Membran hergestellt werden. Die Tabelle 23 gibt die Güte der Membranbildung wieder.

*Tabelle 23: Bildungsverhalten der Chitosan-Sulfoethylcellulose Membranen bei Verwendung einer 3 % Sulfoethylcellulose die bei ca. 25 °C für 20 min. in ein Polykationen Tauchbad gegeben wurde.*

<b>SEC</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Chitosan 1	++	++	+	++	++
Chitosan 2	++	++	+	+	++
Chitosan 3	0	0	-	-	0

[178] Lukás J., et. al., Surface characterization of polyelectrolyte complex membranes based on sodium cellulose sulfate and poly(dimethyldiallylammonium chloride), J. Membr. Sci., 106 (3), (1995), S. 281-288

<i>SEC</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Chitosan 4	o	-	o	o	o
Chitosan 5	+	+	o	+	+
Chitosan 6	+	+	o	+	+
Chitosan 7	+	+	+	+	+
Chitosan 8	+	o	o	o	+
Chitosan 9	o	o	o	o	o
Chitosan 10	+	+	+	+	+
Chitosan 11	+	+	+	+	+
Chitosan 12	++	++	+	++	++
Chitosan 13	++	++	++	++	++

++: sehr gute Membranbildung, +: gute Membranbildung, o: reagiert nicht vollständig, -: keine Membranbildung

Das Bildungsverhalten von Chitosan-Sulfoethylcellulose- gegenüber Poly-DADMAC-Sulfoethylcellulose-Symplexmembranen ist generell wesentlich schlechter hinsichtlich der Dicke und Reißfestigkeit der entstandenen Membran. Dies kann unter anderem an der Verwendung einer essigsäuren Chitosanlösung liegen. Durch den sauren pH-Wert in dem polykationischen Tauchbad wird die Ladungsdichte des Sulfoethylcellulosefilms durch Rückprotonierung der Sulfonsäure herabgesetzt. Hierdurch wird die Symplektion zwischen Polykationen und Polyanionen herabgesetzt, was wiederum zu z.B. dünneren Membranen führt.

Das schlechtere Bildungsverhalten bei Verwendung der Chitosan-Proben 3 und 4 ist auf die hohe Molmasse und die damit verbundene geringere Diffusion dieser Chitosane zurückzuführen. Es zeigte sich des Weiteren, dass eine geringe Molmasse des Chitosans (10-13) durch die bessere Diffusion der anionischen und kationischen Polymerketten ineinander zu einem besseren Bildungsverhalten führt.

<i>SEC</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
P-DADMAC 1	++	++	++	++	++
P-DADMAC 2	++	++	+	+	++

*Tabelle 24: Bildungsverhalten der Poly-DADMAC-Sulfoethylcellulose Membranen bei Verwendung einer 3 % Sulfoethylcellulose die bei ca. 25 °C für 20 min. in ein Polykationen Tauchbad gegeben wurde.*

Wie oben bereits erwähnt, ist das Bildungsverhalten von Poly-DADMAC-Sulfoethylcellulose Symplexmembranen wesentlich besser als bei der Verwendung von Chitosan als polykationische Komponente (siehe auch Tabelle 24). Dies kann zum einen an der chemischen Struktur des Poly-DADMAC's liegen, zum anderen wird bei der Herstellung in einem pH-neutralen Medium gearbeitet. Hierdurch liegt an der Sulfoethylcellulose eine höhere Ladungsdichte vor.

### 5.2.3 Verstärkung der Symplexmembra

Da die Symplexmembra im feuchten Zustand mechanisch nicht ausreichend belastbar ist, wurde eine Verstärkung in die Membra eingebracht.

Für die mechanische Verstärkung kamen Gewebefasern in Betracht, die unelastische oder elastische Eigenschaften aufweisen. Als unelastisches Gewebe wurde eine Mullbinde der Firma Lohmann gewählt. Als elastisches Gewebe wurde Elastomull® von der Firma Beiersdorf gewählt.

Diese beiden Gewebe wurden mit einer SEC-Lösung bestrichen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in dem Gewebe enthalten sind. Diese getränkten Gewebestücke werden für ca. 60 min in eine 0,5 % Chitosanlösung gegeben. Anschließend wird die so erhaltene Membra in dest. Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.



Abbildung 117: Verstärkte Symplexmembra von links: Elastomull® trocken, Mullbinde trocken, Elastomull® feucht, Mullbinde feucht

Bei der Mullbinde der Firma Lohmann sind im trockenen Zustand einige Löcher in der Membran zu beobachten. Im gequollen Zustand schließen sich diese Löcher jedoch, da die Membran in wässrigen Medien stark quillt (Abbildung 117).

Bei Elastomull® (Beiersdorf) sind elastische Fasern in die Binde eingewebt. Dadurch ist es möglich, diese auf ca. das Doppelte der normalen Länge auszuziehen. In feuchtem Zustand kann diese Binde bis zur maximalen Dehnbarkeit ausgezogen werden ohne das die Membran Schäden davon trägt (Abbildung 118).



*Abbildung 118 : verstärkte Membran im gedehnten Zustand*

#### **5.2.4 Herstellung von Dien modifizierten Symplexmembranen**

Um die hier hergestellten Membranen mit Dienen oder Dienophilen zu versehen bieten sich verschiedene Verfahren an. Bei der Herstellung von Symplexmembranen kann z.B. ein vorher derivatisiertes Polymer eingesetzt werden.

Für die Derivatisierungen des Chitosans mit Dienen und Dinophilen wurde aufgrund des guten Symplexmembran Bildungsverhalten von niedermolekularen Verbindungen Chitosan-Proben mit niedrigem Molekulargewicht eingesetzt.

Die mit Dienen oder Dienophilen modifizierte Symplexmembran wird prinzipiell genauso wie die herkömmliche Symplexmembran hergestellt. Es wird jedoch als Polykation ein z.B.

Furan-modifiziertes Chitosan Derivat für die Synthese der Membran eingesetzt. Insbesondere die hoch modifizierten Symplexmembranen schillern opalisierend im Licht (Abbildung 119).



*Abbildung 119: Mit Dienen modifizierte Symplexmembran aus SEC 1 und Chitosanfuranamid.*

Die regiospezifisch an der 6-Position modifizierten Chitosane zeigen hierbei einen wesentlich bessere Symplexbildung. Durch die regiospezifische Substituion bleibt die polykationische Gruppe ( $-\text{NH}_3^+$ ) an der 2-Position erhalten und kann ionische Verknüpfungen mit dem Polyanion eingehen. Die an der 2-Position modifizierten Verbindungen haben zumindest einen Teil ihrer Ladungsdichte verloren und zeigen hierdurch ein wesentlich schlechters Symplexbildungsverhalten. Das bedeutet, dass sich nur dünne Symplexmembranen herstellen lassen die Ihre mechanische Stabilität durch ein starkes Aufquellen in einen wässrigen Medium fast vollständig verlieren.

### **5.2.5 Quellung**

Wird ein Netzwerksystem einem Quellungsmedium ausgesetzt, erfährt es aufgrund der Potentialdifferenz des chemischen Potentials zwischen dem Netzwerk und Lösung einen Volumenänderung. Dieser Prozess, der von einem Austausch an Lösungsmittelmolekülen und darin gelösten niedermolekularen Anteilen begleitet wird, läuft bis zum Ausgleich dieser Potentialdifferenz ab. Netzwerke lassen sich nur begrenzt aufweiten, da die Erzeugung von elastischen Spannungen bzw. Rückstellkräften einen zur Volumenänderung gegenläufigen Prozess bewirkt. Aus der Bestimmung der Masse bzw. des Volumens der Membran vor und

nach dem Quellungsvorgang ergibt sich nach Gleichung 49 der Quellgrad Q:

$$Q = \frac{(M_{\text{gequollen}} - M_{\text{trocken}})}{M_{\text{trocken}}}$$

Gleichung 49

Die Permeabilität der Membranen ist vom Quellgrad abhängig, da dieser als ein Maß für die Aufnahmefähigkeit der Komponenten angesehen werden kann. Löst sich ein Lösungsmittel gut in der Membran, was mit einer Quellung verbunden ist, so trägt dies positiv zur Permeabilität bei.

Zur Bestimmung der maximalen Quellbarkeit wurden die Symplexmembranen für 5 min. in dest. Wasser gegeben und die Massen- und Volumenzunahme bestimmt (Tabelle 25).

<i>SEC</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Chitosan 1	12	17	15	14	16
Chitosan 2	15	15	17	15	14
Chitosan 3	24	28	26	25	27
Chitosan 4	24	23	22	19	21
Chitosan 5	10	22	23	21	20
Chitosan 6	-	-	-	-	-
Chitosan 7	32*	34*	31*	30*	32*
Chitosan 8	40*	45*	41*	42*	41*
Chitosan 9	35*	38*	37*	33*	34*
Chitosan 10	14	18	15	15	18
Chitosan 11	12	16	12	16	17
Chitosan 12	11	15	14	14	18
Chitosan 13	7,9	13,4	12,6	10,4	8,1
P-DADMAC 1	3,4	4,1	2,0	3,2	2,8
P-DADMAC 2	5,2	8,1	6,8	3,9	4,2

Tabelle 25: Quellgrade der Symplexmembranen nach 5 min. in dest. Wasser.

Die mit einem Sternchen (\*) versehen Quellgrade zeigen Symplexmembranen, die eine so geringe mechanische Stabilität im gequollenen Zustand aufweisen, dass diese bei geringster

mechanischer Beanspruchung zerfallen. Bei Chitosan 6 handelt es sich um fein gemahlenes Chitosan 5, dass für die Symplexherstellung nicht verwendet wurde.

Es ist zu beobachten, dass die einzelnen Membranen sehr unterschiedlich stark quellen. Die Membranen der kürzerkettigen Proben weisen geringe Quellgrade um 200 % auf, wogegen die Quellgrade der längerkettigen Proben bis zum 40 fachen reichen.

Die Quellfähigkeit der Symplexe überstreichen einen weiten Bereich. Es können Zusammenhänge mit den molekularen Parametern der Ausgangsverbindungen gezogen werden.

- Die Quellgrade sind von der Molmasse der eingesetzten Komponenten abhängig. Mit zunehmender Molmasse bzw. Kettenlänge des Polykations nimmt die Quellfähigkeit zu. Es können sich in diesem interpenitrierenden Netzwerk größere Maschen bilden, in die mehr Lösungsmittel aufgenommen werden kann.
- Mit zunehmender Ladungsdichte der Ausgangsverbindungen nimmt der Quellgrad ab. Dies wird insbesondere bei den Chitosanproben 7-9 deutlich bei denen die geringe Ladungsdichte zu einer sehr hohen Quellfähigkeit führt. Diese Änderung könnte in der zunehmenden Kompaktheit der Membranstrukturen mit zunehmenden DS-Wert begründet sein, da mit zunehmender Ladungsdichte die Zahl der Verknüpfungspunkte im Netzwerk ansteigt und einen Quellung damit energetisch ungünstiger wird.

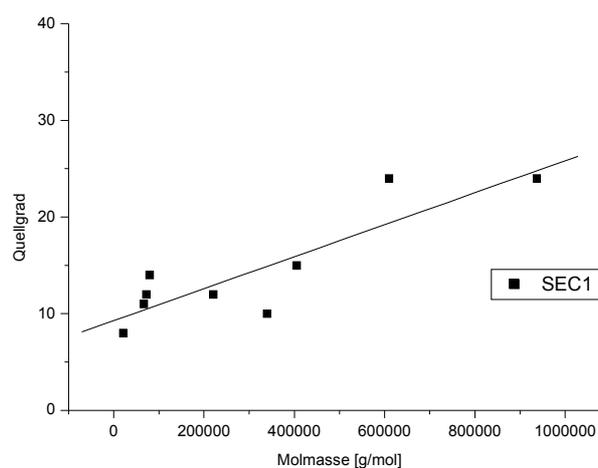
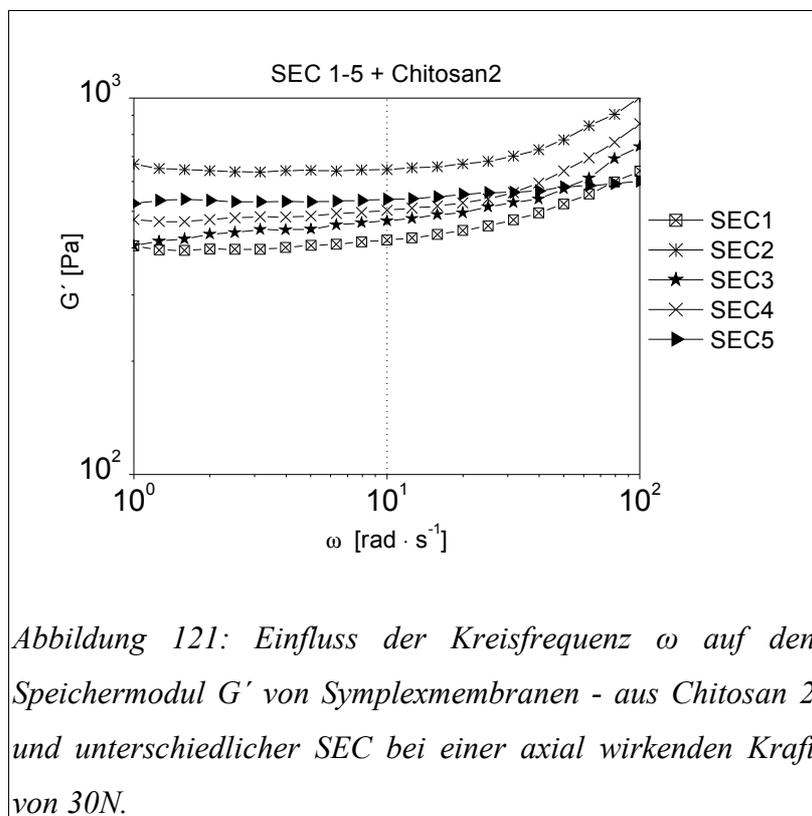


Abbildung 120: Quellverhalten eines Symplexes aus SEC 1 in Abhängigkeit der Molmasse des Chitosans.

In Abbildung 120 sind die Chitosan-SEC1 Symplexmembranen abgebildet. Hierbei wurden die Symplexe aus SEC1 und Chitosan 7-9 wegen der geringeren Ladungsdichte dieser Verbindung und der dadurch schlechten Vergleichbarkeit nicht mit aufgeführt. Es zeigt sich in grober Näherung einen lineare Zunahme des Quellvermögens. Es ist zu erwarten das bei Einsatz sehr kurzkettiger Chitosane die Quellfähigkeit stark abnimmt.

### 5.2.6 Netzwerkstruktur

Symplexe die aus Sulfoethylcellulose als polyanionische Komponente und Chitosan bzw. Poly-DADMAC als polykationische Komponente hergestellt werden, sind aufgrund ihrer hohen Netzpunktdichte und der geringen Dicke nicht im getrockneten Zustand für Schwingungsmessungen zugänglich. Es wurden daher alle Membranen zuvor in Wasser gequollen und diese Membranen im feuchten Zustand vermessen.



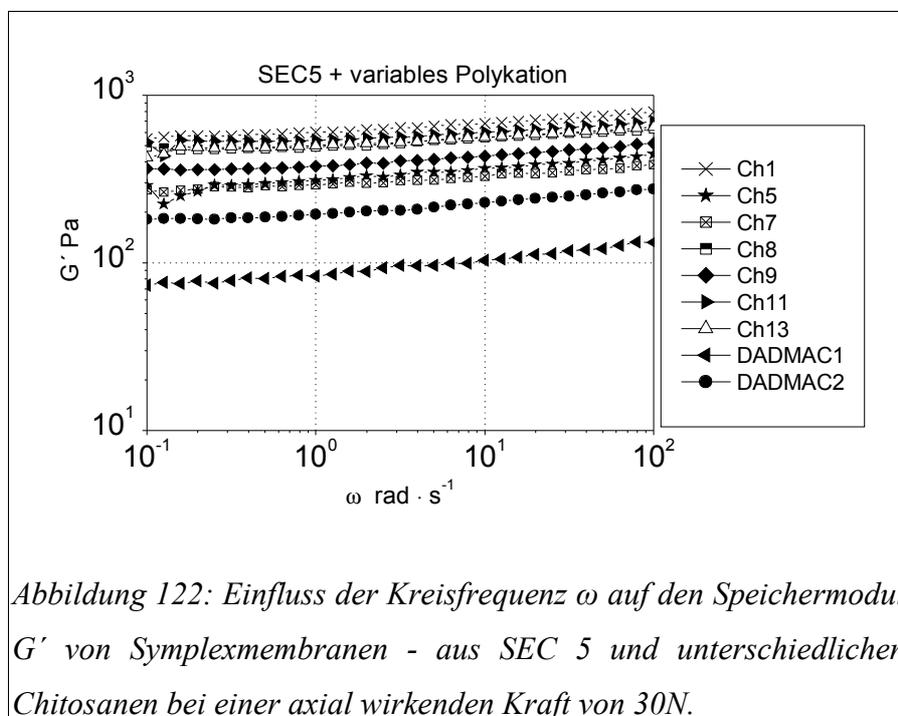
Die Symplexe in Abbildung 121 wurde bei einer axial wirkenden Kraft von 30 N vermessen. Alle Symplexmembranen zeigen eine permanente Netzwerkstruktur über den gesamten

Messbereich. Die deutet auf eine permanente Netzwerkstruktur der Symplexe auch im hochgequollenen Zustand hin.

<i>Chitosan2+</i>	$G'$ [Pa]	$M_e$ [g/mol]	$P_e$	$v_e$ [cm <sup>3</sup> ]	$\xi$ [nm]	Quellung
SEC1	397	385.000	1.810	9,6 E+15	21,8	14,6
SEC2	641	230.000	1.080	1,6 E+16	18,6	15,1
SEC3	435	307.000	1.440	1,1 E+16	21,1	16,7
SEC4	475	305.000	1.430	1,2 E+16	20,5	15,4
SEC5	534	300.000	1.410	1,3 E+16	19,8	13,9

Tabelle 26: Netzwerkstrukturparameter der Symplexe aus Chitosan 2 und variabler SEC

Bei Verwendung eines Polykations mit hoher Molmasse - wie die bei dem verwendeten Chitosan 2 der Fall ist - werden nur geringfügige Veränderung des Netzwerkes und der Quellfähigkeit festgestellt (Tabelle 26). Die Eigenschaften des interpenitrierenden Netzwerkes werden hierbei kaum durch die unterschiedlichen Sulfoethylcellulosen bestimmt. Es wird lediglich eine geringe Abhängigkeit von dem DS-Wert der Sulfoethylcellulose beobachtet.

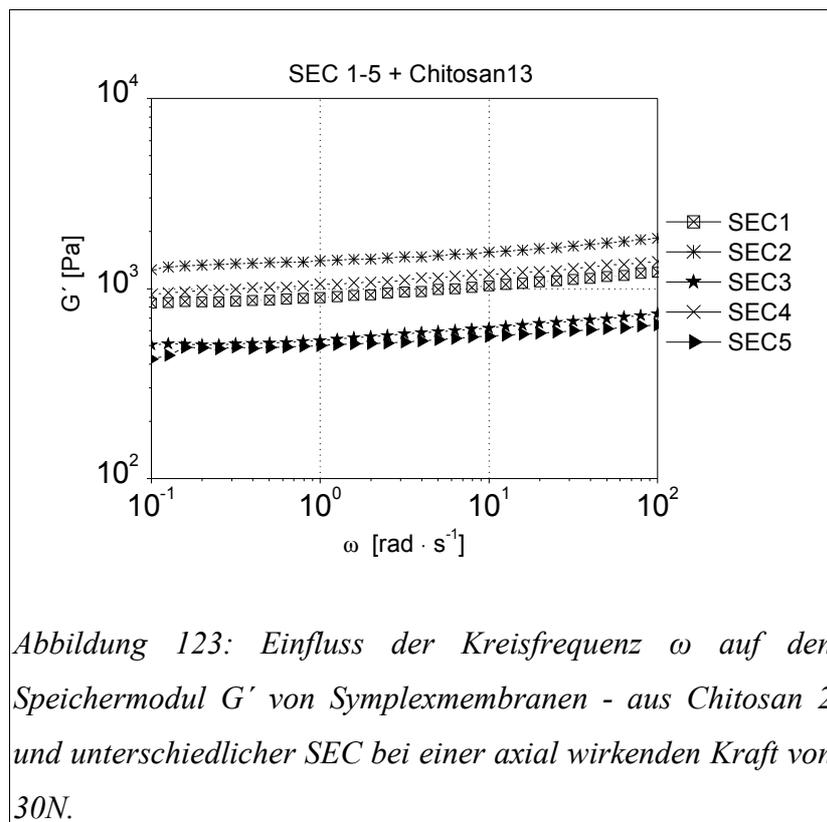


Die Symplexe in Abbildung 122 wurde bei einer axial wirkenden Kraft von 30 N vermessen.

<i>SEC5+</i>	<i>G'</i> [Pa]	<i>M<sub>e</sub></i> [g/mol]	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub></i> [cm <sup>3</sup> ]	<i>ξ</i> [nm]	<i>Quellu</i>
Ch1	299	466.000	2.410	7,3 E+16	24,0	16
Ch5	499	224.000	2.170	1,2 E+17	20,2	20
Ch7	331	211.000	3.620	8,0 E+16	23,2	32
Ch8	602	91.000	2.360	1,5 E+17	19,0	41
Ch9	393	167.000	3.910	9,5 E+16	21,9	34
Ch11	555	236.000	670	1,3 E+17	19,5	17
Ch13	512	587.000	273	1,2 E+17	20,0	8,1
P-DADMAC1	89	8.940.000	42.000	2,2 E+16	35,9	2,8
P-DADMAC2	203	2.112.000	9.920	4,9 E+16	27,3	4,2

*Tabelle 27: Netzwerkstrukturparameter der Symplexe aus SEC 5 und variablem Chitosan.*

Bei Variation des Polykations werden nur geringfügige Veränderung des Speichermoduls festgestellt (Tabelle 27). Die Symplexe, die mit Poly-DADMAC erzeugt wurde zeigen hierbei die stärkste Veränderung auf. Die Speichermodule der Symplexe, die mit Chitosan als Polykation ermittelt wurden weisen nur geringe Unterschiede auf. Durch die unterschiedliche Quellfähigkeit der Symplexe, die durch die Molmasse und den durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad beeinflusst wird, werden stark unterschiedliche Werte für die Verhängungsmolmasse ermittelt. Bei den beiden Symplexen, die aus Poly-DADMAC und Sulfoethylcellulose erzeugt wurden, werden bei Verwendung einer hohen Molmasse auch höhere Werte für den Speichermodul bestimmt.



Alle Symplexmembranen der Abbildung 123 zeigen eine permanente Netzwerkstruktur über den gesamten Meßbereich. Die deutet auf eine permanente Netzwerkstruktur der Symplexe auch im hochgequollenen Zustand hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich auch im hochgequollenen Zustand die Verknüpfungspunkte nicht auflösen.

<i>Chitosan13+</i>	$G'$ [Pa]	$M_e$ [g/mol]	$P_e$	$v_e$ [cm <sup>3</sup> ]	$\xi$ [nm]	Quellung
SEC1	927	305.000	308	2,3 E+16	16,4	7,9
SEC2	1.432	116.000	193	3,5 E+16	14,2	13,4
SEC3	558	317.000	480	1,4 E+16	19,5	12,6
SEC4	1.078	199.000	248	2,6 E+16	15,6	10,4
SEC5	515	534.000	485	1,3 E+16	20,0	8,1

Tabelle 28: Netzwerkstrukturparameter der Symplexe aus Chitosan 13 und variabler SEC

Es zeigt sich bei dem eingesetzten niedermolekularen Chitosan eine nur geringe Beeinflussung der Netzwerkstruktur (Tabelle 28). Durch die Verwendung von niedermolekularem Chitosan kommt es zu einer vergleichsweise geringen Quellung des

Netzwerkes.

Die kurzen Polymerketten müssen sich bei der Membranbildung stärker annähern und durchdringen einander besser, wodurch der Abstand der Verschlaufungen und Netzwerkpunkten abnimmt.

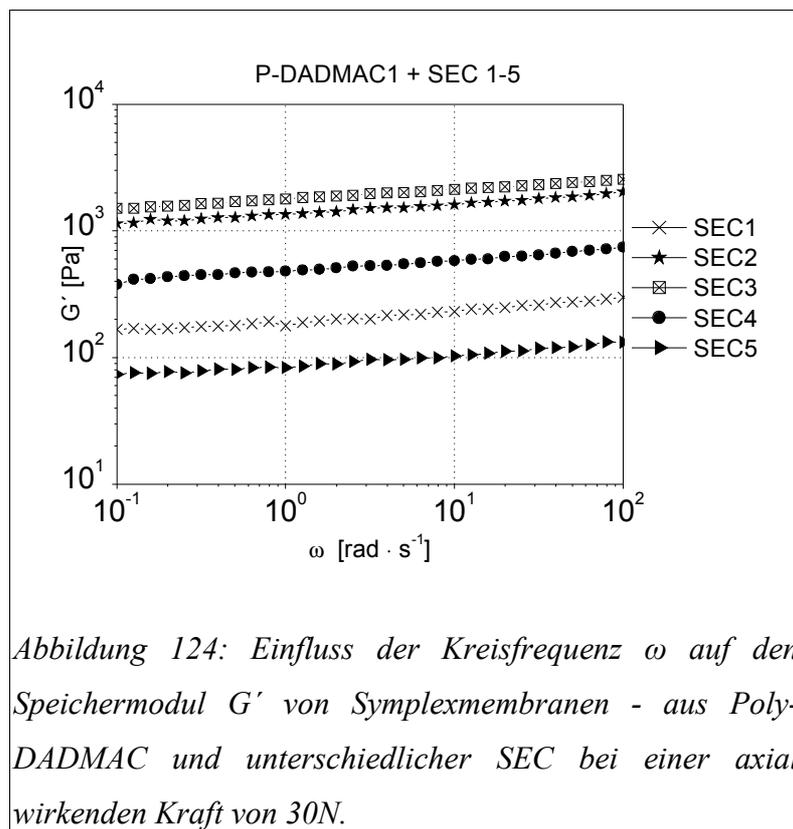


Abbildung 124: Einfluss der Kreisfrequenz  $\omega$  auf den Speichermodul  $G'$  von Symplexmembranen - aus Poly-DADMAC und unterschiedlicher SEC bei einer axial wirkenden Kraft von 30N.

Alle Symplexmembranen zeigen eine permanente Netzwerkstruktur über den gesamten Meßbereich. Dies deutet auf eine permanente Netzwerkstruktur der Symplexe auch im hochgequollenen Zustand hin, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich auch im hochgequollenen Zustand die Verknüpfungspunkte nicht auflösen (Abbildung 124).

<i>DADMAC 1</i>	<i>G' [Pa]</i>	<i>M<sub>e</sub> [g/mol]</i>	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub> [cm<sup>3</sup>]</i>	<i>ξ [nm]</i>	<i>Quellung</i>
SEC1	1994	238.722	1.120	4,8E+16	12,7	3,4
SEC2	535	847.439	3.980	1,3E+16	19,7	4,1
SEC3	1517	542.621	2.550	3,7E+16	13,9	2,0
SEC4	215	2.129.597	10.000	5,2E+15	26,7	3,2
SEC5	89	8.940.000	42.000	2,2E+16	35,9	2,8

*Tabelle 29: Netzwerkstrukturparameter der Symplexe aus Poly-DADMAC 1 und variabler SEC.*

Es zeigt sich bei dem eingesetzten Poly-DADMAC1, bei dem es sich um eine polykationische Verbindung mit einer äußerst geringen Molmasse ( $M_n$ ) von nur ca. 8.000 g/mol handelt, eine stärkere Beeinflussung der Netzwerkstruktur (Tabelle 29). Durch die Verwendung von solchen Polymeren mit einer sehr hohen Ladungsdichte wie es beim Poly-DADMAC der Fall ist, entstehen in der Symplexmembran kristalline Bereiche, die auch optisch durch eine Eintrübung der Membran festgestellt werden können. Hierbei sind die Polykationischen Ketten zu kurz um ein interpenetrierendes Netzwerk auszubilden. Die Polykationen lagern sich vielmehr an die SEC an und wirken außerdem als Verknüpfungspunkte zwischen der SEC. Es kommt daher nur zu einer geringen Quellfähigkeit dieser Symplexe. Durch den geringen Beitrag der Polykationen an dem Symplex Netzwerk kommen die Eigenschaften der SEC bei der Membranbildung stärker zum Tragen, so dass unterschiedliche Werte für die Speichermodule ermittelt werden.

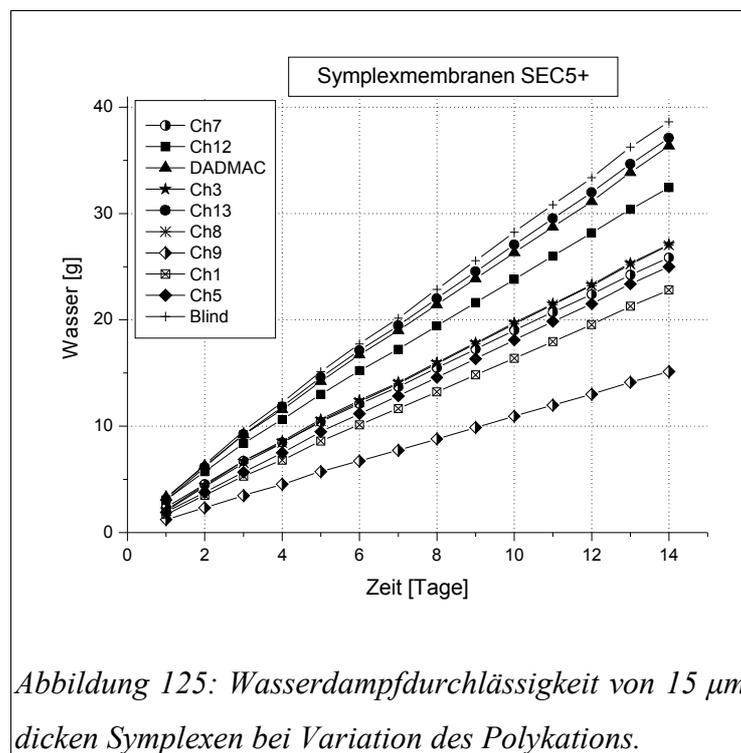
Hieraus resultieren sehr hohe Werte für die Verhängungsmolmasse, da die Polykationen die sich an die SEC angelagert haben nicht erfasst werden können. Nur die Verknüpfungen zwischen den ansonsten mit Polykationen belegten SEC Molekülen bzw. Clustern können erfasst werden.

Die Molmasse bzw. Clusterbildungsneigung und die Ladungsdichte der SEC hat einen Einfluss auf die Verhängungsmolmasse.

### **5.2.7 Permeabilität der Symplexmembranen**

Vorhergegangene Untersuchungen von Kulicke et. al. an Symplexmembranen hat gezeigt, dass diese eine hohe Selektivität gegenüber wässrigen Alkoholsystemen bei einem hohen Permeatfluss aufweisen. Die Gasdurchlässigkeit und der Wasserdampftransport wurden

bislang jedoch nicht untersucht. Die Netzwerkstrukturparameter der Symplexmembranen können durch die Ladungsdichte und die Molmasse bzw. die Lösungsstruktur beeinflusst werden. Es wurden alle verwendeten Symplexmembranen auf eine Dicke von 15  $\mu\text{m}$  normiert, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu haben. Es wurde zunächst die Wasserdampfdurchlässigkeit in Abhängigkeit des verwendeten Polykations untersucht. Hierzu wurde eine 3 % Lösung aus Sulfoethylcellulose (SEC5) mit einer 0,5 % Lösung des Polykations 30 Minuten umgesetzt.

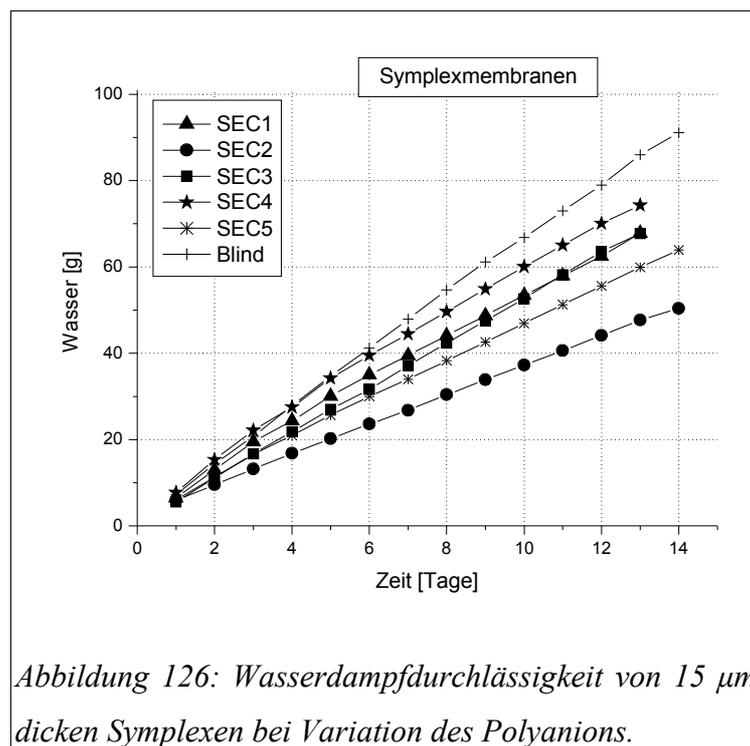


In Abbildung 125 wurde die Sulfoethylcellulose 5 mit Chitosan unterschiedlicher Molmasse und mit Poly-DADMAC umgesetzt. Hierbei zeigen insbesondere die niedermolekularen Verbindungen mit einer hohen Ladungsdichte (Chitosan 13, Chitosan 12 und Poly-DADMAC) die höchsten Durchlässigkeiten. Chitosan 9 mit einer hohen Molmasse und einer geringen Ladungsdichte zeigt die geringste Durchlässigkeit gegenüber Wasserdampf. Die noch höhermolekulare Chitosanprobe Chitosan 1 mit einer hohen Ladungsdichte zeigt eine höhere Durchlässigkeit als Chitosan 9 mit ähnlicher Molmasse. Anscheinend beeinflusst die Ladungsdichte der Polymere die Wasserdampfdurchlässigkeit stärker als die Molmasse der verwendeten Polykationen. Die Durchlässigkeit wird also durch die Molmasse der verwendeten Chitosane bei konstanter Ladungsdichte verringert. Eine Absenkung der

Ladungsdichte (niedriger Deacetalisierungsgrad) lässt die Durchlässigkeit noch stärker absinken als es durch die Molmasse der Fall ist.

Es muss noch erwähnt werden, dass eine hohe Molmasse und auch eine Reduzierung der Ladungsdichte die Diffusion der Polymere ineinander beim Herstellungsprozess verringern. So entstehen bei gleichen Herstellungsbedingungen dünnere Membranen. Hierdurch wird das geringere Diffusionsvermögen dieser Membranen weitestgehend ausgeglichen und es kommt zu einer Angleichung der Wasserdampfaufnahme die zwischen 85-95 % liegt.

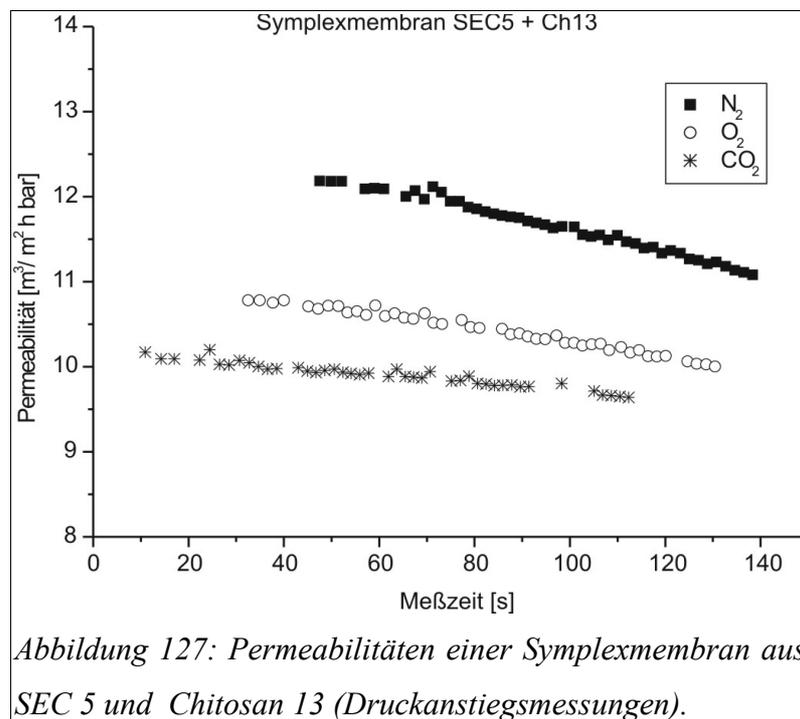
Als nächstes wurde der Einfluss des Polyanions auf die Wasserdampfdurchlässigkeit untersucht. Hierbei werden unterschiedliche 3 % Sulfoethylcelluloselösungen mit einer 0,5 % Chitosan 13 Lösung in 1 % Essigsäure 20 min bei Raumtemperatur in einer Grenzflächenreaktion zur Symplexmembraan umgesetzt.



In Abbildung 126 ist die Wasserdampfdurchlässigkeit für Symplexmembranen aus Chitosan 13 und verschiedenen Sulfoethylcellulosen dargestellt. Die SEC 2 weist das geringste Permeationsvermögen von den in Abbildung 126 untersuchten Membranen auf. Die SEC 4 mit einer kleinen Molmasse und einer hohen Ladungsdichte weist die höchste Durchlässigkeit auf. Bei SEC 1 und SEC 3 kann kein Unterschied für die Durchlässigkeit festgestellt werden.

SEC 5 weist die zweit geringste Durchlässigkeit auf. Das Permeationsvermögen für diese Membranen ist trotz der Unterschiede sehr hoch und liegt zwischen 90-65 %.

Außerdem wurde die Gasdurchlässigkeit (Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid) von Symplexmembranen untersucht. Hierbei wurden Symplexmembranen verwendet, die schon bei den Oszilationsmessungen dargestellt wurden. Hierzu wurde das Verfahren der Druckanstiegsmessung verwendet (Abbildung 127).



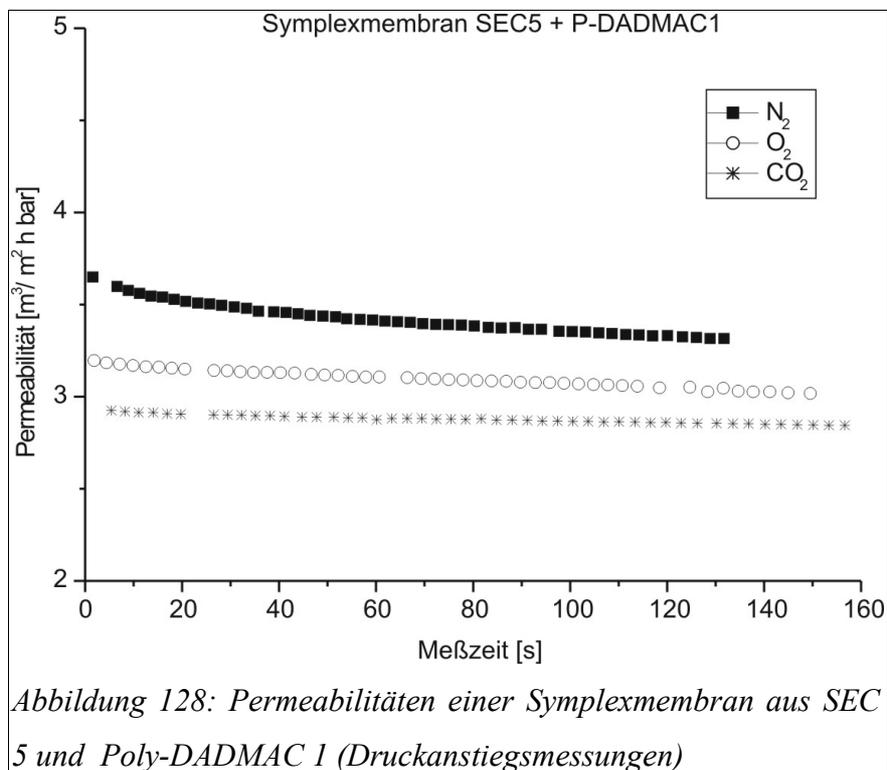
Die ermittelten Permeabilitäten und Selektivitäten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Gas	Permeabilität [ $\text{m}^3/\text{m}^2 \text{ h bar}$ ]	Selektivität
Stickstoff	11,56	-
Sauerstoff	10,19	0,882
Kohlendioxyd	9,39	0,812

Tabelle 30: Übersicht der Permeabilität und Selektivität eines Symplexes (Chitosan 13 und SEC 5).

Es wurden bei der Symplexmembran, die aus SEC 5 und Chitosan 13 hergestellt wurde, einen

sehr hohe Gasdurchlässigkeit gegenüber allen Gasen gefunden. Die Selektivität die in der Tabelle auf den Stickstoff bezogen wurde, ist mit 0,9-0,8 nur schwach ausgeprägt. Es zeigt sich also, dass die untersuchte Symplexmembranen eine sehr hohe Sauerstoffdurchlässigkeit aufweist. Die Gefahr, dass sich bei der Verwendung der Membran in der Wundheilung ein anaerobes Milieu unter der Auflage ausbildet ist somit ausgeschlossen. Ein starkes Aufquellen der Membran aufgrund von Flüssigkeitsaufnahme wird die Gasdurchlässigkeit durch die Erhöhung der Dicke verringern. In diesem hoch gequollen Zustand wird der Gastransport hauptsächlich durch die enthaltenen Flüssigkeit bestimmt. Auch in diesem Zustand ist der Gastransport hoch und es kann zu keinem anaeroben Milieu kommen.



Ein Vergleich der Symplexmembraan aus Chitosan und der Sulfoethylcellulose mit der Symplexmembraan aus P-DADMAC und Sulfoethylcellulose (Abbildung 128) zeigt, dass diese Symplexe über ein geringeres Permeationsvermögen verfügen.

Gas	Permeabilität [m <sup>3</sup> / m <sup>2</sup> h bar]	Selektivität
Stickstoff	3,41	-

Gas	Permeabilität [m <sup>3</sup> / m <sup>2</sup> h bar]	Selektivität
Sauerstoff	3,05	0,90
Kohlendioxyd	2,87	0,84

*Tabelle 31: Übersicht der Permeabilität und Selektivität eines Symplexes (Poly-DADMAC 1 und SEC 5).*

Die Selektivität die in der Tabelle 31 auf den Stickstoff bezogen wurde, ist mit 0,9-0,8 nur schwach ausgeprägt. Trotz der etwas geringeren Durchlässigkeit, weist die untersuchte Symplexmembranen eine sehr hohe Sauerstoffdurchlässigkeit auf. Die Gefahr, dass sich bei der Verwendung der Membran in der Wundheilung ein anaerobes Milieu unter der Auflage ausbildet ist somit ausgeschlossen. Durch die Verwendung eines sehr kleinen Polykation zu Herstellung dieser Symplexe fungierte das Polykation - wie schon bei den Oszilationsmessungen beschrieben - eher als ein Vernetzer. Es kann sich kein interpenitrierendes Netzwerk mehr ausbilden. Dies führt zu einer Verringerung der Gasdurchlässigkeit von ca. 66 % durch diese Membranen.

### 5.2.8 Morphologie der Symplexmembranen

Die Morphologie der Membranen wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) ermittelt. Es wurden Bilder von der Ober- und Unterseite der Membranoberfläche und des Membranquerschnitts aufgenommen.

Die Symplexmembranen zeigen abgesehen von kleinen Partikeln wie sie in Abbildung 129 im Bild Nr. 3 zu sehen sind eine absolut glatte Oberfläche. Da ein Rasterelektronenmikroskop besonders gut Oberflächenstrukturunterschiede aufzeigen kann, wurden aufgrund der mikroskopisch strukturlosen Oberfläche bewusst Kantenstücke der Membran untersucht.

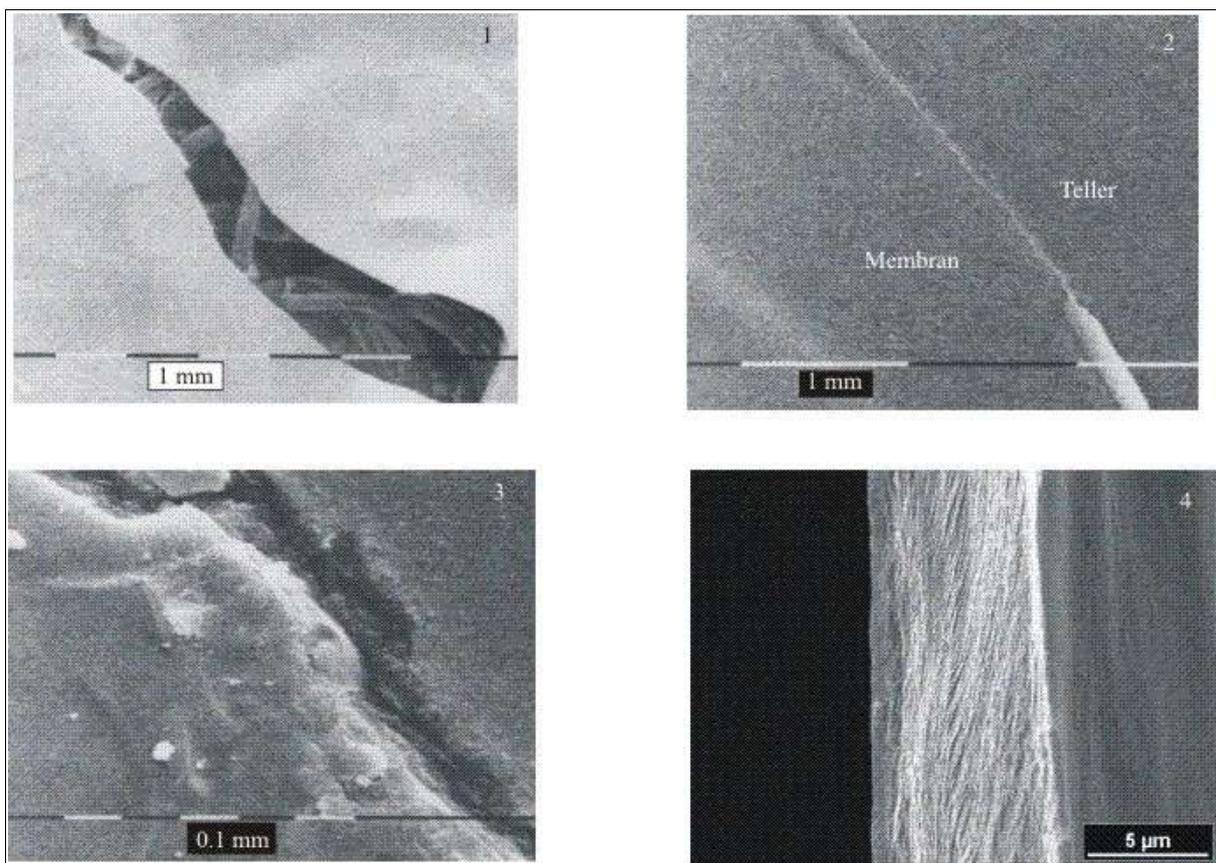


Abbildung 129: Raster-Elektronenmikroskopische-Aufnahmen von der Oberfläche und der Querschnittsfläche einer Symplexmembran (herkömmliche Probenpräparation)

Im Bild 1 der Abbildung 129 ist eine faserverstärkte Symplexmembran dargestellt. Es sind deutlich die einzelnen Fäden der Faserverstärkung zwischen der ansonsten glatten Symplexoberfläche zu erkennen.

Im Bild 2 und 3 ist die Oberfläche einer Symplexmembran in zwei Vergrößerungen (Bild 2 170 fach; Bild 2 1360 fach) dargestellt.

In Bild 4 ist die Querschnittsfläche einer Symplexmembran dargestellt. Die Symplexmembran weist im trockenen Zustand eine homogene, kompakte Struktur auf. Die erkennbaren Rillen sind Strukturmerkmale des Bruchs und kein Indiz für eine poröse Struktur.

Des weiteren wurden Symplexmembranen einer Kryo-Präparation unterworfen und ebenfalls mit Hilfe eines REM untersucht (Abbildung 130 und Abbildung 131).

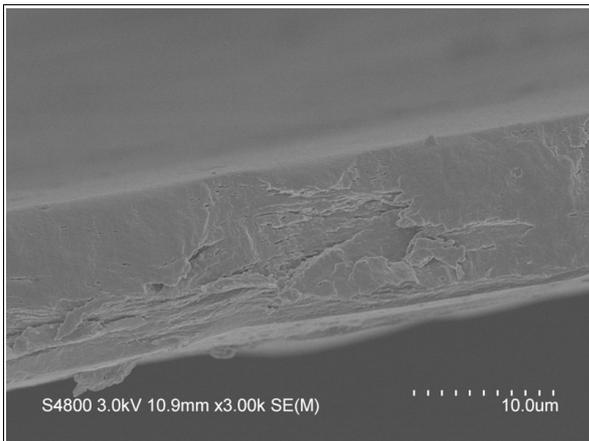


Abbildung 130: Querschnittsfläche eines Symplex (Kryo-Präparation).

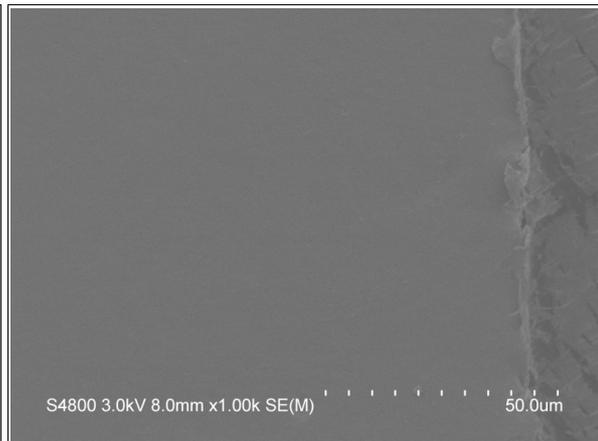


Abbildung 131: Oberfläche eines Symplex (Kryo-Präparation).

Es zeigt sich auch bei den Kryo-Präparierten Symplexmembranen eine homogene, kompakte Membranstruktur. Die starke Quellung der Symplexmembranen in wässrigen Systemen hat also keinen Einfluss auf die Morphologie der Symplexmembran. Im Vergleich mit den herkömmlich präparierten Symplexen zeigt sich hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit kein Unterschied. Es handelt sich auch bei Kryo-Präparierten Proben um sehr glatte Membranoberflächen.

### 5.2.9 Mechanische Eigenschaften

Die Membran muss in der feuchten Wundheilung unter anderem eine Barrierefunktion gegenüber pathogenen Keimen aus der Umwelt darstellen.

Für die Applikation der Membran als Wundauflage muss diese eine gewisse Zugfestigkeit aufweisen, damit die Membran bei der Handhabung nicht beschädigt wird.

Die im folgenden dargestellten Zugbelastungen sind auf MPa (entspricht N/mm<sup>2</sup>) normiert worden.

In Abbildung 132 ist eine Symplexmembran einer kommerziell erhältlichen Wundauflage (Topskin) gegenübergestellt. Die Symplexmembran weist eine nur sehr geringe mechanische Belastbarkeit auf. Durch die ionischen Verknüpfungspunkte in der Symplexmembran ist ein Verschieben der Polymerketten nicht möglich, und es resultiert hieraus eine sehr geringe Deformierbarkeit bis zum Materialbruch.

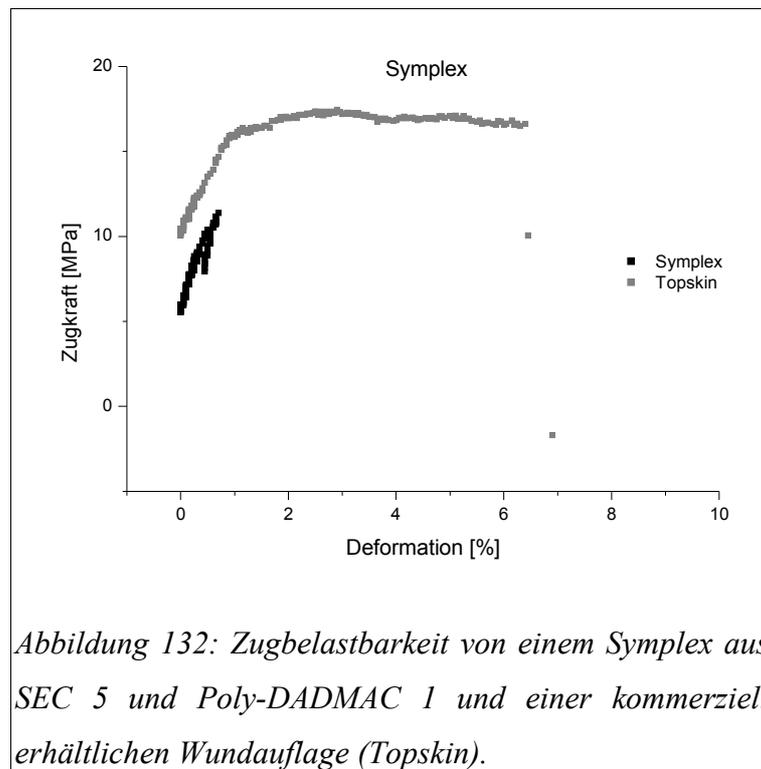


Abbildung 132: Zugbelastbarkeit von einem Symplex aus SEC 5 und Poly-DADMAC 1 und einer kommerziell erhältlichen Wundauflage (Topskin).

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass Symplexmembranen nur eine geringe Dicke von 10-30  $\mu\text{m}$  aufweisen und somit gegenüber mechanischen Belastungen sehr empfindlich reagieren. Eine 1 cm breite Symplexmembran mit einer Dicke von 15  $\mu\text{m}$  würde demnach nur einen Reißfestigkeit von ca. 1,8 N aufweisen. D.h., bei einer Gewichtsbelastung von ca. 180 g würde es zum Bruch kommen. Eine Flüssigkeitsaufnahme in die Symplexmembran führt zu einer starken Quellung des Netzwerkes (bis 40 fach). Hiermit verbunden ist auch eine geringere mechanische Belastbarkeit. Die in Wasser gequollenen Symplexe zeigen eine geringe mechanische Belastbarkeit, hierdurch war es nicht möglich mit dem zur Verfügung stehenden Gerät Zug-Dehnungsuntersuchungen durchzuführen. Durch die sehr geringe Belastbarkeit im gequollenen Zustand (der Symplex erinnert an ein strukturiertes Hydrogel) besteht die Gefahr, dass die durchgehende Membran schon durch geringe Krafteinwirkung beschädigt werden kann und so ihre Schutzfunktion einbüßt. Diese sehr geringe mechanische Belastbarkeit kann durch eine Faser- oder Gewebeverstärkung kompensiert werden. Um die hohe Gastransportfähigkeit der Symplexmembranen nicht zu verändern bieten sich hierzu z.B. Baumwollgewebe oder Cellulosefasern (z.B. Filterpapier) an. Durch den eingebrachten Träger wird die mechanische Belastbarkeit nun maßgeblich durch den Gewebekern beeinflusst.

### 5.2.10 Langzeitstabilitätstest der Symplexmembranen

Die Symplexmembranen sollen nach ihrer Modifizierung als Wundauflagen eingesetzt werden. Da Symplexmembranen zumindest theoretisch gegenüber Salzen, insbesondere höherwertigen Ionen, empfindlich reagieren könnten, wurden mit den Symplexmembranen Stabilitätstests in einer Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung durchgeführt.

Ein ca. 7 cm großes, rundes Stück einer zuvor intensiv gewaschenen Symplexmembran (ca. 2 Tage) (SEC1 + Poly-DADMAC 1) wurde in eine Petrischale gegeben und mit ca. 10 ml einer Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung versetzt. Die verwendeten Ringer- / Ringer-Lactat-Lösungen wurden aus handelsüblichen Infusionsbeuteln entnommen. Die Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung wurde jede Woche gewechselt damit es zu keiner Verkeimung der Lösung kommen konnte. Dieser Stabilitätstest wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt.

Nach diesen 6 Wochen wurde folgendes festgestellt:

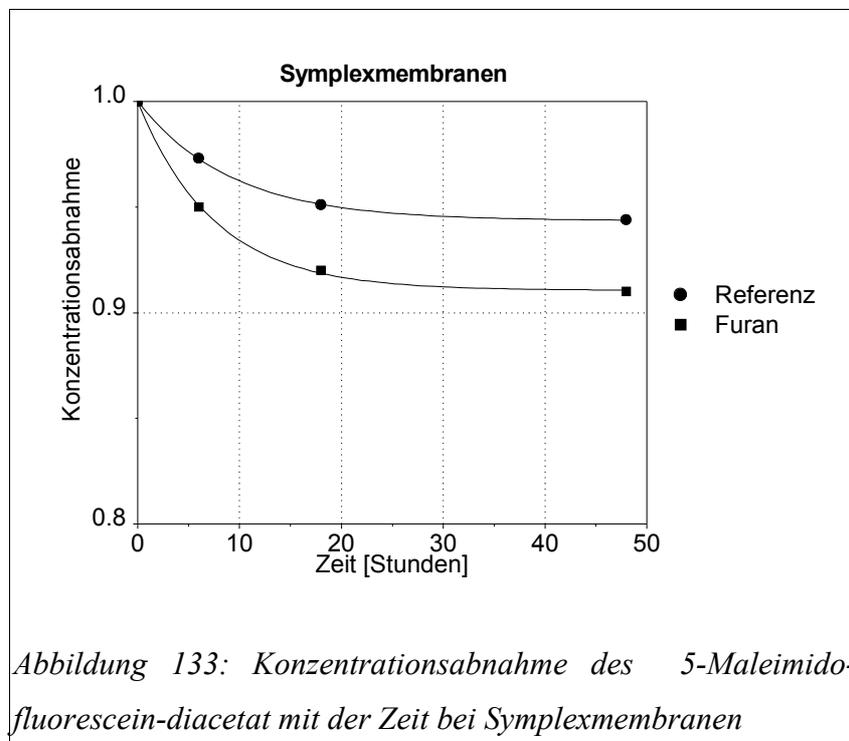
- Kein Masseverlust
- Keine sinnesphysiologischen Änderungen der Membran
- keine Veränderung der Dicke
- keine signifikanten Änderungen der Netzwerkstrukturparameter

Es zeigt sich also, dass die Symplexmembran, unter den Bedingungen wie sie in einer Wunde vorherrschen, keine Veränderungen aufweist.

### 5.2.11 Diels-Alder Reaktionen an Symplexmembranen

Es wurde photometrisch die Konzentrationsabnahme einer 5-Maleimido-fluorescein-diacetat (Dienophil) Lösung untersucht, die mit verschiedenen Furanmodifizierten (Dien) Membranen umgesetzt wurde. Um Adsorptionseffekte des Farbstoffes an der Membran von der Diels-Alder-Reaktion zu unterscheiden, wurden identische Membranen, die nicht zuvor mit Furanen funktionalisiert wurden, untersucht. Im folgenden wird die Konzentrationsabnahme des fluoreszierenden Farbstoffes in Abhängigkeit der Reaktionszeit dargestellt.

Zunächst wurden Furanmodifizierte Symplexmembranen untersucht. Hierzu wurde die Symplexmembran aus Sulfoethylcellulose und einem Chitosan-(2-furanat)-ester (6-Position mit  $DS = 0,36$ ) mit den üblichen Techniken hergestellt. Es entsteht so eine Symplexmembran, bei der die polykationische Komponente mit einem Furan als Dien derivatisiert ist. Als Referenz wurde eine Symplexmembran aus Sulfoethylcellulose und Chitosan verwendet. In Abbildung 133 ist die Konzentrationsabnahme von 5-Maleimido-fluorescein-diacetat bei Anwesenheit von modifizierten Symplexen (Furan) ( $DS = 0,23$ ) und „normalen“ Symplexmembranen abgebildet. Die Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 7.5 beschrieben.



Es zeigt sich, dass sich die Symplexmembran in dem Reaktionsmedium nur geringfügig umsetzen lässt (Abbildung 133). Näheres zur Durchführung siehe Nach 48 Stunden Reaktionszeit kommt es durch Adsorptionsprozesse zu einer Konzentrationsabnahme von ca. 6 % bei der nicht funktionalisierten Membran (Referenz).

Die mit Furanen funktionalisierte Symplexmembran zeigt eine Konzentrationsabnahme von ca. 9 % nach 48 Stunden. Dieser erhöhte Verbrauch an 5-Maleimido-fluorescein-diacetat weist auf eine Diels-Alder-Reaktion an den Membranen hin. Der Umsatz der Reaktion beträgt demnach nur 3 % und ist hiermit außerordentlich gering. Der dargestellte zeitliche Verlauf zeigt eine exponentielle Abnahme der Farbstoffkonzentration, wobei sich nach ca. 20 Stunden

zu >95 % das chem. Gleichgewicht eingestellt hat. Es kommt zu keiner optischen Veränderung der Symplexe. Die sehr geringe Reaktionsfähigkeit bei den funktionalisierten Symplexmembranen kann mit der sehr geringen Quellbarkeit der Membranen in dem verwendeten Lösungsmittelsystem erklärt werden. Durch den Zusatz an Dimethylsulfoxid zur Erhöhung der Polarität des Lösungsmittels wird die hohe Quellfähigkeit (bis 40 fach) der Symplexe verhindert. Hierdurch wird eine Aufweitung der Netzwerkstruktur verhindert, durch die die Reaktionspartner leichter ineinander diffundieren können und somit auch die Möglichkeit zu Reaktion haben. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die furanmodifizierte, polykationische Polymerkomponente durch die polyanionische Komponente, zwischen denen ionische Wechselwirkungen bestehen, für eine Reaktion von außen abgeschirmt wird.

### **5.2.12 Zusammenfassung**

Die Symplexmembranen zeichnen sich durch eine hohe Quellfähigkeit gegenüber Wasser aus. So nehmen Symplexmembranen in Abhängigkeit ihrer molekularen Zusammensetzung bis zum 40 fachen Flüssigkeit in die ionisch verknüpfte Netzwerkstruktur auf. Die Gasdurchlässigkeit dieser Membranen ist sehr hoch. Hierdurch wird verhindert, dass sich ein anaerobes Milieu in der Wunde unter der Symplexmmebran ausbildet. Dies ist auf jeden Fall zu verhindern, da sich sonst pathogene Keime in der Wunde explosionsartig vermehren können. Stabilitätsuntersuchung in salzhaltigen Lösungen haben außerdem gezeigt, dass sich Symplexmembranen auch in Systemen die höherwertige Salze enthalten, nicht abbauen.

Die morphologische Betrachtung der Symplexe zeigt eine kompakte Struktur der Membranen, die hierdurch einen effektiven Infektionsschutz der Wunde - gegenüber Keimen - die von außen in die Wunde gelangen können, gewährleistet. Die Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter zeigt, dass sich bei Verwendung von Polyanionen und Polykationen mit einer ähnlichen Molmasse zur Herstellung der Symplexe sich die Netzwerkstrukturparameter nur geringfügig ändern. Erst bei Verwendung von Polykationen mit sehr geringer Molmasse und Ladungsdichte wird die Quellfähigkeit und auch die Netzwerkstruktur geändert. Bei diesen Symplexen fungiert das sehr kurze Polykation eher als eine Art Vernetzer, und es baut sich kein interpenitrierendes Netzwerk auf. Hierdurch verringert sich auch die Gasdurchlässigkeit bei diesen Membranen. Einen Nachteil der Symplexmembranen ist ihre sehr geringe mechanische Stabilität insbesondere im feuchtern

Zustand. Durch eine geringe Krafteinwirkung kann die sehr dünne Symplexmemebran leicht verletzt werden, wodurch die Schutzfunktion gegenüber Mikroorganismen verloren gehen würde. Dieser Nachteil kann leicht durch die Verwendung eines geeigneten Trägermaterial (z.B. Cellulosefasern) kompensiert werden.

Durch das sehr hohe Wasseraufnahmevermögen von Symplexen und die sehr hohe Wasserdampfdurchlässigkeit kann sehr viel Flüssigkeit durch die Membran hindurchtreten. Hierdurch sind diese Membranen vermutlich auch für die Versorgung von sehr stark exudierende Wunden wie diese z.B. bei der Spalthautentnahme auftreten geeignet. Es liegen jedoch z.Z. keine medizinischen Untersuchungsergebnisse vor. Eine heterogene Diels-Alder-Reaktion an Symplexen ist zumindest in einem geringen Maße möglich.

### 5.3 Chitosanmembranen

Chitosanfolien oder Composite aus Chitosan und andern Stoffen für die Applikation als Wundauflage oder Gewebetrennmateriale sind in der Technik bereits vielfach beschrieben [179][180][181][182][183][184][185][186][187][188][189][190][191][192][193][194]. Alle Verfahren haben gemeinsam, dass die Folien aus einer sauren wässrigen Chitosanlösung hergestellt werden. Durch Trocknen oder Phasenseparationsprozesse werden anschließend aus der Lösung die Chitosanfilme erhalten. Ein reiner Chitosanfilm ohne weitere Zusätze ist unflexibel und unelastisch und daher als Wundauflage eher mäßig geeignet. Durch Zugabe von z.B. Glycerin als Weichmacher wird jedoch eine flexible und elastische Chitosanmembran bei ausreichender mechanischer Stabilität (>20 MPa) erhalten. Zur Erhöhung der mechanischen Belastbarkeit kann ein Chitosanfilm quervernetzt werden oder es wird wie bei den Symplexen ein sekundäres Trägermaterial in den Chitosanfilm eingebracht. Chitosan besitzt zudem einige Materialeigenschaften, die es für die Applikation als Wundauflage besonders interessant machen. Zum einen hat Chitosan eine hämostatische Wirkung, die sehr schnell - schon beim „bloßem“ Kontakt des Blutes - mit dem Chitosan einsetzt. Diese Eigenschaft wird durch Erhöhung der Oberfläche noch verstärkt. Außerdem besitzt Chitosan die Fähigkeit Mikroorganismen in der polymeren Netzwerkstruktur zu immobilisieren. So wurde bei in

- 
- [179] DE 4322956A1, Folie aus Chitosan zur Wundversiegelung und Verfahren zu ihrer Herstellung, (1995)  
[180] US 4572906 Chitosan Based Wound Dressing Materials, (1986)  
[181] DE 3321446C2, Verwendung von Chitosan zur Erzielung einer Hämostase, zur Inhibierung der Fibroplastie und zur Förderung der Geweberegeneration einer Wunde, (1993)  
[182] DE 10117234, Poröse und nichtporöse Matrices auf Basis von Chitosan und Hydroxycarbonsäuren, (2002)  
[183] DE 10064314, Microbially produced, physiologically compatible, permeable film comprised of Cellulose that contains Chitosan, (2002)  
[184] US 6521243, Ionic chitosan -iodine complexes: antiseptic hydrogels and wound healing promoters, (2003)  
[185] US 5902798, Method of promoting dermal wound healing with chitosan and heparin or heparin sulfate, (1999)  
[186] US 5773033, Fibrinogen/chitosan hemostatic agents, (1998)  
[187] US 6638918, Chitosan compositions, (2003)  
[188] US6699287, Dermal scaffold using alkaline pre-treated chitosan matrix or alkaline pre-treated chitosan and alkaline pre-treated collagen mixed matrix, (2004)  
[189] DE 69720479 (EP 0927053 B1), Fragmentierte Polymere Hydrogele zur Verhinderung von Gewebeverklebung und Ihre Herstellung, (2003)  
[190] DE 68922630T2, Chitosanfasern mit hoher Festigkeit und damit hergestelltes Gewebe  
[191] US 5420197, Gels Formed by the Interaction of polyvinylpyrrolidone with chitosan derivatives  
[192] DE 10135676A1, Physiologisch verträglicher, Cellulose enthaltener Film  
[193] EP 1246650 B1, Flexibler Chitosanfilm zur Verwendung als Wundauflage  
[194] DE 19948120 C2, 3D-Matrix zur Herstellung von Zelltransplantaten, (2001)

in vitro und in vivo Untersuchungen ein sehr hohes Absorptionsvermögen von Chitin/Chitosan gegenüber verschiedenen z.T. pathogenen Mikroorganismen festgestellt. Bei einer in vitro Untersuchung [195] wurde 1 g Probe 20 min. in 10 ml Lösungsmittel zu dem 0,08 ml einer Bakterienkultur mit einem Titer von  $10^9$  gegeben. Diese Bakterienlösung wurde bei Raumtemperatur geschwenkt. Hiernach zeigte sich eine starke Reduzierung der Keimzahl durch Adsorption an einem chitin/chitosan-haltigen Material. Es konnten bis zu 95 % *Escherichia coli* und 82-89 % bei *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* und *Klebsiella* aus der Lösung entfernt werden. Nach einem 5 fachen Waschprozess konnten nur 11 % der Bakterien wieder freigesetzt werden. Bei in vivo Untersuchungen an Humanpatienten mit Brandverletzungen konnten Chitosanwundaufgaben die Keimzahl bei einer Vielzahl von Mikroorganismen (z.B. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. mirabilis*) in der Wundflüssigkeit um ca. 55 % senken. Hierbei wurden wesentlich bessere Ergebnisse wie bei einer herkömmlichen antimikrobiellen Behandlung durch laevomicolhaltige Bandagen erreicht [196].

Eine weitere Vermehrung der Mikroorganismen innerhalb der Polymermatrix findet nur in stark reduziertem Maße statt, so dass dieser Effekt oft auch als antimikrobielle Wirkung beschrieben wird.

Bei dem Produkt HemCon™ von der gleichnamigen amerikanischen Firma, das seit 2003 für das amerikanische Militär hergestellt wird und zur Zeit insbesondere im Irak Krieg intensiv im Einsatz ist, wird insbesondere der hämostatische Effekt ausgenutzt. Es handelt sich hierbei um eine Cellulose geträgerte Chitosanmembran, die eine große Oberfläche hat. Ein weiteres seit 2004 kommerziell erhältliches Produkt ist Chitoskin der Firma Sangui. Hierbei handelt es sich um ein leicht quervernetztes Composit aus Chitosan und Gelantine. Durch ein spezielles Herstellungsverfahren wird eine schaumartige Struktur erhalten, die in der Lage ist, große Mengen an Flüssigkeit aufzunehmen (Abbildung 134).

---



Abbildung 134: links HemCon, rechts Chitoskin.

Die derzeit marktführenden Produkte zur feuchten Wundbehandlung basieren vorwiegend auf Hydrokolloiden, Polyacrylaten und Alginaten und wirken daher lediglich rein physikalisch. Chitosan-Wundauflagen besitzen folgende Leistungsmerkmale:

- Gesteigerte koagulierende Eigenschaften (Blutstillung)
- Beschleunigte Wundheilung im Vergleich zu herkömmlichen Wundauflagen
- Günstige Wirkung während aller Phasen der Wundheilung
- Immobilisierung von Mikroorganismen (infizierte Wunden)
- Schutz gegen pathogene Keime
- Bio-kompatibel, Bio-abbaubar

Bei neuen vorklinischen Untersuchungen und im Tierversuch [197] zeigte sich, dass eine Chitosanwundauflage hinsichtlich der Wundheilungsgeschwindigkeit mit anderen Produkten, die auf dem Prinzip der feuchten Wundheilung basieren, konkurrieren kann bzw sogar bessere Eigenschaften aufweist [198][199].

Chitosanmembranen wurden neben Mattioli-Belmonte, L.F. Gorovoj [200] [201] auch von Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Kaeßmann synthetisiert und zur wundheilungsunterstützenden

[197] Minami S., Okamoto Y., Veterinary practice with chitin and chitosan, EXS, (1999), Vol. 87, S. 265-277

[198] Khan T.A., Peh K.K., A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., Vol. 6, Issue 1, (2003), S. 20-26

[199] Kahn T.A., Peh K.K., Ch'ng H.S., Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., Vol. 3, Issue 3, (2000), S. 303-311

[200] M. Mattioli-Belmonte, B. Muzarelli and R. Muzarelli Chitin and Chitosan in woundhealing and other biomedical applications, Carbohydrates Europe, Vol. 19, (1997), S. 30-36

[201] Gorovoj L.F., L.I. Burdyukova, V.S Zemskov, A.I. Prilutsky, V.S. Artamonov, S.O. Ivanyuta, A.B. Prilutskaya, Chitin-containing materials Mycoton for wound treatment, Advan. Chitin Sci., Vol. 4, (2000), S.

Wirkung an verschiedenen Wundtypen im Krankenhaus Norden eingesetzt. Die verwendeten Chitosanmembranen wurden im Labormaßstab aus Chitosan (Quelle: Krabbenchalen) hergestellt und ohne weitere Veredelung der Membranen auf Wunden appliziert. Eine Farbbildkasuistik, die den Behandlungserfolg von Chitosanfolien an Humanwunden an einem Patienten mit einem offenen Bruch sind in Abbildung 135 gezeigt.



Abbildung 135: Farbbildkasuistik

Quelle Prof. Kaeßmann.

Es hat sich gezeigt, dass Wundauflagen aus Chitosan, gegenüber den kommerziell erhältlichen Wundauflagen die auf dem Prinzip der feuchten Wundheilung basieren, konkurrenzfähig sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Chitosanmembranen u.a. hinsichtlich ihrer Morphologie, Flexibilität, Elastizität, Transparenz und mechanischen Belastbarkeit variiert werden. Ziel sollte sein, eine kostengünstige und leicht herstellbare Chitosanmembran zu entwickeln, die auch für stark exudierende Wunden eingesetzt werden kann.

Des Weiteren ist es möglich Chitosan, das reich an funktionellen Gruppen ist, mit Dienen oder Dienophilen zu derivatisieren. Durch diese funktionellen Gruppen können andere Substanzen

durch eine Diels-Alder-Reaktion kovalent an das Chitosan gebunden werden.

### 5.3.1 Herstellung

Chitosan kann aufgrund seiner intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, wie auch Cellulose, nicht durch Zufuhr thermischer Energie geschmolzen werden. Es muss deshalb immer eine Chitosanlösung hergestellt werden, aus der dann die Membranen hergestellt werden. Chitosan ist aufgrund seiner Struktur in Wasser nur unter Zugabe von Säure löslich, da hierbei die Aminogruppe in 2-Position protoniert wird und sich so ein Polykation bildet. Wegen der hohen Biokompatibilität bietet sich insbesondere Essigsäure und Milchsäure an. Hierbei ist auf den starken Molmassenabbau von Chitosan in saurer Lösung durch säurekatalytische Aldolreaktionen hinzuweisen. Die sauren Chitosanlösungen sollten deshalb möglichst schnell nach der Herstellung verbraucht werden.

Es wird in einen Kunststoffeimer 80-120 g Chitosan gegeben und mit einer 1 % Essigsäure- oder einer 1,5 % Milchsäurelösung auf 4 kg aufgefüllt. Die Suspension wird mit einem Stahlrührer, der von einem Rührmotor angetrieben wird, mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur und bei ca. 500 U/min homogenisiert. Die Lösung wird anschließend zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen durch ein Stahlsieb mit einer mittleren Maschenweite von 330 µm filtriert.

Die so hergestellte Lösung kann zur Chitosanmembranherstellung verwendet werden.

#### 5.3.1.1 Glatte, durchsichtige Chitosanmembranen

Eine 2-3 % Chitosanlösung wird mit 0,25 % - 3 % Glycerin versetzt und mit Hilfe eines Rakels in einer Stärke (Dicke) von 1–4 mm auf eine Polycarbonat oder Polymethacrylat Platte aufgetragen. Diese Platten werden bei ca. 60 °C für ca. 12 Stunden getrocknet. Durch die Verwendung von den o.g. Kunststoffplatten lässt sich die hergestellte Membran leicht von der Platte entfernen (siehe Abbildung 137 und Abbildung 136). Ohne eine nachgeschaltete Neutralisierung der so erhaltenen Membranen (z.B. durch Natronlauge) wird (in Abhängigkeit der Säure in der Chitosan gelöst wurde) eine Chitosanacetat- bzw. Chitosanlactat- Auflage erhalten. Diese Wundaufgaben wurden bereits an Humanpatienten mit Erfolg getestet.

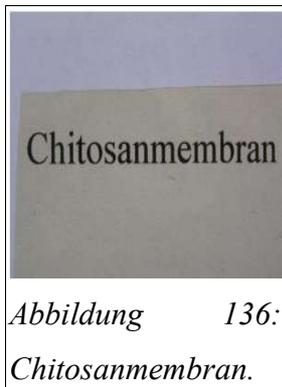


Abbildung 136:  
Chitosanmembran.

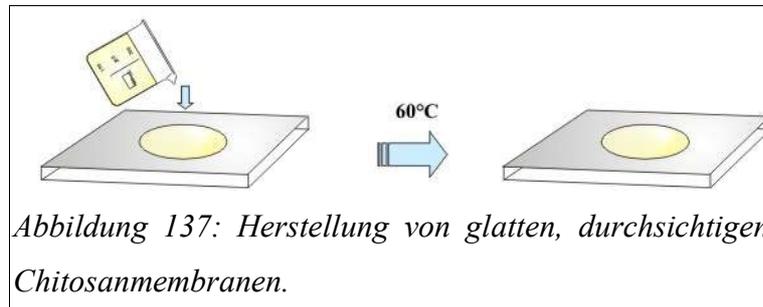


Abbildung 137: Herstellung von glatten, durchsichtigen Chitosanmembranen.

### 5.3.1.2 Makroporöse Chitosanmembranen

Eine 2-3 % Chitosanlösung wird mit Silicapartikeln mit einer Größe von 5-60  $\mu\text{m}$  in einer Konzentration von 1-20 % versetzt und mit Hilfe eines Rakels wird eine Schichtdicke von 1 - 4 mm auf eine Polycarbonat oder Polymethacrylat Platte aufgetragen. Diese mit Chitosanlösung beschichteten Platten werden bei einer Temperatur von 20-80  $^{\circ}\text{C}$  mehrere Stunden getrocknet. Die Membran kann anschließend leicht von der Synthesplatte entfernt werden. Die Membran wird anschließend in einer alkalischen, wässrigen Lösung neutralisiert und die Silicapartikel werden durch die Lauge heraus gelöst. Hierzu wird die Chitosanmembran für 1-2 Stunden bei 50-80  $^{\circ}\text{C}$  in eine 5-10 % Natronlauge gegeben. Die so neutralisierte, poröse Chitosanmembran wird anschließend für einige Minuten in eine 10-40 % Glycerinlösung gegeben. Die Membran wird anschließend bei eine Temperatur von 20-80  $^{\circ}\text{C}$  mehrere Stunden getrocknet. Es werden so makroporöse Chitosanmembranen mit einer definierten Porengrößenverteilung erhalten (siehe Abbildung 138). Hierdurch wird die Oberfläche der Membran sehr stark erhöht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Auflagen Mikroorganismen leichter an der Oberfläche immobilisieren und dass eine schnellere Hämostase zu erwarten ist.

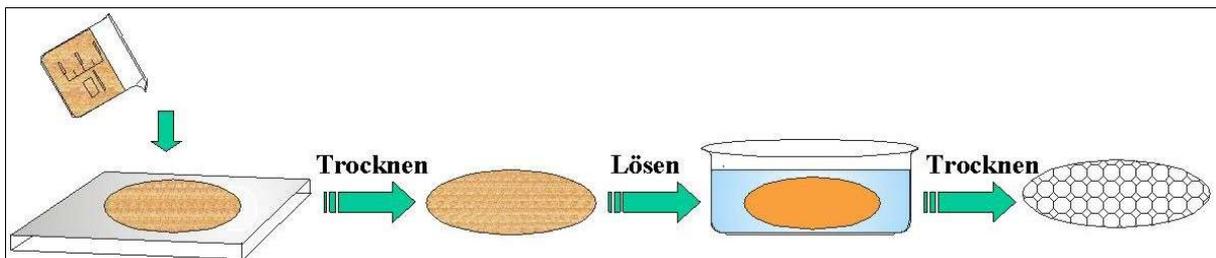


Abbildung 138: Schematische Herstellung von porösen Chitosanmembranen - von links, Auftragen einer Chitosanlösung mit suspendiertem Kieselgel, trocknen, selektives Lösen der Partikel, trocknen (ggf. Weichmacherzugabe möglich).

### 5.3.1.3 Mikroporöse Chitosanmembranen

In eine 1 % (w/w) Essigsäurelösung wird unter intensivem Rühren 2-3 % (w/w) Chitosan in Lösung gebracht. Zu dieser Lösung wird 5-10 % (w/w) PEG (Molmasse von 1.500 bis 35.000 g/mol) unter Rühren hinzugegeben. In diese Lösung wird ein geeignetes Trägermaterial (Filterpapier, Baumwollgewebe) gegeben, bis das Trägermaterial homogen mit der Lösung getränkt ist. Das Filterpapier wird anschließend in eine Kunststoff- oder Glas-Petrischale gegeben mit 4 mm der Polymerlösung beschichtet und bei einer Temperatur von ca. 60 °C 12 Stunden getrocknet. In einer alkalischen wässrigen Lösung (0,5 % (w/w) NaOH) kann das Chitosan neutralisiert werden. Dabei kann sich das Chitosan nicht in der alkalischen Lösung lösen und das Polyethylenglycol wird selektiv herausgelöst. Um eine möglichst vollständiges Herauslösen des Polyethylenglycols zu gewährleisten wird die Chitosanmembran für 24 Stunden bei Raumtemperatur in eine 0,5 % (w/w) Natronlauge gegeben. Hiernach wird die Chitosanmembran mit dest. Wasser bis zur pH-Neutralität gewaschen. Bei gewünschter Glycerinzugabe (Weichmacher) kann die noch feuchte, poröse Chitosanmembran anschließend für einige Minuten in eine 10-40 % Glycerinlösung gegeben. Zuletzt erfolgt die Trocknung der Membran bei einer Temperatur von 60 °C über mehrere Stunden.

Diese Membranform muss faserverstärkt werden, da sonst die mechanische Stabilität der Membran nicht gewährleistet ist. Durch die sehr kleinen Poren der Membran kann die spezifische Oberfläche nochmal im Vergleich zu der makroporösen Membran stark vergrößert.

#### **5.3.1.4 Verstärkte Chitosanmembranen**

Chitosanmembranen weisen eine hohe Zugbelastbarkeit auf (40 - 100 MPa), jedoch verhalten sie sich im feuchten Zustand und insbesondere gegenüber seitlich einwirkender Kräfte mechanisch instabil. Diese Membranen können trotz der hohen Zugbelastbarkeit schon durch einen geringen Kraftaufwand seitlich eingerissen werden. Durch eine Gewebe- oder Faserverstärkung kann die mechanische Stabilität gegenüber seitlich einwirkender Kräfte stark erhöht werden.

Chitosan kann mit einer Vielzahl von Fasern und Geweben verstärkt werden. Aufgrund der langjährigen Erfahrung aus der herkömmlichen Wundheilung stellt Cellulose ein geeignetes Trägermaterial dar, es können aber auch Substanzen wie z.B. Nylon, Polyurethan, Polyester, Seide, Wolle usw. als Trägermaterial Verwendung finden. In Anlehnung an bestehende technische Verfahren kann ein Film der Chitosanlösung auf ein geeignetes Trägermaterial aufgezogen werden. Hierdurch kann einfach und kostengünstig eine mechanisch verstärkte Chitosanauflage hergestellt werden.

Im einfachsten Fall (siehe oben) wird das so beschichtete Trägermaterial getrocknet. Alternativ kann eine verstärkte Membran über einen Phasenseparationsprozess hergestellt werden.

#### **5.3.1.5 Chitosanmembran Herstellung über Phasenseparation**

Die Phasenseparation zur Herstellung von Membranen ist hinlänglich bekannt. Normalerweise wird hierbei die unterschiedliche Löslichkeit in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität ausgenutzt. Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit zur Herstellung von Chitosanmembranen modifiziert, wobei die unterschiedliche Löslichkeit von Chitosan bei verschiedenen pH-Werten ausgenutzt werden.

Das mit saurer Chitosanlösung beschichtete Trägermaterial wird durch ein Tauchbad aus einer 5 % Natronlauge gezogen. Innerhalb weniger Minuten diffundiert bei Raumtemperatur Natronlauge in die Chitosanlösung, wodurch der pH-Wert innerhalb der Chitosanlösung stark erhöht wird. Dies führt wiederum zu einer Gelbildung des Chitosans. So kann mit dieser einfachen Methode - innerhalb weniger Minuten – eine aufgrund der Gelbildung sehr leicht handhabbares pH neutrales Chitosanmembran-Hydrogel erhalten werden. Zur Neutralisation

der überschüssigen Natronlauge wird die so erhaltene Hydrogel-Membran in Wasser gewaschen. Die noch feuchte Chitosanmembran verfügt gegenüber der menschlichen Haut über sehr gute Adhäsionseigenschaften. Die so hergestellte Membran kann natürlich auch getrocknet werden. Es bildet sich dann ein neutraler Chitosanfilm aus. Die rückgequollene Membran weist jedoch einen wesentlich geringeren Tack gegenüber der menschlichen Haut auf.

### 5.3.2 Vernetzung von Chitosanmembranen

Die verschiedenen Membranen, die im vorigen Kapitel beschrieben wurden, können vernetzt werden, um zum einen die Permeabilität der Membranen zu steuern, und zum anderen um die Membran in eine absolut unlösliche Form zu überführen. Des weiteren erhöht eine Vernetzung die mechanische Belastbarkeit der Membranen.

Es bieten sich zwei unterschiedliche Verfahren an, um die Membranen bzw. die Chitosanlösungen zu vernetzen. Verfahren zur Vernetzung werden im Folgenden beschrieben.

### 5.3.3 Vernetzung mit Dialdehyden - Chitosanhydrogel

Über eine Vernetzungsreaktion von Chitosan mit Dialdehyden kann ein kovalent vernetztes Hydrogel erhalten werden. Hierbei bildet die Aminogruppe des Chitosans an der C2-Position mit dem Aldehyd eine Imid-Bindung aus.

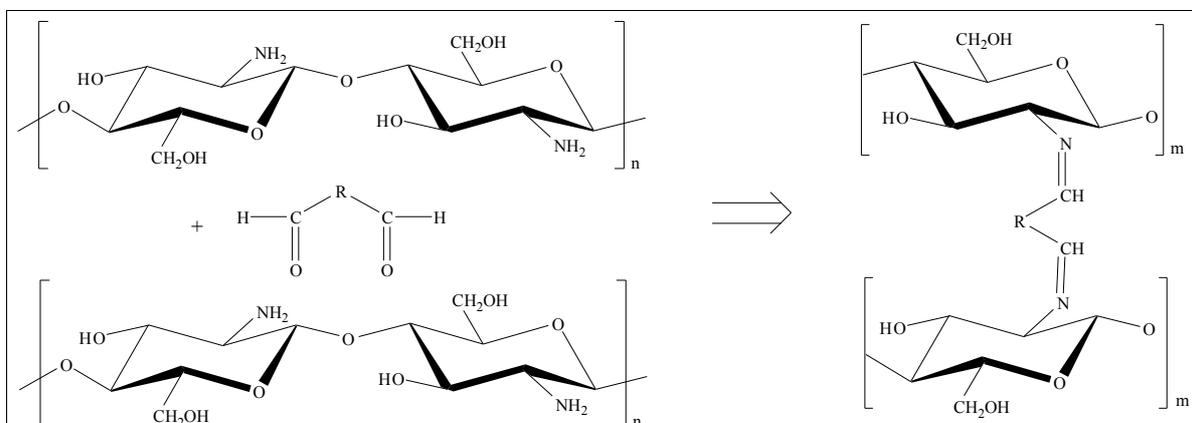


Abbildung 139: Vernetzung von Chitosan mit Glyoxal ( $R = 0$ ) oder Glutaraldehyd ( $R = 3$ ) unter Ausbildung einer Imid-Bindung (bevorzugter Vernetzungstyp).

Diese Vernetzungsreaktion (siehe Abbildung 139) findet bei geeigneter Wahl der Aldehyde schon bei Raumtemperatur statt. Es ist jedoch zweckmäßig, durch Erhöhung der Kinetik, die Vernetzungsreaktion bei z.B. 60 °C stattfinden zu lassen. In Abhängigkeit des Vernetzungsgrades entsteht ein Hydrogel mit unterschiedlicher Elastizität und Textur. So entsteht bei hohen Vernetzungsgraden naturgemäß ein kompaktes Netzwerk, das sich unter anderem durch Bruch bei mechanischer Belastbarkeit auszeichnet. Diese Eigenschaften, die z.B. in der Lebensmittelindustrie bei der Herstellung von „Wackelpudding“ durchaus erwünscht sind, sind bei Anwendung des Hydrogels bei der Versorgung von Wunden kontraproduktiv. Ein Ablösen des Hydrogels von der Wunde sollte möglichst keine Rückstände hinterlassen. Daher wird ein Hydrogel mit einer geringen Neigung zum Gelbruch benötigt. Durch Aufziehen eines Filmes der Chitosanlösung, mit einem unmittelbar zuvor zugefügtem Vernetzer, können auch Hydrogel-Folien erhalten werden. Hierbei ist es zweckmäßig, zur Erhöhung der mechanischen Stabilität, z.B. eine Gewebematte aus Baumwolle in die Folie einzuarbeiten. Durch Trocknen der Hydrogel-Filme können auch vernetzte Chitosanmembranen erhalten werden. Eine heterogenen Vernetzungsreaktion zwischen einer Chitosanmembran und einer wässrigen Vernetzerlösung führt schon nach wenigen Minuten zu einem unlöslichen, spröden und unflexiblen Film. Die Herstellung einer vernetzten Chitosanmembran auf diesem Syntheseweg führt somit nicht zum gewünschten Erfolg, da bei der heterogenen Vernetzung die positiven Membraneigenschaften wie z.B. Elastizität verloren gehen.

### **Herstellung**

In eine zuvor bereitete 3 % essigsäure Chitosanlösung wird bei möglichst niedriger Temperatur eine geringe Menge Glyoxal bzw. Glutaraldehyd gegeben. Hierbei handelt es sich um sehr reaktive Vernetzer, die nicht konzentriert in die Chitosanlösung gegeben werden können, da sich bei ca. 4 °C innerhalb weniger Sekunden an der Eintropfstelle ein polymeres Netzwerk ausbildet. Wodurch eine Homogenisierung der Lösung durch anschließendes Rühren verhindert wird. Eine Lösung dieses Problems stellt eine stärkere Verdünnung der Vernetzerlösung dar. Es wurde daher die 3 % Chitosanlösung mit einer essigsäuren Vernetzerlösung auf eine 2,5 bzw. 2 % Chitosanlösung verdünnt. Es wurde exemplarisch wie folgt vorgegangen:

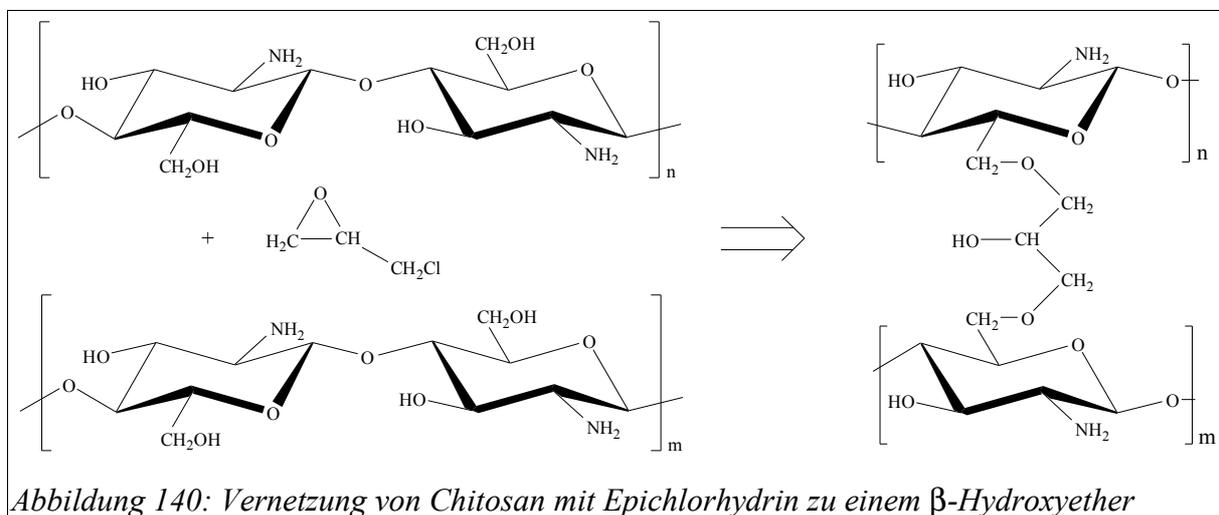
Die Temperatur aller verwendeten Substanzen sollte bei 4 °C liegen. In 100 ml 0,75 %

Essigsäure wird 3 g Chitosan mehrere Stunden homogenisiert. Zu dieser Lösung werden 20 ml 0,75 % Essigsäure hinzugefügt, in die zuvor eine geringe Menge eines Vernetzers gegeben wurde. Unmittelbar nach dem Zusammenfügen wird die Lösung durch intensives 1-2 minütiges Rühren homogenisiert. Hiernach kann die Lösung in jede beliebige Form gegossen werden. Eine Temperaturerhöhung auf ca. 60 °C beschleunigt die Netzwerkbildung, die durch zerstörungsfreie rheomechanische Oszillationsuntersuchungen direkt messbar ist. Die Ausbildung einer Netzwerkstruktur ist nach ca. 1 Stunde abgeschlossen.

### 5.3.3.1 Vernetzung mit Epichlorhydrin

Eine andere Möglichkeit der Vernetzung stellt die Verwendung von Epichlorhydrin dar.

In leicht alkalischer Lösung können die Membranen bei ca. 60 °C mit Epichlorhydrin zu einem Netzwerk mit kovalenten  $\beta$ -Hydroxyethern als Verknüpfungspunkte gebildet werden (siehe Abbildung 140).



Bei diesem Verfahren können sehr gut Chitosanmembranen in einer anschließenden Vernetzungsreaktion zu einem Netzwerk umgesetzt werden.

Eine oben beschriebene Chitosanmembran wird für ca. 1-2 Stunden bei 60 °C in eine wässrige Lösung aus 1 mmol Epichlorhydrin bei einem pH-Wert von ca. 10 gegeben. Bei der Verwendung von nicht neutralisierten Membranen muss ggf. durch weitere Zugabe von Natronlauge zu der Reaktionslösung sichergestellt werden, dass der pH-Wert konstant

gehalten wird. Die so vernetzte Membran wird in dem. Wasser gewaschen und für einige Minuten in eine 10-40 % Glycerinlösung gegeben. Nach der anschließend erfolgten Trocknung der Membran bei 60 °C, wird eine in verd. Säuren unlösliche Membran erhalten, deren mechanische Eigenschaften weitestgehend denen einer unvernetzten Membranen entsprechen.

### 5.3.4 Quellung

Durch Kontakt mit der Wundflüssigkeit kommt es zur Quellung des Netzwerkes. Zur Bestimmung der maximalen Quellbarkeit wurden die Chitosanfolien für 20 min. in dem. Wasser getaucht und die Massen- und Volumenzunahme bestimmt.

Zunächst wurde die Quellbarkeit der Chitosanmembranen in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration bestimmt. Hierbei berechnet sich die Volumen- und Massen-Quellung wie folgt (Gleichung 51 und Gleichung 50):

$$Q_{\text{Volumen}} = \frac{V_{\text{gequollen}}}{V_{\text{trocken}}}$$

Gleichung 51

$$Q_{\text{Masse}} = \frac{m_{\text{gequollen}}}{m_{\text{trocken}}}$$

Gleichung 50

Eine essigsäure 3 % Chitosanlösung wird mit 0 % - 3 % Glycerin versetzt und aus dieser Lösung die Membran hergestellt. Die angegebenen Glyceringehalte entsprechen der prozentualen Glycerinmenge in den Membranen nach dem Trocknungsprozess. Bei einer 100 % Glycerinmenge bedeutet dies, dass Chitosan und Glycerin in gleichen Gewichtsverhältnissen in der Membran vorliegen.

Der in Tabelle 32 angegebene Wert für  $\alpha$  gibt die Ausdehnung des Netzwerkes in eine Raumrichtung an und ergibt sich aus der Kubikwurzel der Quellung.  $\alpha = \sqrt[3]{Q}$

<i>Bezeichnung</i>	<i>Quellung Masse</i>	<i>Quellung Vol.</i>	<i><math>\alpha_{\text{Masse}}</math></i>	<i><math>\alpha_{\text{Volumen}}</math></i>
Ch7 0 % Gly.	11,47	10,26	2,26	2,17
Ch7 8 % Gly.	5,54	5,61	1,77	1,78
Ch7 16 % Gly.	3,23	3,31	1,48	1,49
Ch7 24 % Gly.	3,19	3,02	1,47	1,45

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quellung Masse</b>	<b>Quellung Vol.</b>	<b><math>\alpha_{Masse}</math></b>	<b><math>\alpha_{Volumen}</math></b>
Ch7 33 % Gly.	1,78	2,05	1,21	1,27
Ch7 50 % Gly.	1,64	1,95	1,18	1,25
Ch7 67 % Gly.	1,81	1,87	1,22	1,23
Ch7 100 % Gly.	1,2	1,18	1,06	1,06

Tabelle 32: 20 minütige Quellung von Chitosanacetatfolien in dem. Wasser aus Chitosan 7.

Es zeigt sich, dass die Quellung der Chitosanmembranen mit zunehmender Glycerinkonzentration abnimmt (Tabelle 32). Ein mögliche Erklärung ist, das durch das enthaltene Glycerin in den Membranen die Netzwerkstruktur aufgeweitet wird. Hierdurch liegen Chitosanmembranen, die Glycerin enthalten, schon in einem „vorgequollenen“ Zustand vor. Durch die Quellung in Wasser wird lediglich das enthaltenen Glycerin in den Membranen durch Wasser ausgetauscht. Hierdurch kommt es zu einer geringeren Quellung dieser Membranen im Wasser. Wenn davon ausgegangen wird, dass durch die Quellung in dem. Wasser das Glycerin vollständig ausgespült wird und hierdurch die maximale Quellbarkeit der Membranen in Wasser erreicht wird gilt folgender Zusammenhang (siehe auch Gleichung 52 Gleichung 53):

Netzwerkquellung durch x % Glycerin = Quellung (H<sub>2</sub>O)<sub>(0 % Glycerin)</sub> : Quellung (H<sub>2</sub>O)<sub>(x % Glycerin)</sub>

$$\frac{V_{Glycerin}}{V_{trocken}} = \frac{V_{Wasser}}{V_{trocken}} / \frac{V_{Wasser}}{V_{Glycerin}} \quad \text{Berechnung für die Volumenquellung durch x\% Glycerin.}$$

*Gleichung 52*

$$\frac{m_{Glycerin}}{m_{trocken}} = \frac{m_{Wasser}}{m_{trocken}} / \frac{m_{Wasser}}{m_{Glycerin}} \quad \text{Berechnung für die Massenquellung durch x\% Glycerin.}$$

*Gleichung 53*

Für die Chitosanmembran (Chitosan 7) (Tabelle 32) mit einem Gyceringehalt von 100 % (H<sub>2</sub>O Quellung 1,18) bedeutet dies, dass im Vergleich zu der Chitosanmembran ohne Glycerin (H<sub>2</sub>O Quellung 10,26) die Netzwerkstruktur der Membran durch das Glycerin um den Faktor 8,69 gequollen wird. Für die anderen Glycerinkonzentrationen in der Membran gilt entsprechendes (siehe auch Tabelle 36).

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quellung Masse</b>	<b>Quellung Vol.</b>	<b><math>\alpha_{Masse}</math></b>	<b><math>\alpha_{Volumen}</math></b>
Ch8 0 % Gly.	10,94	11,39	2,22	2,25
Ch8 8 % Gly.	5,52	4,92	1,77	1,7
Ch8 16 % Gly.	3,63	4,43	1,54	1,64
Ch8 24 % Gly.	2,43	3,53	1,34	1,52
Ch8 33 % Gly.	2,15	2,49	1,29	1,36
Ch8 50 % Gly.	1,81	2,22	1,22	1,3
Ch8 67 % Gly.	1,8	2,24	1,22	1,31
Ch8 100 % Gly.	1,74	2,16	1,2	1,29

Tabelle 33: 20 minütige Quellung von Chitosanacetatfolien in dem. Wasser von Chitosan 8.

Beim Chitosan 8 (siehe Tabelle 33) wurden im Vergleich zu Chitosan 7 etwas geringere Werte für die Quellfähigkeit des Netzwerkes bestimmt. Es zeigt sich, dass sich die Quellfähigkeit bei einer Molmasse zwischen  $M_n = 253.000$  g/mol (Chitosan 7) und  $M_n = 318.000$  g/mol (Chitosan 8) nur geringfügig ändert.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quellung Masse</b>	<b>Quellung Vol.</b>	<b><math>\alpha_{Masse}</math></b>	<b><math>\alpha_{Volumen}</math></b>
Ch9 0 % Gly.	5,34	5,34	1,75	1,75
Ch9 16 % Gly.	3,09	3,86	1,46	1,57
Ch9 24 % Gly.	2,22	2,8	1,3	1,41
Ch9 33 % Gly.	1,64	2,03	1,18	1,27
Ch9 50 % Gly.	1,57	1,96	1,16	1,25
Ch9 67 % Gly.	1,46	1,85	1,13	1,23
Ch9 100 % Gly.	1,53	1,88	1,15	1,23

Tabelle 34: 20 minütige Quellung von Chitosanacetatfolien in dem. Wasser von Chitosan 9.

Beim Chitosan 9 (siehe Tabelle 34) werden im Vergleich zu Chitosan 7 und Chitosan 8 50 % geringere Werte für die Quellfähigkeit in Wasser gefunden. Die Quellfähigkeit (Masse) einer Chitosanmembran ohne Glycerin beträgt bei Chitosan 7 (11,47) bei Chitosan 8 (11,39) und bei Chitosan 9 (5,34). Durch die höhere Molmasse ( $M_n = 587.000$  g/mol) bei Chitosan 9 kommt es durch die längeren Polymerketten zu mehr Verschlaufungsmöglichkeiten der Moleküle untereinander. Außerdem besitzt Chitosan 9 (DDA = 0,75) in Vergleich zu Chitosan 7 (DDA = 0,84) und Chitosan 8 (DDA = 0,79) den geringsten durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad. Durch die Acetamidgruppen können mehr physikalische

Verknüpfungspunkte durch Wasserstoffbrückenbindungen geschlossen werden. Der Effekt der Molmasse auf die Quellfähigkeit scheint hierbei zu überwiegen da zwischen Chitosan 7 und Chitosan 8 nur ein geringer Unterschied der Quellfähigkeit trotz unterschiedlichem durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad nachgewiesen wurde. Durch die oben genannten Zusammenhänge kommt es zu einer geringeren Quellfähigkeit der Membranen die aus Chitosan 9 hergestellt wurden.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quellung Masse</b>	<b>Quellung Vol.</b>	<b><math>\alpha_{Masse}</math></b>	<b><math>\alpha_{Volumen}</math></b>
Ch-B 0 % Gly.	6,65	6,7	1,88	1,88
Ch-B 8 % Gly.	5,34	5,84	1,75	1,8
Ch-B 16 % Gly.	3,11	3,49	1,46	1,52
Ch-B 24 % Gly.	2,71	2,79	1,39	1,41
Ch-B 33 % Gly.	2,26	2,68	1,31	1,39
Ch-B 50 % Gly.	1,95	2,14	1,25	1,29
Ch-B 67 % Gly.	1,71	2,01	1,2	1,26
Ch-B 100 % Gly.	1,54	1,49	1,15	1,14

*Tabelle 35: 20 minütige Quellung von Chitosanacetatfolien in des. Wasser von Chitosan mit einer breiten Molmassenverteilung (äquimolare Abmischung von Chitosan 7- 9).*

Bei den Membranen der Chitosan-Proben mit einer breiten Molmasenverteilung (Mischung aus Chitosan 7-9) kommt es ebenfalls zu einer geringen Quellung der Membranen die Vergleichbar mit denen aus Chitosan 9 ist (Tabelle 35). Anscheinend haben auch in dieser Mischung (33 % Stoffmengenanteil hochmolekulares Chitosan) die hochmolekularen Chitosananteile einen starken Einfluss auf die Quellbarkeit der Folien.

<b>(Volumen) Netzwerkquellung durch</b>	<b>Chitosan 7</b>	<b>Chitosan 8</b>	<b>Chitosan 9</b>	<b>Chitosan-B</b>
8 % Glycerin	1,83	2,32	0,00	0,87
16 % Glycerin	3,10	2,57	1,38	1,92
24 % Glycerin	3,40	3,23	1,91	2,40
33 % Glycerin	5,00	4,57	2,63	2,50
50 % Glycerin	5,26	5,13	2,72	3,13
67 % Glycerin	5,48	5,08	2,90	3,33
100 % Glycerin	8,69	5,27	2,84	4,50

*Tabelle 36: Netzwerkquellung hervorgerufen durch, dass in den Membranen enthaltene Glycerin von Chitosanacetatfolien von Chitosan 7- 9 und einer Chitosanprobe mit einer breiten Molmassenverteilung (Chitosan-B).*

Die in Tabelle 36 angegebene Netzwerkquellung die durch das Glycerin in den Membranen hervorgerufen wird, wurde indirekt durch die Quellung in Wasser bestimmt. Es zeigt sich hierbei, ein analoger Zusammenhang - bezüglich der Molmasse und dem durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad - zu der Wasser-Quellfähigkeit der Chitosanmembranen im vorangegangenen Abschnitt. Durch eine zunehmende Glycerinkonzentration in den Chitosanmembranen wird das Netzwerk insbesondere bei Verwendung von Chitosan mit niedriger Molmasse (Chitosan 7 und Chitosan 8) stark aufgeweitet. Dies führt u.a. zu einer höheren Flexibilität und Elastizität dieser Membranen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Quellfähigkeit einer Chitosanmembran durch die Molmasse und den Glyceringehalt stark variiert werden kann. Für den Einsatz als Wundauflage ist eine hohe Flexibilität und Elastizität der Membranen von Vorteil da hierdurch die Folie auch bei zerklüfteten Wunden einen guten Kontakt zum Wundgrund herstellen kann. Hierzu bieten sich insbesondere Chitosanfolien mit einem hohen Glyceringehalt an. Durch die Quellfähigkeit der Membranen kann zu dem die Wundflüssigkeit aufgenommen und nach außen transportiert werden. Bei sehr stark exudierenden Wunden, bei denen ein hoher Flüssigkeitstransport nach außen sichergestellt werden muss, (Verhinderung der Bildung eines Wundflüssigkeitsdepo unter der Auflage) bieten sich Chitosanfolien an die eine besonders hohe Quellfähigkeit aufweisen. Hierbei zeigen Chitosanmembranen mit einer geringen Molmasse und einem geringen Glyceringehalt das größte Potenzial große Flüssigkeitsmengen aufzunehmen.

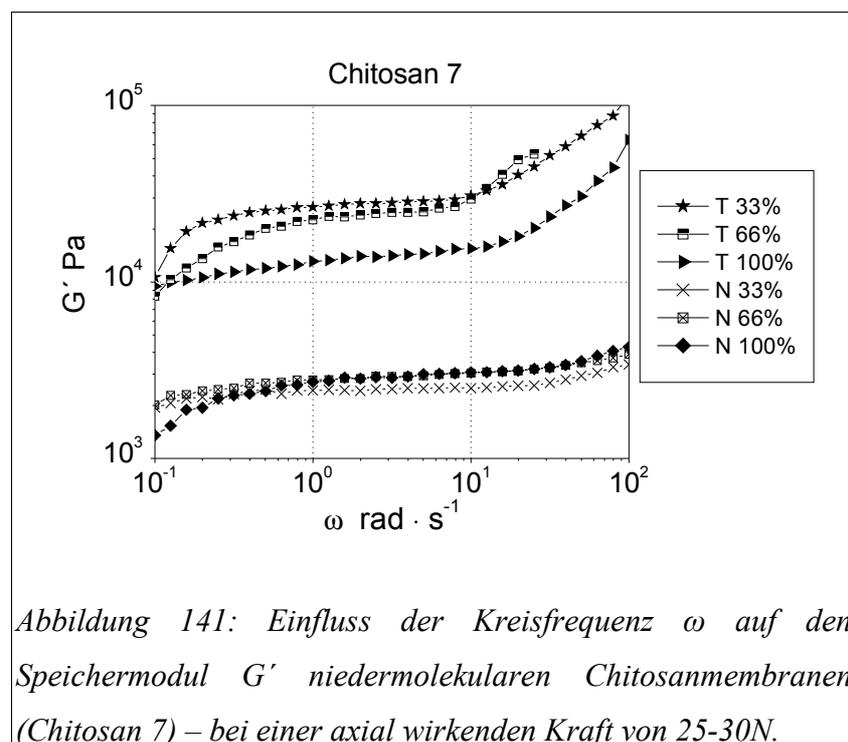
### **5.3.5 Netzwerkstruktur**

Membranen können mit Hilfe rheomechanischer Oszillationsuntersuchungen auf Ihre elastischen Eigenschaften untersucht werden. Aus einfachen mathematischen Zusammenhängen kann mit diesen Ergebnissen auf die Netzwerkstrukturparameter der Membranen geschlossen werden.

Chitosanmembranen werden bei einer axialen Kraft von 25-30 N - mit Hilfe einer Platte-Platte-Geometrie (25 mm Durchmesser) - durch Oszillationsmessungen charakterisiert. Die Membranen können zum Teil direkt untersucht werden. Chitosanmembranen ohne oder mit einem geringen Zusatz (8-16 %) von einem Weichmacher (Glycerin) können aufgrund der zu hohen Netzpunktdichte dieser Folien mit dem vorhandenen Gerät nicht direkt vermessen

werden. Des Weiteren wurden Oszilationsmessungen an in Wasser gequollenen Chitosanmembranen durchgeführt, um die Änderungen der Netzwerkstrukturparameter durch die hervorgerufene Quellung zu ermitteln. Durch Einweichen in Wasser wird die Chitosanmembran maximal gequollen. Dies soll das Aufquellen der Membran in einer stark exudierenden Wunde simulieren. Hierbei wird die größtmögliche Veränderung der Netzwerkstruktur durch das Aufquellen der Membran erreicht. In einer Wunde würde die Quellung der Membran jedoch aufgrund von gelösten Salzen und Blutbestandteilen geringer ausfallen.

In Abbildung 141 ist das Ergebnis der Auftragung der Speichermodule  $G'$  gegen die Kreisfrequenz  $\omega$  an Chitosanmembranen, die unterschiedliche Mengen an Glycerin enthalten und im trockenen oder gequollenen Zustand untersucht wurden dargestellt.



Hierbei sind T 33 % - T 100 % trockne Chitosanmembranen mit 33, 66, 100 % Glycerin. Bei N 33 % - N 100 % handelt es sich um die Chitosanfolien T 33 % - T 100 %, die vor Meßbeginn ca. 3 Minuten in Wasser gequollen wurden. Alle Kurvenverläufe der Membranen deuten auf eine weitestgehend permanente Netzwerkstruktur der Chitosanmembranen sowohl im trockenen wie auch im gequollenen Zustand hin. Bei trockenen Membranen zeigt sich (Abbildung 141), dass ein höherer Glycingehalt zu geringeren Werten für der

Speichermodul führt. Durch das enthaltene Glycerin kommt es zu einem Aufquellen der Netzwerkstruktur im trockenen Zustand. Dieses Aufquellen der Netzwerkstruktur beeinflusst maßgeblich die Membraneigenschaften wie z.B. das Permeationsvermögen der Membranen. So führt eine Erhöhung des Glyceringehaltes in den Membranen zu einem Aufweiten der Netzwerkmaschen und damit auch zu einem verbesserten Gasaustausch. Des weiteren ändern sich auch die Materialeigenschaften der Membran hinsichtlich der Deformierbarkeit und Reißfestigkeit.

Durch die starke Quellung der Membran in Wasser werden bis zu einer Dekade niedrigere Werte für der Speichermodul ermittelt. Hierzu werden für die Berechnung der Netzwerkstrukturparameter die ermittelten Quellungen aus Kapitel 5.3.4 genutzt. Für die Bestimmung der Dichte der Polymerknäule (Berechnung der Verhängungsmolmasse) in den trockenen Membranen (T 33 % -T 100 %) wird wie folgt vorgegangen (Gleichung 54):

$$\rho_{Chitosan(xGlycerin)} = \frac{\rho_{Chitosan}}{1 + xGlycerin}$$

Gleichung 54

Für die Dichte des Chitosans ohne Glycerin wurde ein Wert von ca. 1.25 g/ml ermittelt.

In der Tabelle 37 sind die Netzwerkstrukturparameter der Membran aus Abbildung 141 angegeben.

<i>Name</i>	<i>G' [Pa]</i>	<i>M<sub>e</sub> [g/mol]</i>	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub> [cm<sup>3</sup>]</i>	<i>ξ [nm]</i>
Ch 7 T 0 %*	30770	103.600	643	7,47 E+18	5,11
Ch 7 T 33 %	27912	85.800	582	6,78 E+18	5,28
Ch 7 T 66 %	23890	80.300	603	5,80 E+18	5,56
Ch 7 T 100 %	13983	114.000	692	3,40 E+18	6,65
Ch 7 N 33-100 %	2836	101.400	630	6,89 E+17	11,13

*Tabelle 37: Netzwerkstrukturparameter von Chitosanmembranen (Chitosan 7) – G' gemessene Speichermodule bei  $\omega = 2 \text{ rad/s}$  - M<sub>e</sub> berechnete Verhängungsmolmasse, P<sub>e</sub> berechneter Polymerisationsgrad von M<sub>e</sub>– v<sub>e</sub> Netzpunktdichte - ξ Netzpunktstand*

\*Berechnet aus dem Speichermodul über die Quellfähigkeit der in Wasser gequollenen Membran (Ch 7 N 33-100 %).

Hierbei zeigt sich, dass durch die Glycerinzugabe oder durch die Quellung in Wasser sich die

---

Verhängungsmolmasse ( $M_e$ ) nur geringfügig ändert, trotz stark unterschiedlicher Werte für die Speichermodule. Durch die Wasseraufnahme in die Netzwerkstruktur verringert sich die Dichte der Polymerknäule in der Membran. So führt eine Quellung der Membran um beispielsweise den Faktor 10 auch zu einer zehnfach geringeren Dichte der Polymerknäule in der Membran. Da die Dichte der Polymerknäule in die Berechnung der Verhängungsmolmasse eingeht, werden die geringeren Werte für die Speichermodule kompensiert. Es verändert sich die Verhängungsmolmasse ( $M_e$ ) nur geringfügig.

Betrachtet man hingegen die Netzpunktdichte ( $v_e$ ) bzw. den Netzpunktabstand ( $\xi$ ) zeigt sich hier ein ganz anderer Zusammenhang. So erhöht sich durch die Quellung der Netzpunktabstand und die Netzpunktdichte nimmt dementsprechend ab.

Für die Betrachtung der Netzwerkstruktur der niedermolekularen Chitosanmembran ergibt sich daraus folgendes Bild:

- Auch bei starker Quellung der Membranen (z.B. dem. Wasser) lösen sich die physikalischen Verknüpfungspunkte nicht, d.h. die Verhängungsmolmasse verändert sich kaum. Für den Einsatz in der Wundheilung bedeutet dies, dass auch sehr stark exudierende Wunden (z.B. Brandwunden) den Zusammenhalt der Polymere untereinander kaum verändern, so dass das „Herauslösen“ von Chitosanmolekülen unwahrscheinlich ist.
- Durch die Glycerinzugabe oder das Quellen der Membranen in Wasser vergrößert sich der Netzpunktabstand. Man könnte auch sagen, dass sich die Maschen innerhalb des Netzwerkes durch das vorhandene Lösungsmittel aufweiten ohne dass hierdurch (physikalische) Verknüpfungspunkte aufgebrochen werden (siehe Abbildung 142). Hierdurch steigt u.a. die Gasdurchlässigkeit und der Flüssigkeitstransport, da Gase oder Flüssigkeiten leichter durch das Netzwerk diffundieren können.

Für den Einsatz in der Wundheilung bedeutet dies, dass sich durch z.B. eine Glycerinzugabe der Netzpunktabstand vergrößert. Hierdurch können die Permeationseigenschaften der Membran auf wenig oder stark exudierende Wunden zugeschnitten werden. Bei wenig exudierenden Wunden ist eine geringe Permeation bzw. Flüssigkeitstransport angezeigt, um ein Austrocknen des Wundgrundes zu verhindern. Bei stark exudierenden Wunden kommt es durch Aufnahme von Wundflüssigkeit in die Membran zu einer zusätzlichen Aufweitung der Netzwerkmaschen, die den Flüssigkeitstransport nach außen verstärken und somit die Bildung einer nicht erwünschten

Ansammlung von Wundflüssigkeit unter der Wundaufgabe verhindern können.

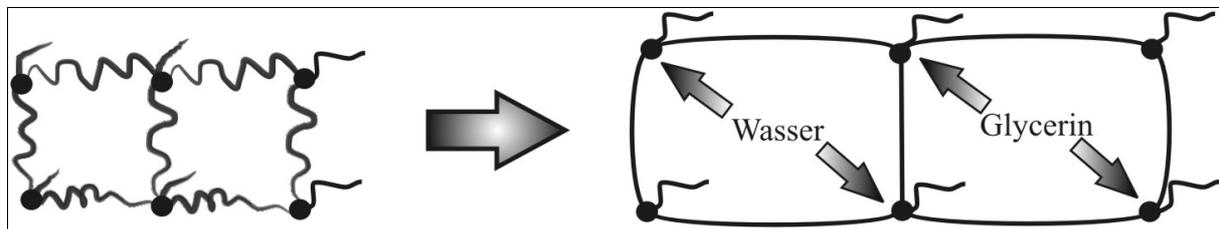
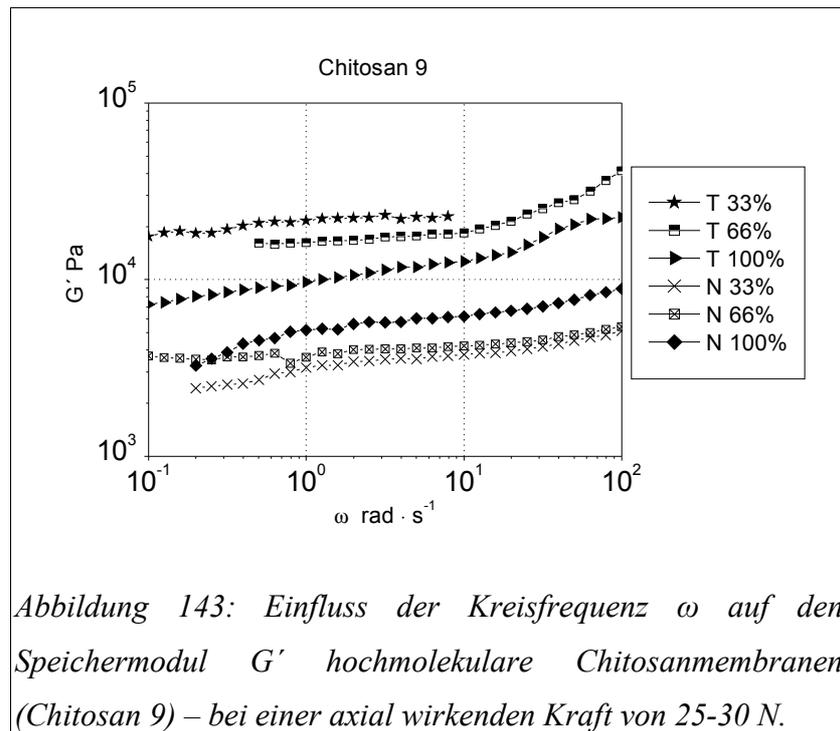


Abbildung 142: Einfluss eines Weichmachers auf die Netzwerkstruktur, links Netzwerk ohne Weichmacher - Polymerketten sind geknäuelte; rechts aufgeweitete Netzwerkmaschen durch Weichmacher - Polymerketten sind gesteckt.

Bei Verwendung von hochmolekularem Chitosan (Chitosan 9) zur Herstellung von Chitosanmembranen zeigt die Auftragung der Speichermodule  $G'$  gegen die Kreisfrequenz  $\omega$  eine geringere Differenz der Speichermodule zwischen den in Wasser gequollenen Membranen und den trockenen Membranen. Durch die geringere Quellfähigkeit der hochmolekularen Membran in Wasser, werden für die Differenz zwischen den trockenen und feuchten Membranen sechsfach niedrigere Werte für der Speichermodul ermittelt. Bei den niedermolekularem Chitosan (Chitosan 7) wurden ca. 11 Fach geringere Wert für die Differenz der Speichermodule ermittelt. Diese Differenz entspricht sehr gut den Quellfaktoren (siehe auch Kapitel 5.2.4) für eine Chitosanmembran ohne Glycerin (Chitosan 7 = 11,47; Chitosan 9 = 5,34).



Die Kurvenverläufe der Membranen aus Abbildung 143 deuten auf eine weitestgehend permanente Netzwerkstruktur der Chitosanmembranen sowohl im trockenen wie auch im gequollenen Zustand hin. Bei den trockenen Membranen erkennt man, dass ein höherer Glyceringehalt zu geringeren Werten für der Speichermodul führt. Es fällt auf, dass die in Wasser gequollenen Membranen aus Chitosan 9 nicht die gleichen Werte für der Speichermodule ( $G' = 3433\text{-}5614$  Pa), wie es bei den niedermolekularen Chitosanmembranen der Fall ist ( $G' = 2836$  Pa), aufweisen. Insbesondere die Membranen mit einem hohen Glyceringehalt weisen höhere Werte für der Speichermodule auf. Es ist davon auszugehen, dass diese Auflagen noch eine Restmenge Glycerin enthalten. Demnach wird durch Erhöhung der Molmasse des Chitosans das Auswaschen des Glycerins aus der Membran aufgrund geringerer Diffusion vermindert.

<i>Name</i>	<i>G' [Pa]</i>	<i>M<sub>e</sub> [g/mol]</i>	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub> [cm<sup>3</sup>]</i>	<i>ξ [nm]</i>
Ch 9 T 0 %*	24326	122.600	761	5,91 E+18	5,5
Ch 9 T 33 %	22254	100.700	650	5,40 E+18	5,7
Ch 9 T 66 %	16734	107.200	693	4,07 E+18	6,3
Ch 9 T 100 %	10603	140.500	799	2,58 E+18	7,3
Ch 9 N 33 %	3433	184.000	1140	8,34 E+17	10,6
Ch 9 N 66 %	4018	166.600	1030	9,76 E+17	10,1
Ch 9 N 100 %	5614	176.600	1100	1,36 E+18	9,0

*Tabelle 38: Netzwerkstrukturparameter von Chitosanmembranen (Chitosan 9) – G' gemessene Speichermodul bei  $\omega = 2 \text{ rad/s}$  - M<sub>e</sub> berechnete Verhängungsmolmasse, P<sub>e</sub> berechneter Polymerisationsgrad von M<sub>e</sub>– v<sub>e</sub> Netzpunktdichte - ξ Netzpunktabstand*

\* Berechnet aus dem Speichermodul über die Quellfähigkeit der in Wasser gequollenen Membran (Mittelwert aus Ch 9 N 33-100 %).

Bei den hochmolekularen Chitosanmembranen erhöht sich bei den in Wasser gequollenen Membranen die Verhängungsmolmasse um ca. 35 %. Bei den zuvor beschriebenen niedermolekularen Chitosan führte die Quellung zu kaum einer Veränderung der Verhängungsmolmasse. Durch die Aufweitung der Netzwerkstruktur kommt es durch die geringere Beweglichkeit der hochmolekularen Kettensegmente auch zu einer Verlängerung der Netzwerkpunkte, was sich in der Erhöhung der Verhängungsmolmasse niederschlägt. Der Netzpunktabstand nimmt durch die geringere Quellfähigkeit der Membranen aus Tabelle 38 - im Vergleich zu den niedermolekularen Membranen (z.B. Chitosan 7) - geringere Werte insbesondere bei den maximal gequollenen Membranen an. So führt die Erhöhung des Glyceringehaltes in den niedermolekularen Chitosanmembranen (Chitosan 7) zu einem Netzpunktabstand von 5,11 (0 %) bis 6,65 (100 %) nm und in den hochmolekularen Chitosanmembranen (Chitosan 9) zu einem 7-10 % höheren Netzpunktabstand von 5,5 (0 %) bis 7,3 (100 %) nm.

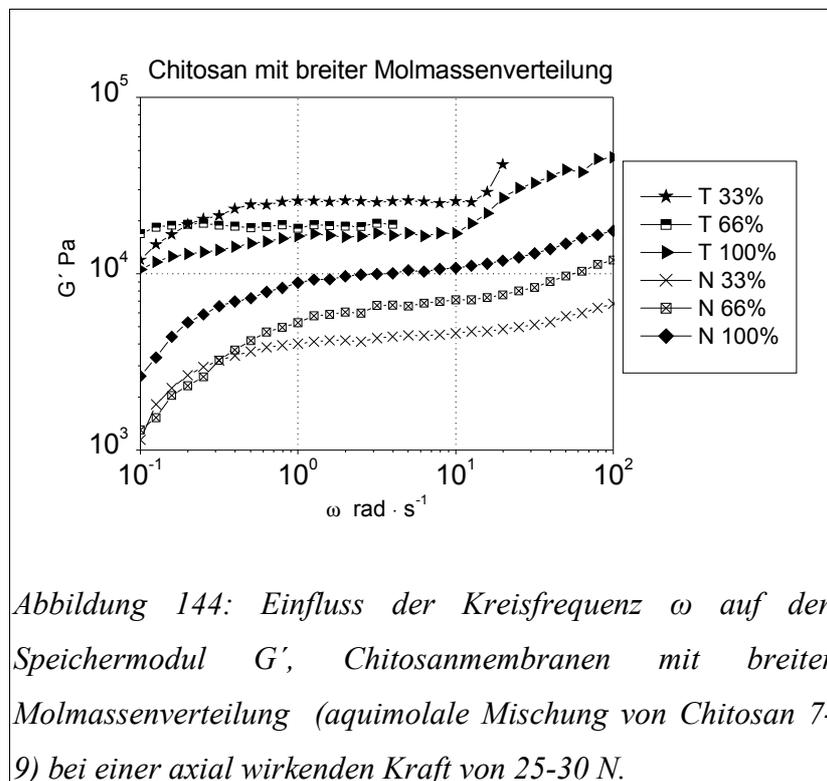
Die Tabelle 39 soll eine Übersicht über die Veränderung der Netzwerkstrukturparameter bei Erhöhung der Molmasse geben:

Molmasse	$G'$	$M_e$	$\nu_e$	$\xi$	Quellfähigkeit
niedrig	↑	↓	↑	↓	↑
hoch	↓	↑	↓	↑	↓

Tabelle 39: Beeinflussung der Netzwerkstrukturparameter bei Erhöhung der Molmasse –  $G'$  Speichermodul,  $M_e$  Verhängungsmolmasse,  $\nu_e$  Netzpunktdichte -  $\xi$  Netzpunktstand.

Es zeigt sich, dass eine höhere Molmasse des Chitosans zu geringeren Werten für die Speichermodul ( $G'$ ) führt. Hierdurch werden auch geringere Werte für die Netzpunktdichte ( $\nu_e$ ) und höhere Werte für die Netzpunktdichte ( $\xi$ ) errechnet. Die Verhängungsmolmasse ( $M_e$ ) die über die Polymerdichte der Membranen mit der Quellung verknüpft ist erhöht sich bei Verwendung von Chitosan mit einer hohen Molmasse.

Als nächstes wurden Chitosanmembranen mit einer breiten Molmassenverteilung untersucht werden. Hierzu wurden die Chitosanproben Chitosan 7-9, von denen die Molmassen bekannt sind, so abgemischt, dass eine möglichst breite Molmassenverteilung entsteht. Dieses Chitosan wurde zur Herstellung von Chitosanmembranen mit einer breiten Molmassenverteilung genutzt.



Die Schwingungsmessungen an Chitosanmembranen mit breiter Molmassenverteilung zeigen einen ähnlichen Verlauf, wie die der hochmolekularen Chitosanmembranen. So wird auch bei diesen Membranen ein Auswaschen des Glycerins aus den Membranen unterdrückt, so dass stark unterschiedliche Speichermodul für die in Wasser gequollenen Membranen gemessen werden (N 33 % - N 100 %).

In der folgenden Tabelle sind die Netzwerkstrukturparameter der Membran aus Abbildung 144 angegeben.

<i>Name</i>	<i>G' [Pa]</i>	<i>M<sub>e</sub> [g/mol]</i>	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub> [cm<sup>3</sup>]</i>	<i>ξ [nm]</i>
Ch-B T 0* %	27.940	110.900	689	6,78 E+18	5,28
Ch-B T 33 %	25.994	89.500	688	6,31 E+18	5,41
Ch-B T 66 %	18.586	100.400	695	4,51 E+18	6,05
Ch-B T 100 %	16.122	96.100	648	2,34 E+18	6,34
Ch-B N 33 %	4.201	120.400	748	1,02 E+18	9,93
Ch-B N 66 %	6.074	128.300	796	1,47 E+18	8,78
Ch-B N 100 %	9.622	130.000	807	2,34 E+18	7,52

*Tabelle 40: Netzwerkstrukturparameter von Chitosanmembranen mit einer breiten Molmassenverteilung – G' gemessene Speichermodul bei  $\omega = 2 \text{ rad/s}$  - M<sub>e</sub> berechnete Verhängungsmolmasse, P<sub>e</sub> berechneter Polymerisationsgrad von M<sub>e</sub> – v<sub>e</sub> Netzpunktdichte - ξ Netzpunktabstand.*

\* Berechnet aus dem Speichermodul über die Quellfähigkeit der in Wasser gequollenen Membran

Die berechneten Netzwerkstrukturparameter aus Tabelle 40 entsprechen stark denen einer hochmolekularen Chitosanmembran (siehe Tabelle 38). Hierbei ändert sich die Verhängungsmolmasse der feuchten Membranen nur geringfügig, was eher den Folien aus Chitosan geringer Molmasse entspricht.

### **Chitosanhydrogele**

Alle Chitosanhydrogele wurden aus einer 0,75 % essigsäuren Chitosanlösung hergestellt.

Chitosanlösungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden mit Dialdehyden

unterschiedlicher Kettenlänge bei einer Temperatur von 60 °C vernetzt.

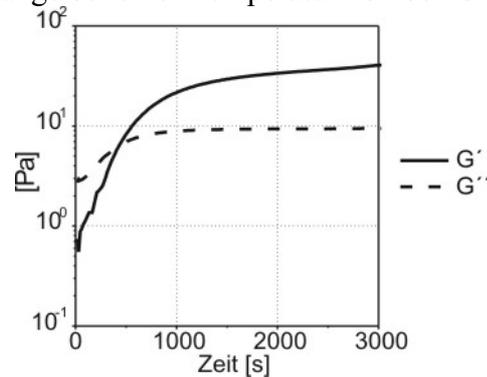


Abbildung 145: Speicher- ( $G'$ ) und Verlustmodul ( $G''$ ) eines Chitosanhydrogels.

Die Vernetzungsreaktion wurde mit Hilfe rheomechanischer Oszillationsuntersuchungen detektiert. Bei allen erzeugten Netzwerken handelt es sich im rheologischen Sinne um Gele, da der Speichermodul ( $G'$ ) schon nach wenigen Minuten Reaktionszeit den Verlustmodul ( $G''$ ) übertrifft (siehe Abbildung 145). In den folgenden Abbildungen wird wegen der besseren Übersichtlichkeit auf die Darstellung des Verlustmoduls ( $G''$ ) verzichtet.

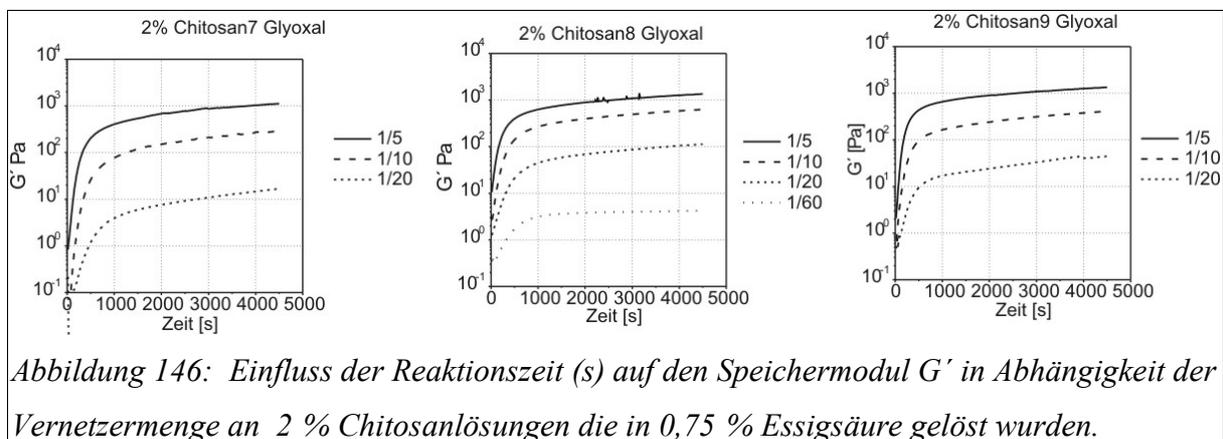


Abbildung 146: Einfluss der Reaktionszeit ( $s$ ) auf den Speichermodul  $G'$  in Abhängigkeit der Vernetzermenge an 2 % Chitosanlösungen die in 0,75 % Essigsäure gelöst wurden.

Die in Abbildung 146 angegebenen Vernetzermengen beziehen sich auf die Stoffmengenverhältnisse zwischen Glyoxal und Chitosan (z.B. 1/5 –  $n_{\text{Glyoxal}}/n_{\text{Chitosan}}$ ). Die Stoffmenge des Chitosan wird über die Momomermolmasse ermittelt.

Bei einem direkten Vergleich der Oszillationsmessung aus Abbildung 146, zeigt sich, dass eine Zunahme der Molmasse auch die Werte für die Speichermodule erhöht. Ein niedriger durchschnittlicher Deacetalisierungsgrad des Chitosans führt zu einer geringen Netzwerkbildung. Bei diesen Verbindungen stehen nicht mehr so viele Aminogruppen für die

Reaktion mit den Dialdehyden zur Verfügung. Hierdurch werden auch beim Chitosan 9 mit der höchsten Molmasse aber auch dem niedrigsten durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad geringere Werte für die Speichermodule ermittelt.

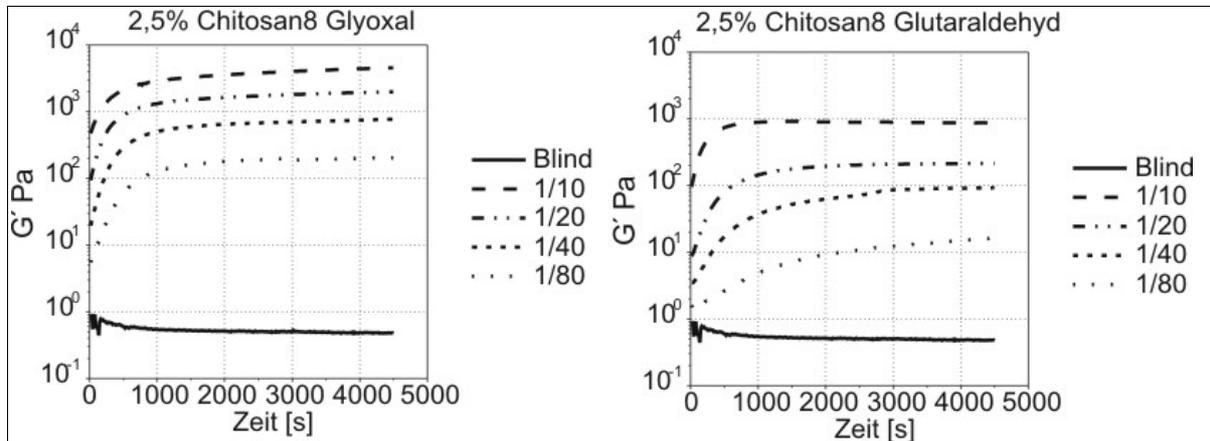


Abbildung 147: Einfluss der Reaktionszeit (s) auf den Speichermodul  $G'$  in Abhängigkeit der Kettenlänge des Vernetzers an 2,5 % Chitosanlösungen die in 0,75 % Essigsäure gelöst wurden.

Bei einem Vergleich der hergestellten Hydrogele bei Verwendung unterschiedlicher Vernetzer zeigt sich, dass mit dem kürzeren Vernetzer (Glyoxal) ein wesentlich stärkeres Hydrogel entsteht als bei Verwendung eines langkettigeren Vernetzers (Glutaraldehyd). Besonders deutlich zeigt sich dieser Effekt bei einer geringen Vernetzerkonzentration in der Lösung. Des Weiteren zeigt das Chitosan, das mit Glyoxal (kurzer Vernetzer) zur Reaktion gebracht wurde eine schnellere Plateaubildung, als die Chitosanlösung die mit dem Glutaraldehyd umgesetzt wurde. Dieser Effekt zeigt sich besonders deutlich bei geringen Vernetzerkonzentrationen. Dies deutet auf eine geringere Reaktionskinetik des Glutaraldehyds bei dieser Reaktion hin.

In Tabelle 41 sind die Netzwerkstrukturparameter der Chitosanhydrogele aus Abbildung 147 angegeben. Diese wurden über das gemessene Speichermodul ( $G'$ ) nach einer Zeit von 3000 s berechnet.

Name	$G'$ [Pa]	$M_e$ [g/mol]	$P_e$	$v_e$ [cm <sup>3</sup> ]	$\xi$ [nm]
Glyoxal 1/10	4010	18.600	115	8,1E+17	10,72
Glutaraldehyd 1/10	894	83.300	517	1,8E+17	17,68
Glyoxal 1/20	1800	41.400	257	3,64E+17	14,01

<i>Name</i>	<i>G' [Pa]</i>	<i>M<sub>e</sub> [g/mol]</i>	<i>P<sub>e</sub></i>	<i>v<sub>e</sub> [cm<sup>3</sup>]</i>	<i>ξ [nm]</i>
Glutaraldehyd 1/20	208	357.900	2223	4,21E+16	28,75
Glyoxal 1/40	700	106.300	660	1,42E+17	19,19
Glutaraldehyd 1/40	90	827.100	5137	1,82E+16	38,02
Glyoxal 1/80	190	391.800	2433	3,84E+16	29,63
Glutaraldehyd 1/80	12,3	6.052.100	37591	2,49E+15	73,80

*Tabelle 41: Netzwerkstrukturparameter von Chitosanhydrogelen in Abhängigkeit der Vernetzerlänge (2,5 % Chitosan & 0,75 % Essigsäure).*

Durch die eingesetzten Dialdehyde (Glyoxal und Glutaraldehyd) entstehen kovalent verknüpfte Netzwerkpunkte. Durch einen kurzkettigen Vernetzer (Glyoxal) entstehen durch den kurzen Bindungsabstand zwischen den Polymerketten sehr „kompakte“ Vernetzungspunkte. Die höhere Kettenlänge des langen Vernetzers (Glutaraldehyd) führt zu einer besseren Beweglichkeit der Vernetzungspunkte und somit auch zu geringeren Werten des Speichermoduls.

Die errechnete Verhängungsmolmasse ( $M_e$ ) aus Tabelle 41 zeigen wesentlich höhere Werte als sie bei der zugegebenen Vernetzerkonzentration zu erwarten sind. So zeigt das Chitosanhydrogel das mit 1/10 Glyoxal bzw. 1/10 Glutaraldehyd hergestellt wurde zeigt für Glyoxal einen 11,5-fach höheren Wert und für Glutaraldehyd einen 51,7-fach höheren Wert für die Verhängungsmolmasse. Dies deutet darauf hin, dass nur ein geringer Teil der zugegebenen Vernetzer zur Ausbildung eines kovalent verknüpften Netzwerkes beiträgt. Eine mögliche Ursache ist, dass nur ein geringer Teil der Vernetzer, nachdem sie eine kovalente Verknüpfung mit dem Chitosan eingegangen sind, eine Verbindung zu einem weiteren Polymer aufbauen können.

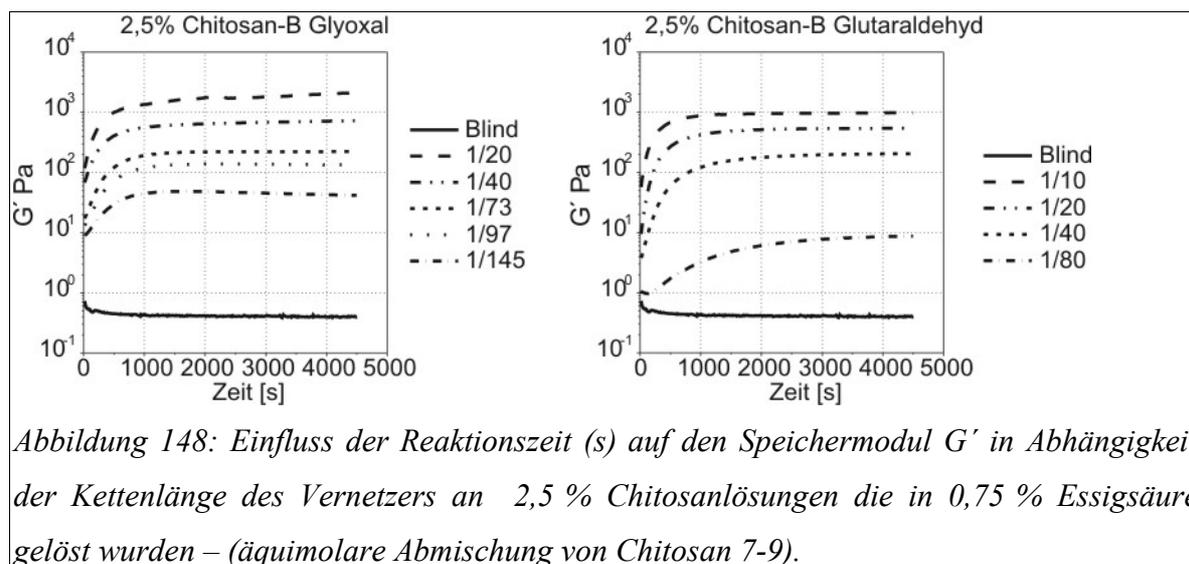


Abbildung 148: Einfluss der Reaktionszeit (s) auf den Speichermodul  $G'$  in Abhängigkeit der Kettenlänge des Vernetzers an 2,5 % Chitosanlösungen die in 0,75 % Essigsäure gelöst wurden – (äquimolare Abmischung von Chitosan 7-9).

Die Hydrogele in Abbildung 148 wurde aus einem Chitosan mit breiter Molmassenverteilung hergestellt. Dieses Chitosan wurde aus Chitosan 7-9 durch ein äquimolares Abmischen hergestellt. Die errechnete viskosimetrische Molmasse ( $M_n = 386.000$  g/mol) des abgemischten Chitosans ist etwas höher als die viskosimetrische Molmasse ( $M_n = 318.000$  g/mol) von Chitosan 8. Es werden dem entsprechend etwas höhere Werte für die Speichermodule bestimmt (bei 1/10 Vernetzer ca. 10 % höhere Werte). Die Plateauwerte für die Speichermodule werden durch die breite Molmassenverteilung etwas schneller erreicht. Dies kann durch die höhere Kettenbeweglichkeit der niedermolekularen Chitosananteile in der abgemischten Chitosanprobe erklärt werden. Hierdurch können die Chitosanmoleküle an die schon ein Dialdehyd kovalent gebunden ist, schneller einen weiteren Partner für die zweite kovalente Bindung und damit Netzpunktbildung finden.

### 5.3.6 Permeabilität und Flüssigkeitstransport der Chitosanmembranen

Die Permeabilität der Membranen ist für die Applikation als Wundauflage neben der Barrierefunktion der Membranen eine zentrale Materialeigenschaft.

Die Membran soll bei dem Prinzip der feuchten Wundheilung einen Gasaustausch zwischen Wundflüssigkeit und Umgebungsluft ermöglichen, ohne dass pathogene Keime von außen in die Wunde gelangen können.

Es wurden zunächst Chitosanacetat Membranen mit unterschiedlichem Glyceringehalt

untersucht. Zum besseren Vergleich wurde die Dicke aller hier aufgeführten Chitosanmembranen auf 100  $\mu\text{m}$  normiert.

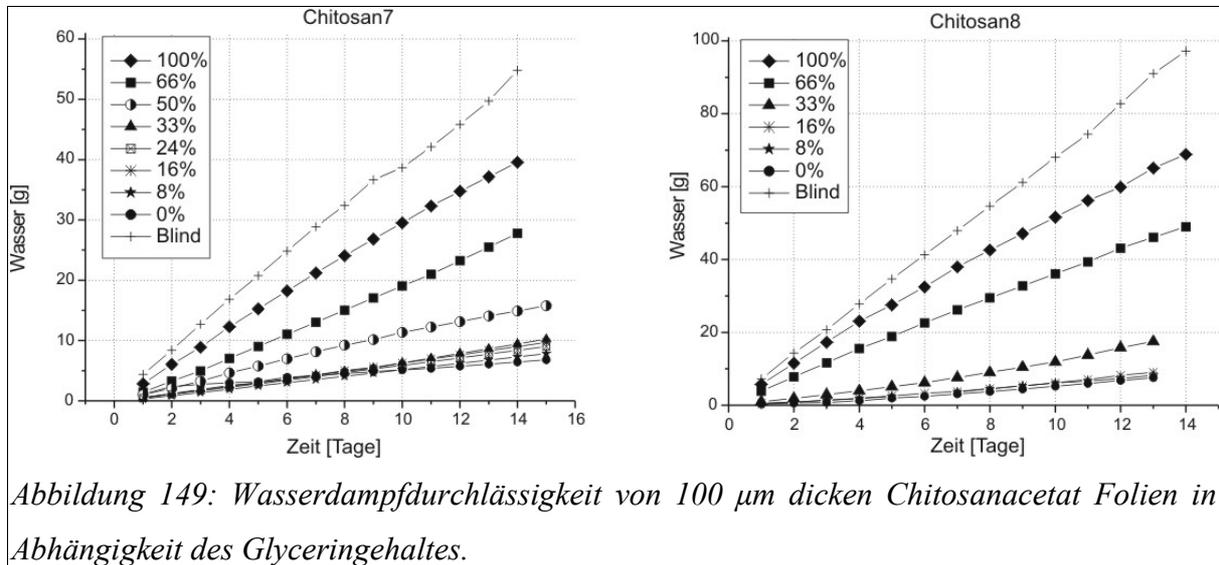


Abbildung 149: Wasserdampfdurchlässigkeit von 100  $\mu\text{m}$  dicken Chitosanacetat Folien in Abhängigkeit des Glyceringehaltes.

In Abbildung 149 erkennt man deutlich, dass durch eine Erhöhung des Glyceringehaltes die Wasserdampfdurchlässigkeit stark erhöht werden kann. Es zeigt sich, dass beim Chitosan 7 mit der geringsten Molmasse - in der Abbildung 149 links - erst bei einem Zusatz von 50 % Glycerin (und mehr) die Permeationsfähigkeit gegenüber gasförmigen Wasser erhöht wird. Bei Chitosan 8 mit einer höheren Molmasse - in der Abbildung 149 rechts - ist schon ein Zusatz von 33 % Glycerin (und mehr) ausreichend, um die Permeation zu erhöhen.

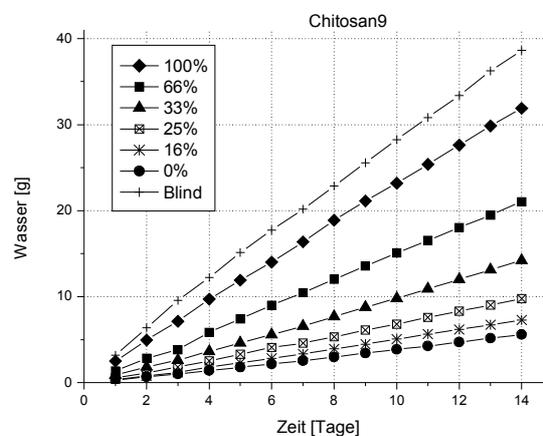


Abbildung 150: Wasserdampfdurchlässigkeit von 100  $\mu\text{m}$  dicken Chitosanacetat Folien in Abhängigkeit des Glyceringehaltes.

In Abbildung 150 wurde Chitosan 9 mit der höchsten Molmasse im Vergleich zu Chitosan 7 und 8 zur Membranherstellung verwendet. Hier zeigt sich, dass auch schon geringe Mengen an Glycerin die Durchlässigkeit der Membranen erhöhen. Eine Art Grenzwert für den Glycingehalt, bei dem die Permeationseigenschaften sprunghaft ansteigen, gibt es hier nicht. Es zeigt sich hierbei ein eher linearer Verlauf des Permeationsvermögens.

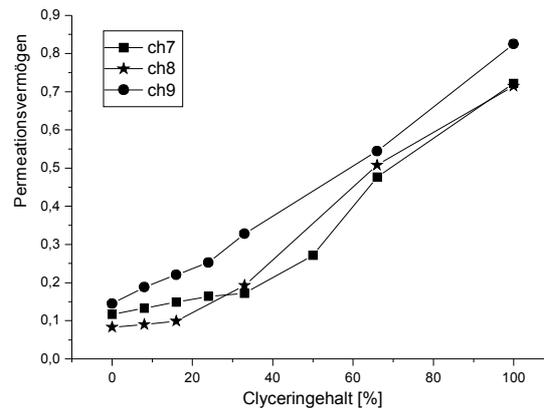


Abbildung 151: Permeationsvermögen verschiedener 100  $\mu\text{m}$  dicken Chitosaneacetat Folien. (ch7 = Chitosan 7; ch8 = Chitosan 8; ch9 = Chitosan 9).

In Abbildung 151 ist das Permeationsvermögen in Abhängigkeit des Glycingehaltes in den Membranen dargestellt. Es zeigt sich hierbei deutlich, dass beim Chitosan 7 und Chitosan 8 durch eine Zugabe von bis zu 33 % Glycerin das Permeationsvermögen kaum verändert wird. Hiernach kommt es zu einem starken Anstieg des Permeationsvermögens. Dieser entspricht fast dem des Chitosans 9. Beim Chitosan 9 mit der höchsten Molmasse kommt es zu einem eher linearen Verlauf des Permeationsvermögens.

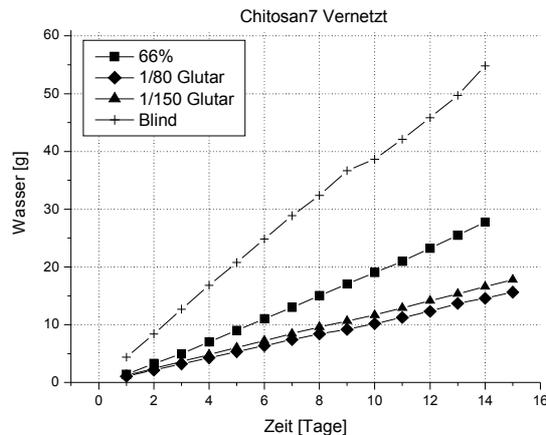


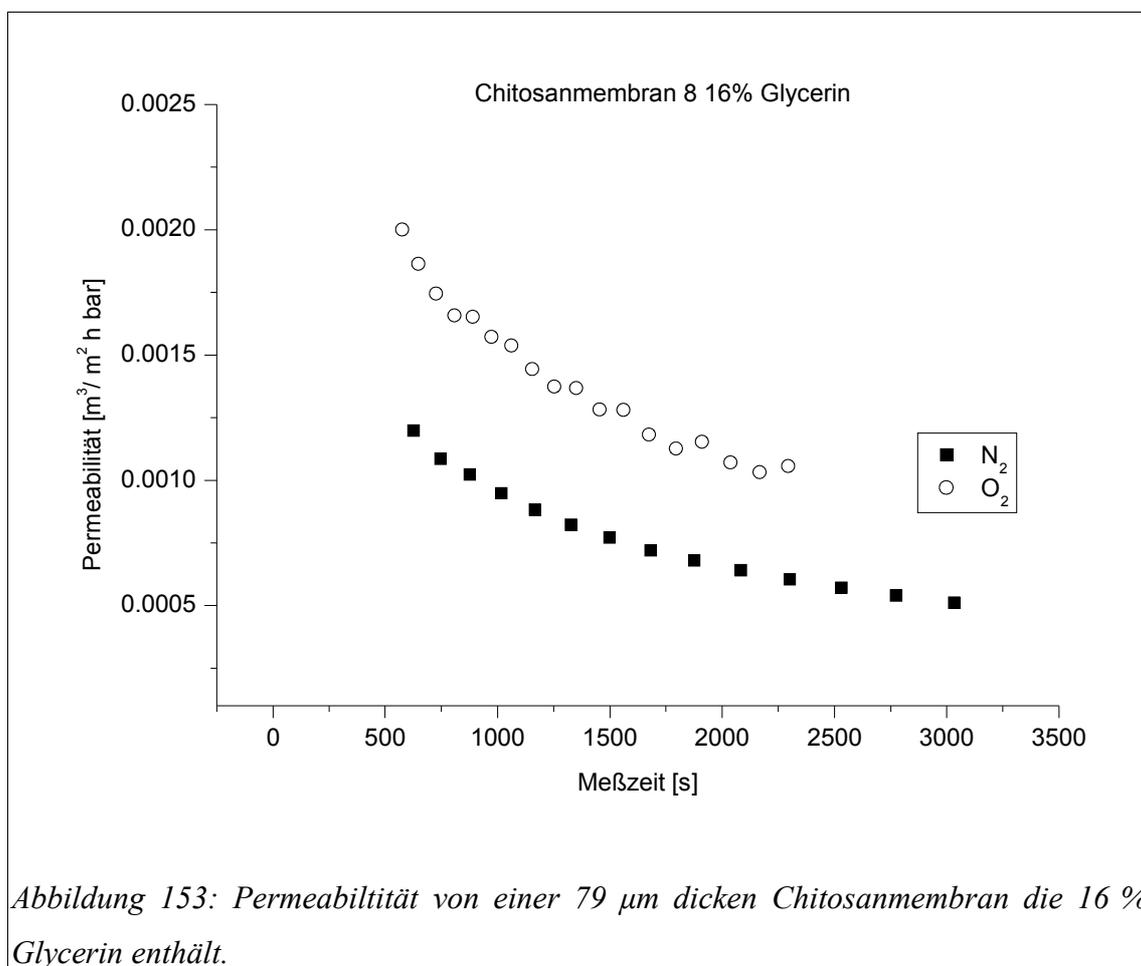
Abbildung 152: Permeationvermögen verschiedener 100  $\mu\text{m}$  dicken Chitosaneacetat Folien. (66 % Glycerin in einer unvernetzten (66 %), und zwei mit Glutaraldehyd (1/80 - 1/150) vernetzten Chitosan 7 Membran).

In Abbildung 152 sind zwei mit Glutaraldehyd vernetzte Membranen die 66 % Glycerin enthalten und eine unvernetzte Chitosanmembran mit 66 % Glycerin abgebildet. Die Vernetzung mit Glutaraldehyd verringert das Permeationsvermögen um ca. 40 % gegenüber der unvernetzten Membran. Auch schon eine geringe Vernetzermenge von 1/150 (nVernetzer/nPolymermonomer) verringert die Durchlässigkeit fast ebenso stark wie die Membran mit der ca. doppelten Vernetzermenge.

Es zeigt sich, dass hinsichtlich der Permeationseigenschaften der Chitosanmembranen diese sich sehr gut durch unterschiedliche Glycerinmengen in den Auflagen beeinflussen lassen. So kann das Permeationvermögen von ca. 10 % ohne Zusatz von Glycerin auf ca. 85 % bei einem 100 % Glyceringehalt gesteigert werden. Hinsichtlich der Wundheilung kann so die Gasdurchlässigkeit und der Flüssigkeitstransport beliebig eingestellt werden. So kann bei eher trockenen Wunden eine Auflage mit einem geringen Glyceringehalt Verwendung finden. Durch die geringere Diffusion wird die Wunde ausreichend feucht gehalten und so ein optimales Wundmilieu für die Heilung geschaffen. Bei stark exudierenden Wunden wie dies z.B. häufig bei Brandwunden der Fall ist, kann eine Chitosanmembran mit einem hohen Glyceringehalt Verwendung finden, da diese die Flüssigkeit nach außen transportiert. Hierdurch kommt es zur Verhinderung einer zu hohen Wundflüssigkeitsmenge unter der Auflage.

Des Weiteren wurde die Sauerstoff- und Stickstoff- Permeabilität einer Chitosanmembran mit dem Prinzip der Druckanstiegsmessung bestimmt. Bei diesem Verfahren wird die die einen

Seite der Membran einen Vakuum ausgesetzt und die andere Seite den zu untersuchenden Gasen. Hierdurch ist es nur eingeschränkt möglich Chitosanmembranen die Glycerin enthalten zu vermessen, da das austretende Glycerin die Messungen verfälschen würde (Abbildung 153).

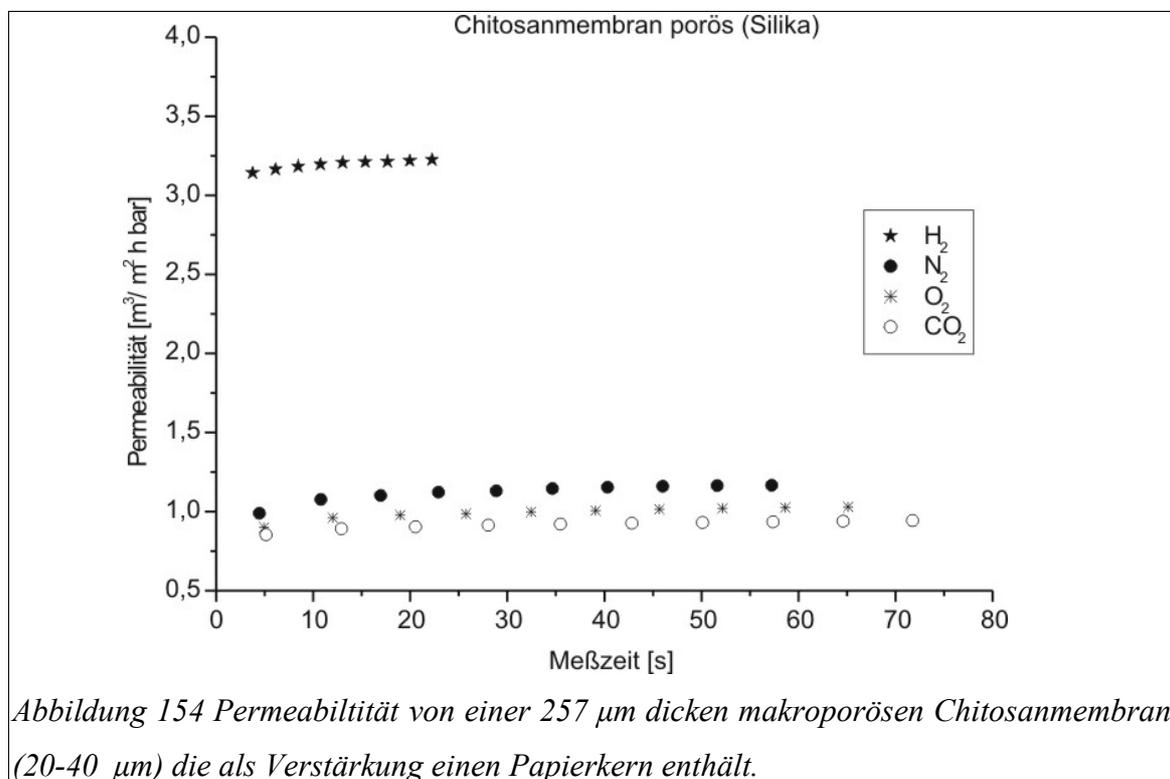


Es wird im Vergleich zu den untersuchten Symplexmbranen einen sehr viel geringere Permeabilität gegenüber Sauerstoff und Stickstoff (Faktor > 1000) festgestellt. Die geringere Durchlässigkeit ist nur bedingt auf die höhere Dicke der Chitosanmembranen zurückzuführen.

Gas	Permeabilität [ $\text{m}^3 / \text{m}^2 \text{ h bar}$ ]	Selektivität
Stickstoff	0,00064	-
Sauerstoff	0,00137	0,47

Tabelle 42: Permeabilität und Selektivität von einer 79  $\mu\text{m}$  dicken Chitosanmembran (Chitosan 8) die 16 % Glycerin enthält.

Chitosanmembranen zeigen in der Tabelle 42 eine mäßige Sauerstoff Selektivität von ca. 0,5 gegenüber Stickstoff. Der Permeatfluss ist jedoch relativ gering. Es tritt jedoch noch 137 ml Sauerstoff durch eine Membran mit einer Fläche von 1 dm<sup>2</sup> bei einem Druckunterschied von einem bar. Dies ist für die Anwendung als Wundversorgungsmaterial ausreichend, da sich durch den Gastransport kein anaerobes Milieu mit Wundbett ausbilden kann. Durch den Meßaufbau war es leider nicht möglich Chitosanmembranen mit einem hohen Glyceringehalt zu vermessen. Durch das Glycerin kommt es zu einem Aufquellen der Netzwerkstruktur und damit auch einem größeren Netzpunktabstand. Dies führte schon bei der Untersuchung der Wasserdampfdurchlässigkeit zu einer höheren Permeabilität. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bei Chitosanmembranen, die einen hohen Glyceringehalt aufweisen, die Sauerstoffdurchlässigkeit durch die Vergrößerung der Netzpunktabstände (siehe Kapitel 5.3.5) erhöht wird. Eine weitere Möglichkeit die Permeationsfähigkeit einer Chitosanmembran zu erhöhen, ist die Herstellung einer porösen Chitosanmembran z.B. mit Hilfe von Silikatpartikeln. Die Permeationsfähigkeit einer solchen Chitosanmembran ist in Abbildung 154 abgebildet.



Es wird im Vergleich zu der untersuchten kompakten Chitosanmembran (Abbildung 153) eine

sehr viel höhere Permeabilität gegenüber Sauerstoff und Stickstoff (Faktor ca. 1000) festgestellt. Trotz der höheren Dicke der porösen Chitosanmembran (257  $\mu\text{m}$ ) im Vergleich der kompakten Chitosanmembran (79  $\mu\text{m}$ ), kann ein hohes Permeationsvermögen dieser Membranen festgestellt werden. Die ermittelten Permeabilitäten und Selektivitäten dieser porösen Chitosanmembran ist in Tabelle 43 dargestellt.

Gas	Permeabilität [ $\text{m}^3/\text{m}^2 \text{ h bar}$ ]	Selektivität
Wasserstoff	3,18	-
Stickstoff	1,12	0,35
Sauerstoff	0,99	0,31
Kohlendioxid	0,92	0,29

*Tabelle 43: Permeabilität und Selektivität von einer 257  $\mu\text{m}$  dicken makroporösen Chitosanmembran (Porendurchmesser 20-40  $\mu\text{m}$ ) die als Verstärkung einen Papierkern enthält.*

Dieses hohe Permeationsvermögen ist auf eine offenporige, schaumartige Morphologie dieser makroporösen Membranen zurückzuführen (vergleiche Kapitel 5.3.8). Es kann also nicht nur die spezifische Oberfläche der porösen Chitosanmembran gegenüber der glatten kompakten Chitosanmembran erhöht werden, sondern auch die Permeationsfähigkeit gegenüber Gasen. Hierdurch wird ein ausreichender Sauerstofftransport durch die Membran gewährleistet wodurch die Ausbildung eines anaeroben Wundmilieu verhindert werden kann.

### 5.3.7 Flüssigkeitstransport

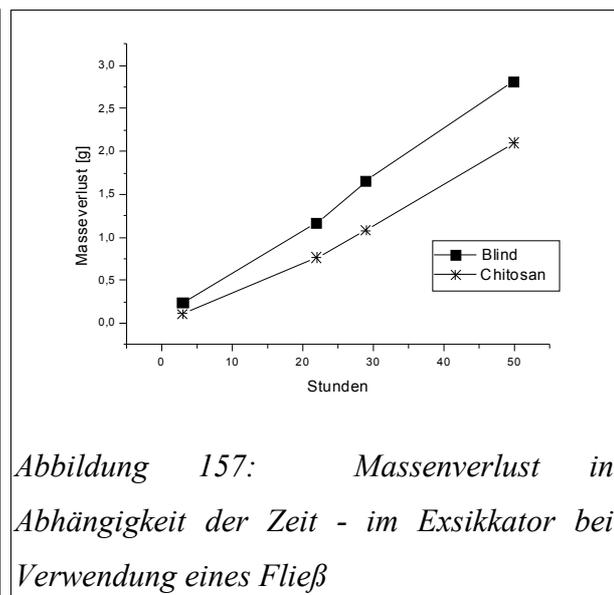
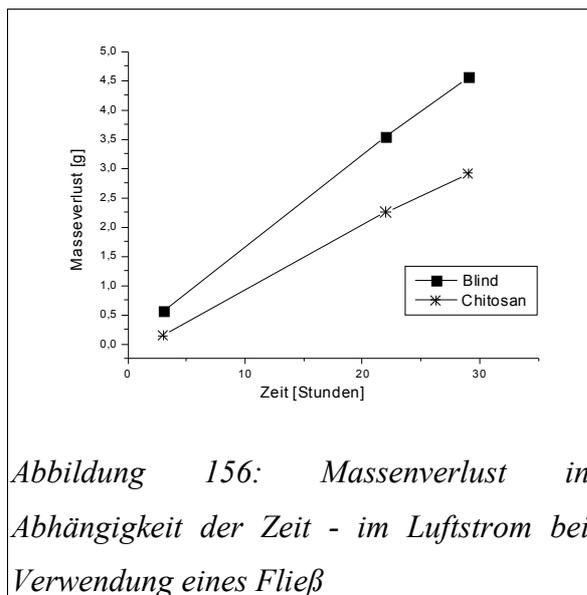


*Abbildung 155: Versuchsaufbau*

In einen kleinen Kunststoffbehälter wird ein Schwamm oder ein saugfähiges Fließ gegeben.

Anschließend wird in den Behälter 5 ml einer Ringer-Lactat Lösung gegeben. Der Behälter wird mit einer Chitosanmembran (Chitosan 9), die 2 % Glycerin als Weichmacher enthält mit Hilfe eines Sekundenklebers verschlossen. Der Behälter wird im Abzug im kontinuierlichen Luftstrom und im Exsikkator bei 0 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Durch Wägung wird der Massenverlust der Behälter bestimmt.

In Abbildung 156 und Abbildung 157 sind die Permatationsergebnisse bei Raumtemperatur und bei 0 % Luftfeuchtigkeit dargestellt. Bei beiden Untersuchungen wurde als Simulations- und Speichermaterial für die Ringer-Lactat Lösung ein sehr saugfähiges Fließ verwendet. Durch die Kapilarwirkung wird durch das verwendete Fließ die Ringer-Lactat Lösung kontinuierlich zu der Membran geleitet. Dies soll die Wundexudatbildung einer Wunde simulieren.

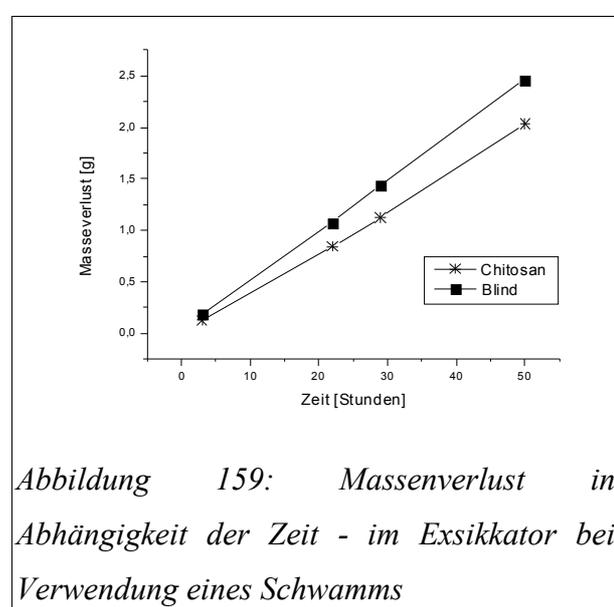
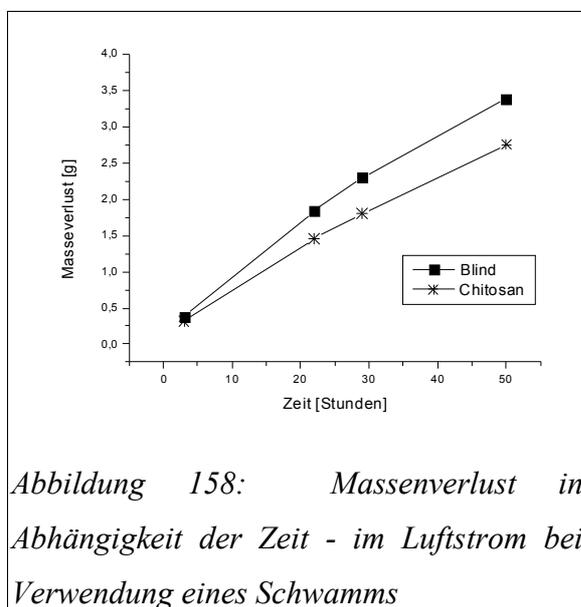


Der angegeben Bildwert (Blind) in Abbildung 156 und Abbildung 157 zeigt den Masseverlust des verwendeten Behälters, der nicht mit einer Chitosanmembran verschlossen wurde. Dieser Wert dient bei dieser Untersuchung als Referenz und gibt den maximalen Massenverlust unter den verwendeten Bedingungen an.

Die untersuchte ca. 100 µm dicke Chitosanmembran weist nach 28 Stunden ein Flüssigkeitstransportvermögen von ca. 65 % im Vergleich zu der Referenz bei der Untersuchung bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 0 % auf (Abbildung 157). Das Rückhaltevermögen dieser Membran weist dem entsprechend 35 % gegenüber der Referenz

auf. Die Untersuchung der Chitosanmembran im Luftstrom weist ein Flüssigkeitstransportvermögen von ca. 64 % im Vergleich zu der Referenz auf (Abbildung 156). Es werden also sehr ähnliche Werte für das Rückhaltevermögen und das Transportvermögen unter diesen Bedingungen für die Chitosanmembran ermittelt. Dieses Ergebnis ist insbesondere durch den unterschiedlichen Masseverlust (Luftstrom Blind 28 Stunden = 3,6 g - Exikkator Blind 28 Stunden = 1,7 g) bei dieser Untersuchung interessant. So verändert ein um 112 % höherer Massenverlust nach 28 Stunden bei der Untersuchung im Luftstrom, im Vergleich zu der Untersuchung im Exsikkator, dass Flüssigkeitstransportvermögen (64-65 %) der Chitosanmembran nicht.

In Abbildung 158 und Abbildung 159 sind die Permeationsergebnisse bei Raumtemperatur und bei 0 % Luftfeuchtigkeit dar gestellt. Bei beiden Untersuchungen wurde als Simulations- und Speichermaterial für die Ringer-Lactat Lösung ein ein Synthetischschwamm verwendet. Durch die Kapilarwirkung wird durch den verwendeten Synthetischschwamm die Ringer-Lactat Lösung kontinuierlich zu der Membran geleitet. Dies soll die Wundexudatbildung einer Wunde simulieren.



Die untersuchte ca. 100 µm dicke Chitosanmembran weist nach 28 Stunden ein Flüssigkeitstransportvermögen von 78 % im Vergleich zu der Referenz bei der Untersuchung im Luftstrom auf. Das Rückhaltevermögen dieser Membran weist dem entsprechend 22 % gegenüber der Referenz auf.

---

Die Untersuchung der Chitosanmembran im Exsikkator weist ein identisches Flüssigkeitstransportvermögen von ca. 78 % im Vergleich zu der Referenz auf.

Auch bei dieser Untersuchung verändert ein um 66 % höherer Massenverlust nach 28 Stunden bei der Untersuchung im Luftstrom, im Vergleich zu der Untersuchung im Exsikkator, das Flüssigkeitstransportvermögen (78 %) der Chitosanmembran nicht. Das um ca. 22 % größere Transportvermögen bei Verwendung eines Synthetischschwamms ist vermutlich auf den besseren Kontakt des Schwamms mit der Chitosanmembran zurückzuführen. Hierdurch wird eine größere Fläche der Membran kontinuierlich mit der Ringer-Lactat-Lösung benetzt.

Dieser einfache Versuchsaufbau zeigt sehr gut das hohe Flüssigkeitstransportvermögen der Chitosanmembranen im gequollenen, feuchten Zustand. So zeigt sich in dieser Simulation einer stark exudierenden Wunde, dass eine Chitosanmembran mit 2 % Glycerin einen sehr hohen Flüssigkeitstransport gewährleistet. Dieses Eigenschaftsprofil macht die Chitosanmembranen, insbesondere für die Versorgung von stark exudierenden Wunden wie dies z.B. bei Brandwunden der Fall ist, besonders wertvoll.

### **5.3.8 Morphologie der Chitosanmembranen**

Es wurden mit verschiedenen Methoden (siehe Kapitel 5.3.1) unterschiedlich mikrostrukturierte Chitosanmembranen hergestellt.

#### **5.3.8.1 Glatte Chitosanmembranen**

Glatte Chitosanmembranen (Abbildung 160) werden durch Auflösen des Chitosans in Essigsäure und anschließendem Aufrakeln der Lösung auf ein Trägermaterial, mit anschließender Trocknung erhalten.

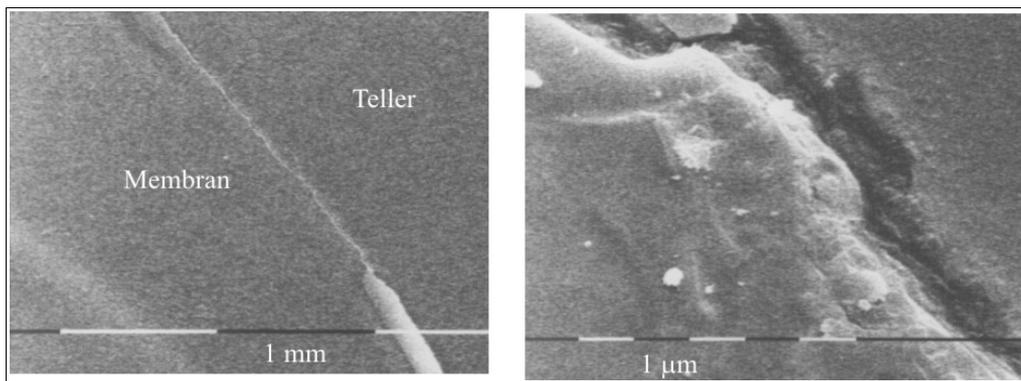


Abbildung 160: glatte Chitosanmembranen Oberflächenaufnahme von links: 170 und 1360 fache Vergrößerung

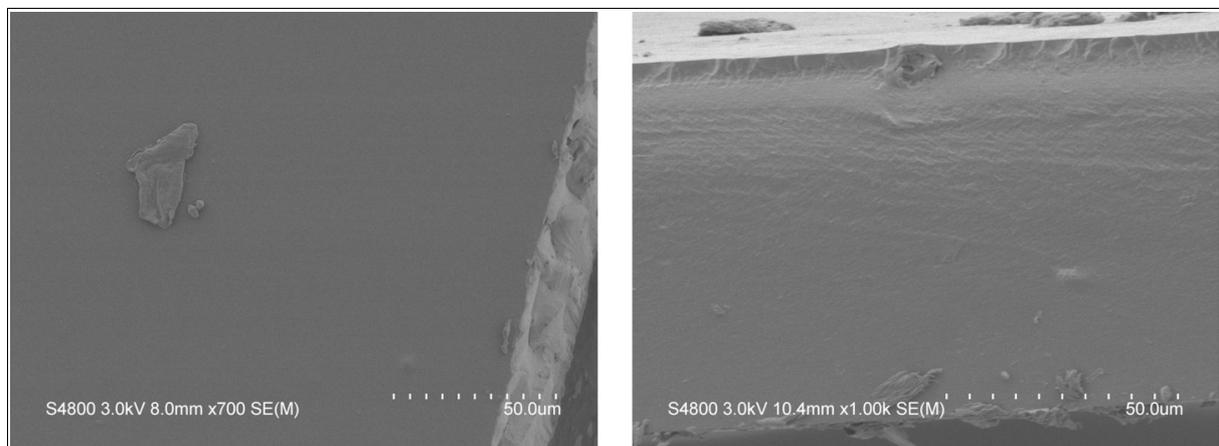


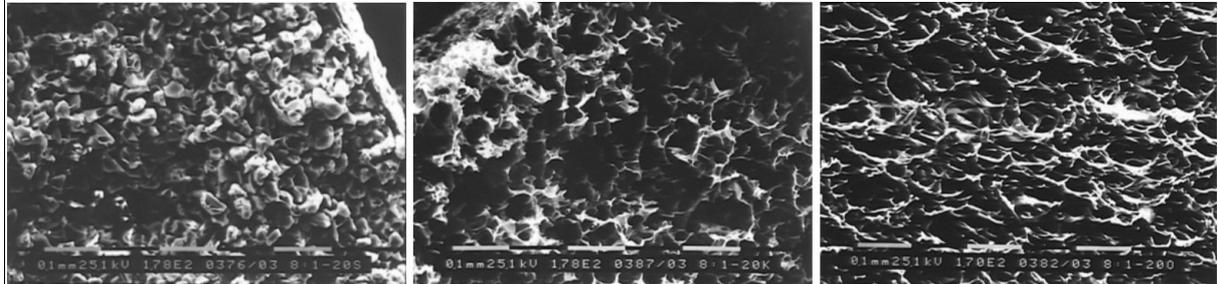
Abbildung 161: Kryo-Präparierte Chitosanmembranen - links Oberfläche, rechts Querschnitt

Die bei 60 °C getrockneten (Abbildung 160) und Kryo-Präparierten (Abbildung 161) Chitosanmembranen zeigen keine Unterschiede hinsichtlich Ihrer Morphologie. Es handelt sich um eine sehr glatte Oberfläche, ohne dass eine Strukturierung der Oberfläche vorliegt. Der Querschnitt zeigt eine kompakte Membran ohne Anzeichen von Strukturierung, die erkennbaren feinen Längsrillen sind durch das Brechen entstanden und kein Hinweis auf eine Feinstrukturierung.

### 5.3.8.2 Chitosanmembran mit Makroporen

Chitosanmembranen mit Makroporen können durch Silikate mit einer definierten Korngröße erhalten werden. Hierzu werden in die essigsaurer Chitosanlösung Silikate hinzugefügt und die

Lösung flächig ausgezogen und getrocknet. Diese Silikatpartikel werden durch anschließendes Auskochen mit Natronlauge aus der Chitosanmembran entfernt.



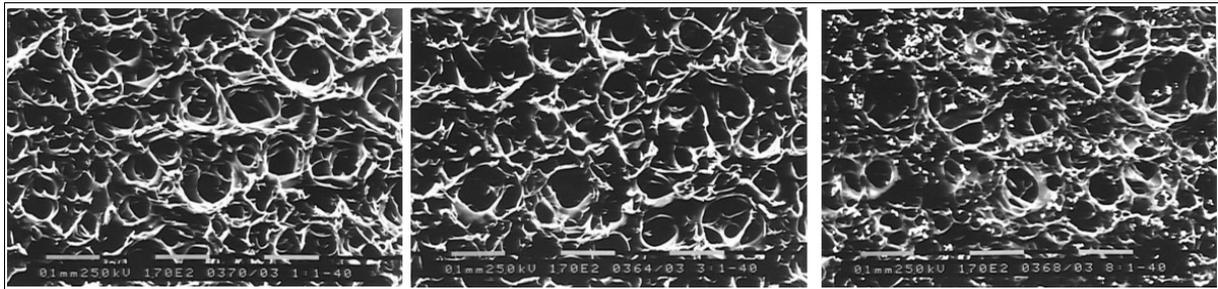
*Abbildung 162: von links nach rechts Chitosanmembran mit Silikaten (Kante), identische Chitosanmembran ohne Silikate (Kante), Oberflächenaufnahme ohne Silikate. Der angegebene Maßstab in den Aufnahmen entspricht 0,1 mm.*

In der linken Aufnahme der Abbildung 162 ist der Querschnitt einer Chitosanmembran, die Silikate mit einer mittleren Korngröße von 20-40  $\mu\text{m}$  aufweist, abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Silikate homogen in der Chitosanmembran verteilt vorliegen.

Die mittlere Aufnahme zeigt die gleiche Chitosanmembran nach dem Herauslösen der Silikate durch Natronlauge. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gesamte Membran in dieser Querschnittsaufnahme mit Poren durchsetzt ist. Die Membran erhält hierdurch eine schwammartige Struktur.

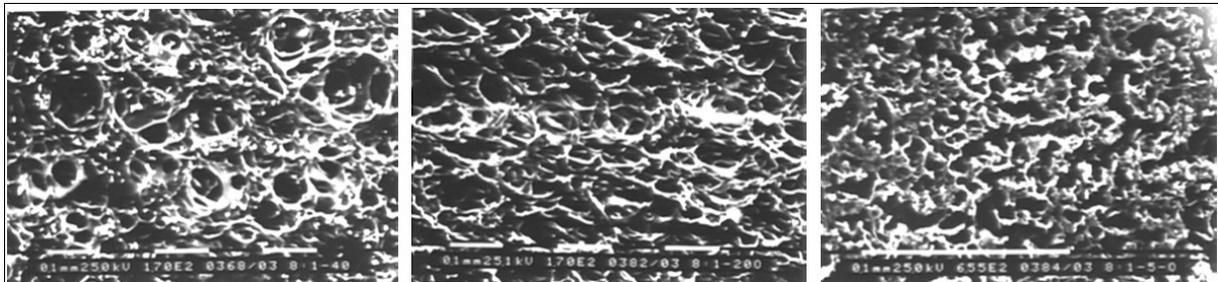
Die rechte Aufnahme zeigt die Oberfläche dieser Membran ohne Silikapartikel. Es sind deutlich runde Poren in der Membran zu erkennen, die näherungsweise der Korngröße der Silikapartikel entsprechen.

Die Zugabe unterschiedlicher „Verhältnisse“ der Silikapartikel zu der Chitosanlösung erlaubt es, makroporöse Chitosanmembranen mit einer unterschiedlichen Porenanzahl herzustellen. Durch einen höheren Silikatgehalt in den Membranen erhöht sich außerdem die spezifische Oberfläche der Chitosanmembranen.



*Abbildung 163: Oberflächenaufnahmen von Chitosanmembranen mit unterschiedlichen Silikat : Chitosan Verhältnissen von links nach rechts: 1:1, 3:1, 8:1. Der angegeben Maßstab in den Aufnahmen entspricht 0,1 mm.*

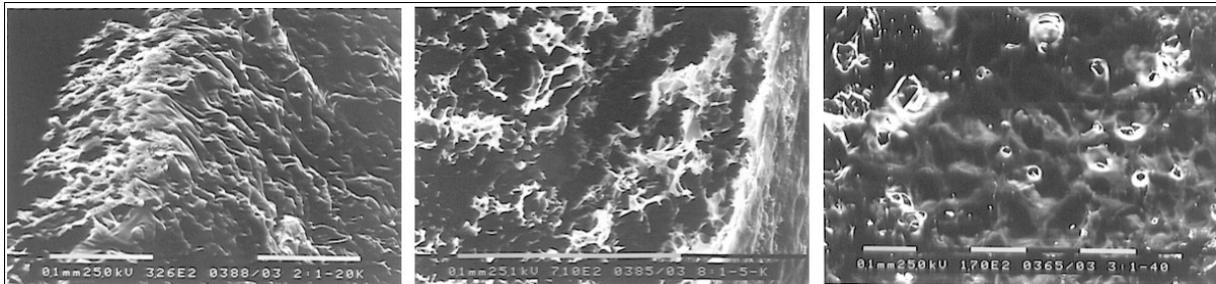
In der linken Aufnahme der Abbildung 163 ist eine Chitosanmembran mit einem Silikatanteil von 1 : 1 (Silikat : Chitosan) abgebildet. Es sind die entstandenen Poren mit einer Größe von ca. 60  $\mu\text{m}$  zu erkennen. Die Porenanzahl pro Fläche nimmt durch die höheren Silikat-Chitosan Verhältnisse von rechts nach links zu. Eine höhere Konzentration der Kieselgelpartikel in der Chitosanmembran erhöht somit die spezifische Oberfläche der Chitosanmembran.



*Abbildung 164: Oberflächenaufnahmen von Chitosanmembran mit unterschiedlich großen Makroporen. von links nach rechts: 40-63  $\mu\text{m}$ , 20-40  $\mu\text{m}$ , 5-15  $\mu\text{m}$ . Der angegeben Maßstab in den Aufnahmen entspricht 0,1 mm.*

Zu den Membranen der Abbildung 164 wurde bei konstanter Konzentrationen an Kieselgel die Korngröße der Partikel variiert. Die linke und mittlere Aufnahme der Membranen ist bei einer 170 fachen Vergrößerung angefertigt worden. Es sind deutlich die kleineren Poren im mittleren Bild (beim direkten Vergleich des linken und des mittleren Bildes) zu erkennen. Die rechte Abbildung wo bei der Herstellung der Membranen Kieselgel mit einer Partikelgröße von 5  $\mu\text{m}$ -15  $\mu\text{m}$  eingesetzt wurde, liegt in einer 655 fachen Vergrößerung vor. Es sind deutlich die wesentlich kleineren Poren, die ungefähr der Partikelgrößen des Kieselgels

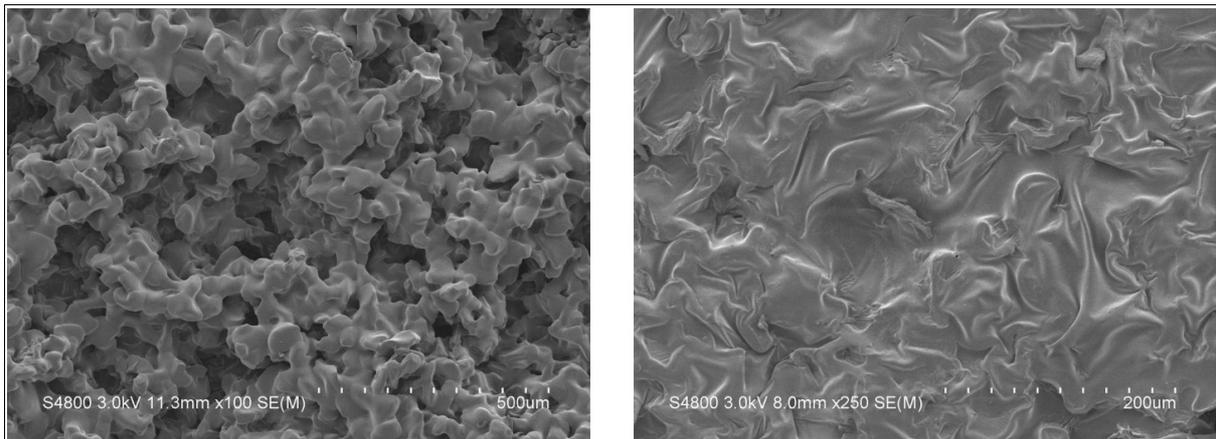
entsprechen, auf der Aufnahme zu erkennen.



*Abbildung 165: Chitosanmembranen mit unterschiedlichen Porengrößen von links nach rechts: Querschnitt 20-40 µm, Querschnitt 5-15 µm, Rückseite einer porösen Membran. Der angegeben Maßstab in den Aufnahmen entspricht 0,1 mm.*

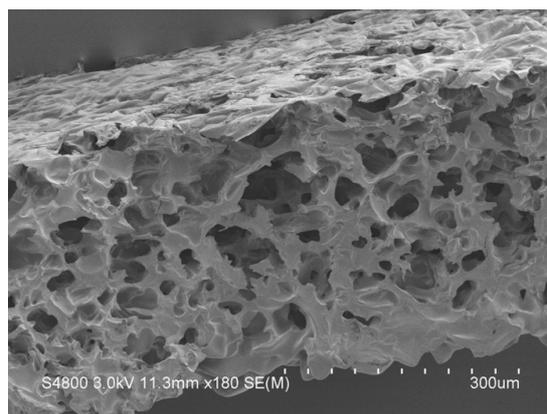
In der Abbildung 165 sind in der linken und mittleren Aufnahme die Querschnittsflächen einer Chitosanmembran mit einer Porengröße von 20-40 µm (links) und die Querschnittsfläche einer Chitosanmembran mit einer Porengröße von 5-15 µm (mitte) dargestellt. Es ist wieder deutlich die schwammartige Struktur der makroporösen Chitosanmembran zu erkennen. Die rechte Abbildung zeigt die Rückseite einer porösen Membran. Diese entsteht synthesebedingt auf der Seite, die zuvor auf dem Träger haftete. Es ist eine glatte, hügelige Oberfläche zu erkennen. Es wurde bewusst eine Stelle der Membran ausgewählt, an der sich einige Beschädigungen, befinden um ein besseres Kontrastverhältnis der Aufnahme zu erreichen. Die rechte Abbildung ist deshalb nicht repräsentativ für den größten Teil der Rückseite einer porösen Chitosanmembran.

Des weiteren stellte sich die Frage ob durch die hohe Quellfähigkeit der Chitosanmembranen gegenüber wässrigen Systemen sich die Poren bei der Quellung schießen. Aufgrund dessen wurden Kryo-Präparierte Membranen untersucht. Diese wurde vor der Untersuchung in Wasser gequollen.



*Abbildung 166: Kryo-Präparierte Chitosanmembranen 40-63 µm, links poröse Oberfläche, rechts stark Strukturierte Oberfläche ohne Verletzung (Rückseite der porösen Membran).*

Es zeigt sich in Abbildung 166, dass durch das Aufquellen der Chitosanmembran in Wasser die Oberfläche der porösen Seite abgerundet wird. Die scharfen Porenbegrenzungen sind verschwunden die Oberfläche wirkt abgeschliffen. Die Poren sind jedoch noch vorhanden und in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt. Der Porendurchmesser beträgt immer noch ca. 60 µm. Die glatte Rückseite der Membran (rechtes Photo in Abbildung 166) zeigt durch das Quellen eine starke Strukturierung der Oberfläche wobei die Membran eine geschlossenen Oberfläche zeigt. Die starke Struktur der Oberfläche der Rückseite einer porösen Chitosanmembran beruht auf der unterschiedlichen Dicke der Membranrückseite.

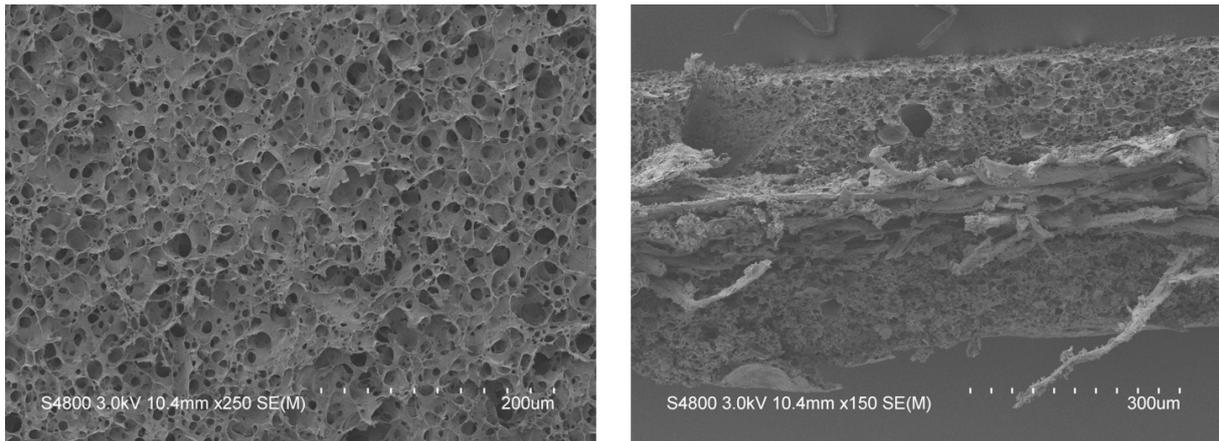


*Abbildung 167: Kryo-Präparierte Chitosanmembranen 40-63 µm, Querschnittsaufnahme.*

Die Kantenaufnahme (Abbildung 167) der Kryo-Präparierten Chitosanmembran zeigt eine durchgehend poröse Struktur. Man erkennt auf der Oberseite die relativ glatte Rückseite und die abgeschliffen wirkende poröse Unterseite. Durch ein Aufquellen der hydrophilen

Chitosanmembran wird also die poröse Struktur einer Chitosanmembran mit einer Porengröße zwischen 40-60  $\mu\text{m}$  kaum beeinflusst.

Es wurde eine weitere Kryo-Präparierte Chitosanmembran untersucht mit einer Porengröße zwischen 5-15  $\mu\text{m}$  die zusätzlich als Verstärkung einen Faserkern aufweist.



*Abbildung 168: Kryo-Präparierte Chitosanmembranen 5-15  $\mu\text{m}$ , links poröse Oberfläche, rechts Kantenaufnahme im Zentrum befindet sich der Faserkern*

Es zeigt sich, dass durch das Aufquellen der Chitosanmembran in Wasser die Oberfläche kaum verändert hat. Die Poren sind noch vorhanden und in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt. Der Porendurchmesser beträgt ca. 10  $\mu\text{m}$  und hat sich damit kaum geändert. Die Kantenaufnahme der Membran zeigt im Zentrum einen Faserkern, der von einer porösen schaumartig strukturierten Chitosanschicht flankiert wird. Bei dieser Art von Membran bildet sich herstellungsbedingt eine geschlossene Sperrschicht um den Faserkern.

### 5.3.8.3 Chitosanmembran mit Mikroporen

Chitosanmembranen mit Mikroporen werden durch Zugabe von Polyethylenglycol mit unterschiedlichen Molmassen erhalten. Das Polyethylenglycol wird durch anschließendes Auswaschen mit verd. Natronlauge aus der Chitosanmembran entfernt. Es entstehen so an den Stellen, an denen sich vorher das Polyethylenglycol befunden hat, Hohlräume. Alle so hergestellten Membranen wurden in einen Träger aus Filterpapier eingebracht um die mechanische Stabilität zu erhöhen.

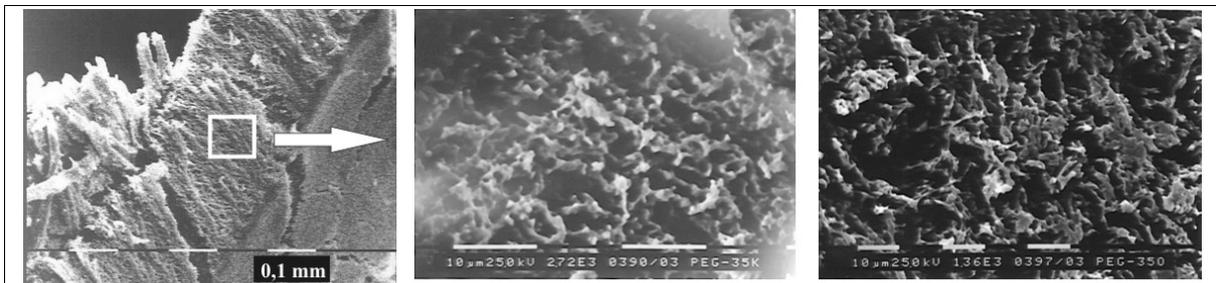


Abbildung 169: mikroporöse Chitosanmembranen von links nach rechts: Bruchkante einer faserverstärkten Membran, Vergrößerung des Kantenbereiches, Oberfläche. Der angegebene Maßstab in den Aufnahmen entspricht von links nach rechts: 0,1 mm, 10 µm, 10 µm.

Die mikroporösen Chitosanmembranen aus Abbildung 169 wurden alle mit Hilfe von Polyethylenglycol mit einer Molmasse von 35.000 g/mol hergestellt.

In der linken Abbildung sind die Fasern des Filterpapiers bei einer 85 fachen Vergrößerung dargestellt. In der mittleren Abbildung ist ein Bruchkantenbereich derselben Membran vergrößert (2720 fach) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Membran eine schwammartige Struktur besitzt. Die Porenradien liegen bei ca. 1-5 µm. Rechts ist die Oberfläche der Membran bei einer 1360 fachen Vergrößerung abgebildet. Diese zeigt eine sehr starke Oberflächenstrukturierung die Porenradien betragen wie beim Querschnitt ca. 1-5 µm.

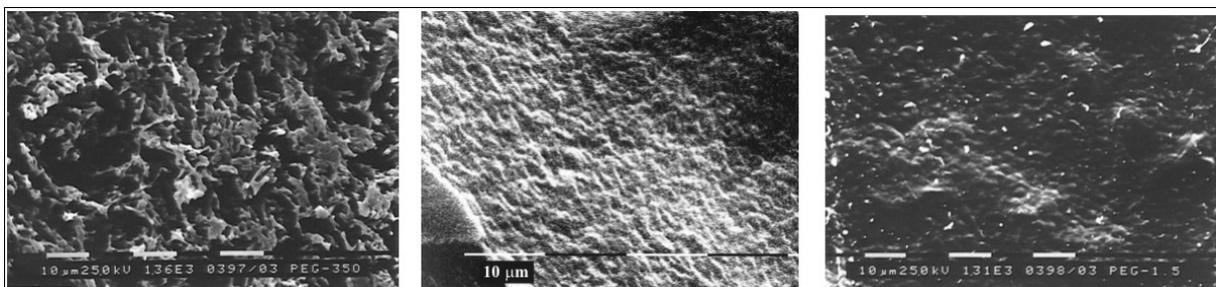
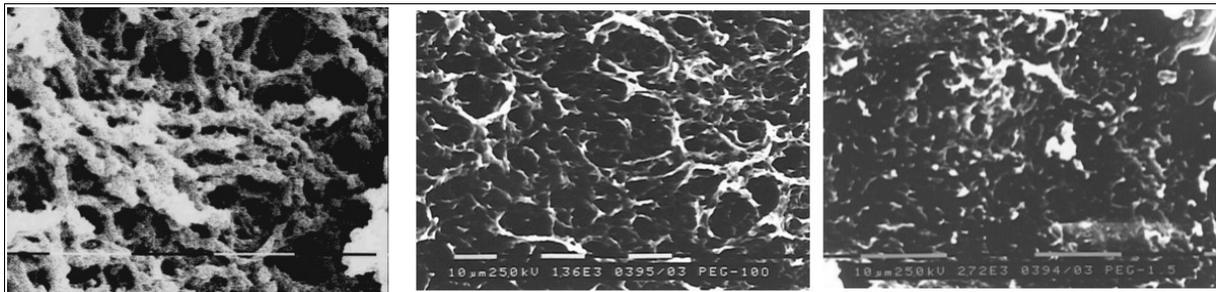


Abbildung 170: Chitosanmembran in Abhängigkeit der Molmasse des zugesetzten Polyethylenglycols. von links: PEG-35.000, PEG-10.000, PEG-1.500 g/mol (Oberfläche). Der angegebene Maßstab in den Aufnahmen entspricht 10 µm.

Bei den mikroporösen Chitosanmembranen in Abbildung 170 wurde die Molmasse des

Polyethylenglycols von 1.500, 10.000, 35.000 g/mol variiert.

Bei einem direkten Vergleich der linken und der rechten Aufnahme, die beide die gleiche Vergrößerung (1360 fach) aufweisen, fällt sofort die unterschiedliche Oberflächenstruktur der beiden Membranen auf. Die linke Abbildung zeigt eine eher stumpfe Oberfläche, in der sich viele kleine Holräume von ca 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser befinden. Die mittlere und rechte Abbildung zeigt eine hügelige aber weitestgehend geschlossene Oberflächenstruktur.



*Abbildung 171: Chitosanmembran in Abhängigkeit der Molmasse des zugesetzten Polyethylenglycols. von links: PEG-35.000, PEG-10.000, PEG-1.500 g/mol (Kante). Der angegeben Maßstab in den Aufnahmen entspricht 10  $\mu\text{m}$ .*

Bei den mikroporösen Chitosanmembranen aus Abbildung 171 wurde die Molmasse des Polyethylenglycols von 1.500, 10.000, 35.000 g/mol variiert.

Bei einem Vergleich der Bilder zeigt sich, dass alle Membranen bei Untersuchung der Bruchkante eine poröse, schaumartige Struktur besitzen. Aufgrund der geschlossenen Oberflächenstruktur der Membranen, bei denen Polyethylenglycol mit einer Molmasse von 1.500 bzw. 10.000 g/mol eingesetzt wurde, (vergleiche Abbildung 170) weisen diese trotz schwammartiger Struktur nur eine geringe Oberflächenvergrößerung gegenüber den glatten Membranen auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Membranen nur einen sehr kleinen Effekt hinsichtlich einer schnelleren Trombozytenagglugation oder einer höheren Mikroorganismen Immobilisierung aufweisen. Es sollte daher Polyethylenglycol mit einer Molmasse  $> 10.000$  g/mol eingesetzt werden um die Oberfläche der Membran zu vergrößern. Außerdem weisen die Membranen in ihrem Inneren eine immer kleinere Porenstruktur auf. Bei Verwendung von PEG 35.000 entstehen Poren mit einem Durchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$ , bei PEG 10.000 2-3  $\mu\text{m}$  und bei PEG 1.500 ca. 1  $\mu\text{m}$ . Ein kleinerer Porenradius führt in der Membran zu einer immer größeren spezifischen Oberfläche. Es dürfen jedoch die Poren auch nicht zu klein werden, da sonst Wundflüssigkeitsbestandteile nicht in die Poren gelangen können.

Des weiteren wurde untersucht, ob sich durch eine Quellung der Chitosanmembran bei Kontakt mit der Wundflüssigkeit die sehr kleinen Poren schließen, die dann nicht mehr zur Vergrößerung der Oberfläche beitragen können. Hierzu wurden Kryo-Präparierte Chitosanmembranen (PEG 35.000 g/mol) die zuvor im Wasser gequollen wurden untersucht (siehe Abbildung 172).

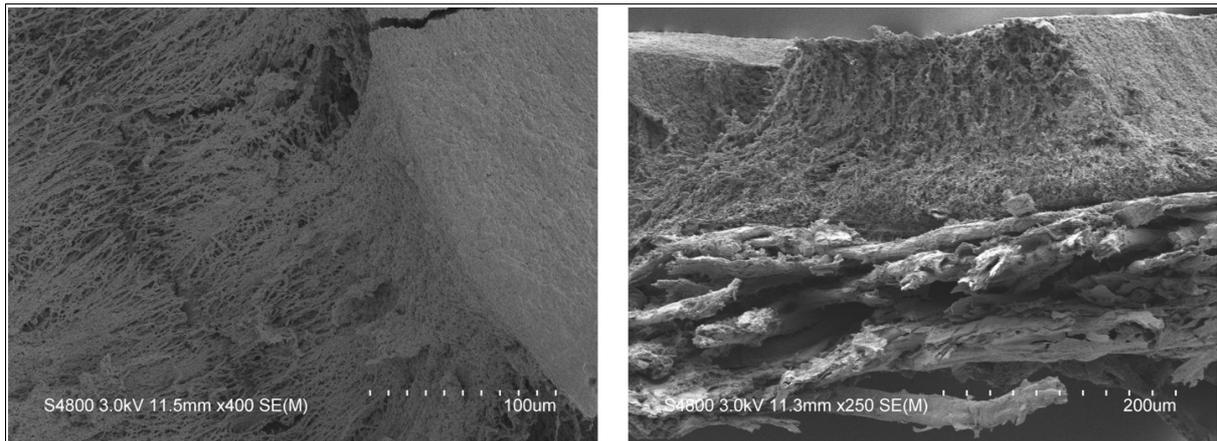


Abbildung 172: Kryo-Präparierte Chitosanmembranen (PEG 35.000 g/mol), links poröse Oberfläche, rechts Kantenaufnahme im Zentrum befindet sich der Faserkern.

In dem linken Bild der Abbildung 172 ist die Kryo-Präparierte Oberfläche einer mikroporösen Chitosanmembran die mit Hilfe von Polyethylenglycol mit einer Molmasse von 35.000 g/mol hergestellt wurde abgebildet. Es zeigt sich, dass sich durch ein Quellen der Membran in Wasser die Poren an der Oberfläche nicht schließen. In dem rechten Bild der Abbildung 172 ist deutlich zu erkennen, dass die Membran eine schwammartige Struktur besitzt. Die Porenradien liegen bei ca. 1-5 µm. Es zeigt sich, wie schon bei den makroporösen Membranen beschrieben auch bei den mikroporösen Chitosanmembranen keine Veränderung der Porenstruktur. Durch das gleichmäßige Quellen der Membran in alle drei Raumrichtungen vergrößert sich das Volumen der Membranen, ohne dass die Poren hierdurch geschlossen werden.

### 5.3.9 Konfokale Lasermikroskop Aufnahmen

Die Untersuchung der Membran mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops ermöglicht die Untersuchung des Tiefenprofils. Es wurde jeweils eine dreidimensionale Abbildung und eine

Tiefenprofil-Aufnahme der verwendeten Membranen angefertigt. Diese Aufnahmen sind analog einer geologischen Landkarte zu betrachten, d.h. je heller der Grauton desto höher und je dunkler desto tiefer die Membrandomäne. Zur Bestimmung des Querschnittsprofils wird aus einer Tiefenprofil-Aufnahme ein repräsentativer Bereich ausgewählt. Ein Problem dieser Methode ist, dass Steigungen des Höhen- und Tiefenprofils über 10-30 % (Abhängig von der Mikroskoplinse) nicht aufgelöst werden können.

### 5.3.9.1 Glatte Chitosanmembranen

Es wurden für die Untersuchungen der Morphologie mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und eines konfokalen Lasermikroskops identische Membranen verwendet.

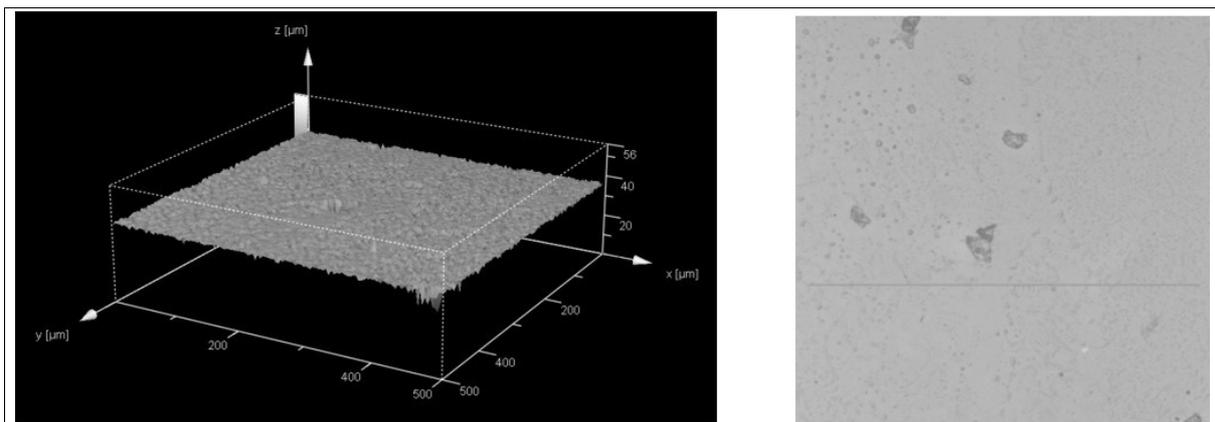


Abbildung 173: glatte Chitosanmembran - links 3D-Profil, rechts Tiefenprofil

Die glatte Chitosanmembran aus Abbildung 173 zeigt - abgesehen von einigen Beschädigungen - eine porenlose glatte Oberflächenstruktur.

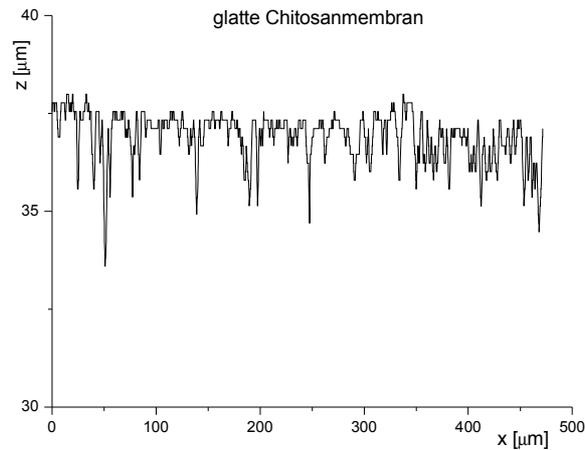


Abbildung 174: Querschnittsprofil einer glatten Chitosanmembran

Das Querschnittsprofil (Abbildung 174) zeigt im Mittelwert einen Höhen- und Tiefenunterschied von ca. 2  $\mu\text{m}$ . Die sehr stark wechselnden Höhen- und Tiefenunterschiede sind kein Indiz für eine mikroporöse Oberflächenstruktur, sondern sind durch Signalrauschen zu erklären. So geringe Höhenunterschiede wie die hier festgestellten liegen an der Nachweisgrenze.

### 5.3.9.2 Makroporöse Chitosanmembranen

Es wurde mit Hilfe von Kieselgel mit einer Korngröße von 40-63  $\mu\text{m}$  eine makroporöse Chitosanmembran hergestellt. Die Poren sollten demnach weitestgehend der Korngröße des Kieselgels entsprechen. Synthesebedingt entstehen eine glatte und eine raue Oberfläche.

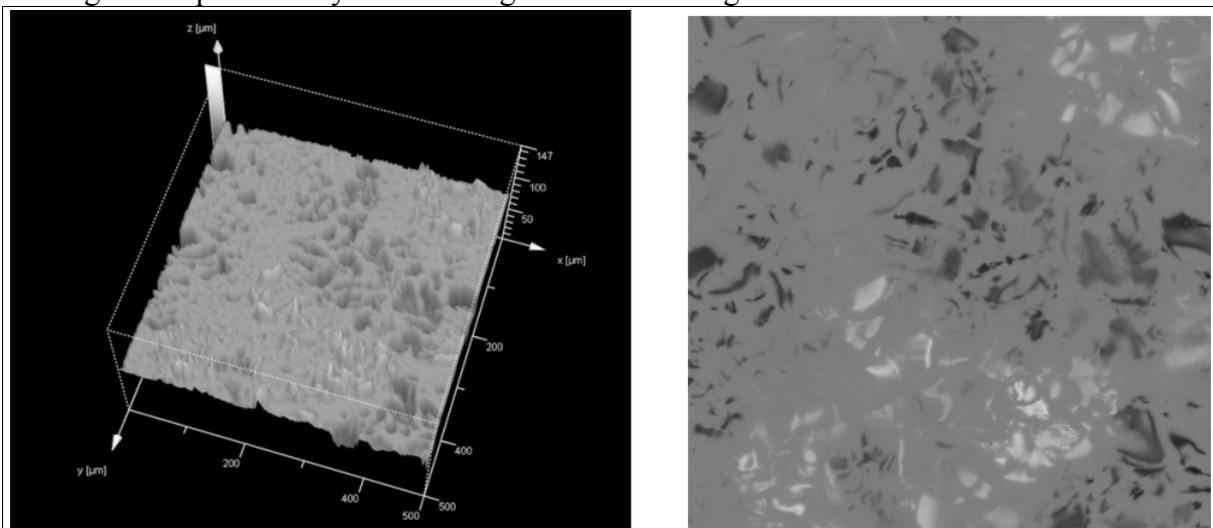


Abbildung 175: Chitosanmembran 40-63  $\mu\text{m}$  (raue Seite) -links 3D-Profil, rechts Tiefenprofil

Es handelt sich bei Abbildung 175 um die Aufnahmen der rauhen Oberflächen der makroporösen Chitosanmembran. Es sind deutlich die Poren in der Membran zu erkennen.

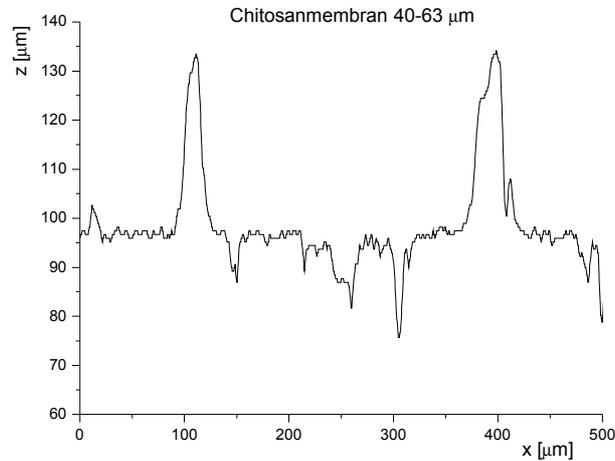


Abbildung 176: Querschnittsprofil einer makroporösen Chitosanmembran (40-63 µm)

Das Querschnittsprofil (Abbildung 176) zeigt 2 Poren mit einem Höhen- und Tiefenunterschied von ca. 40 µm bei ungefähr identischer Breite. Es zeigt sich, dass die Tiefenausdehnung der Poren ungefähr identisch mit dem Oberflächendurchmesser der Poren ist.

Die andere Seite der gleichen Membran, die synthesebedingt eine wesentlich glattere Oberflächenstruktur aufweist, wurde ebenfalls untersucht.

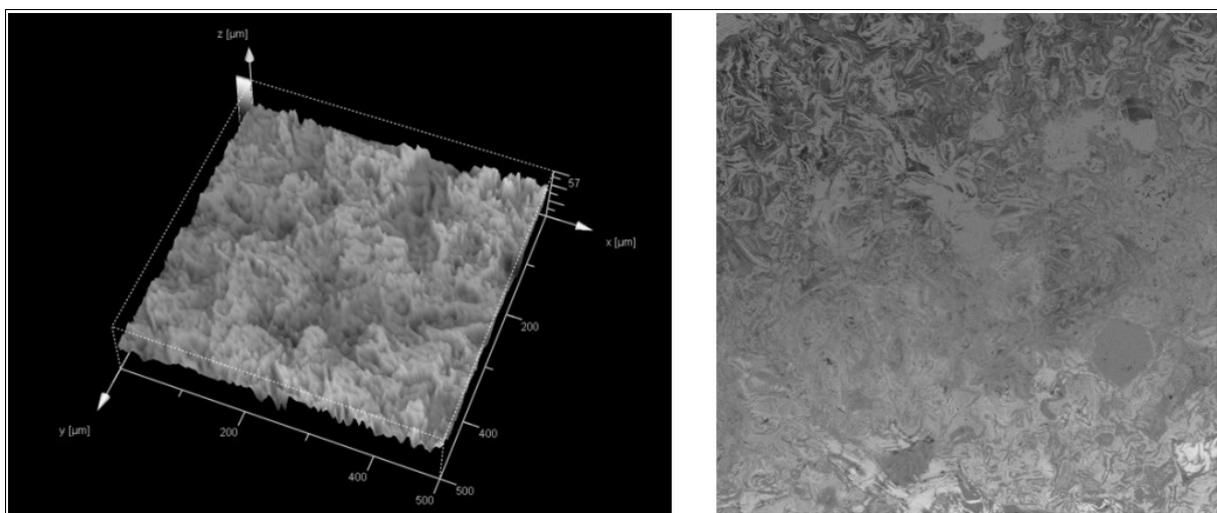
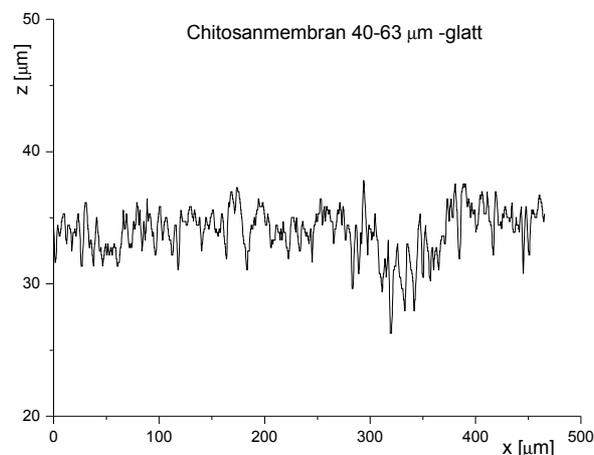


Abbildung 177: Chitosanmembran 40-63 µm (glatte Seite) links 3D-Profil, rechts Tiefenprofil

Es handelt sich bei Abbildung 177 um die Aufnahmen der glatten Oberflächen der makroporösen Chitosanmembran. Es ist weitestgehend eine glatte Oberfläche zu erkennen. Die Höhen- und Tiefen-Unterschiede sind jedoch wesentlich größer als bei den glatten Chitosanmembranen. Dies liegt vermutlich an einer durch die Poren verursachten - „Berg und Tal“ Bildung auf der Rückseite. Diese leichte Strukturierung wird durch die unterschiedliche Dicke der Chitosanmembran an der Rückseite hervorgerufen.



*Abbildung 178: Querschnittsprofil einer makroporösen Chitosanmembran ( 40-63 µm) – glatte Seite.*

Das Querschnittsprofil (Abbildung 178) zeigt im Mittelwert einen Höhen- und Tiefen-Unterschied von ca. 5 µm. Dieser Mittelwert des Höhen- und Tiefen- Unterschieds ist um 4 µm größer als bei der glatten Membran. Durch die unterschiedliche Dicke des Chitosanfilms an der glatten Rückseite kommt es zu einer etwas stärkeren Oberflächenstrukturierung.

Es wurde mit Hilfe von Kieselgel mit einer Korngröße von 20-40 µm eine makroporöse Chitosanmembran hergestellt. Die Poren sollten demnach weitestgehend der Korngröße des Kieselgels entsprechen. Synthesebedingt entsteht eine glatte und eine raue Oberfläche.

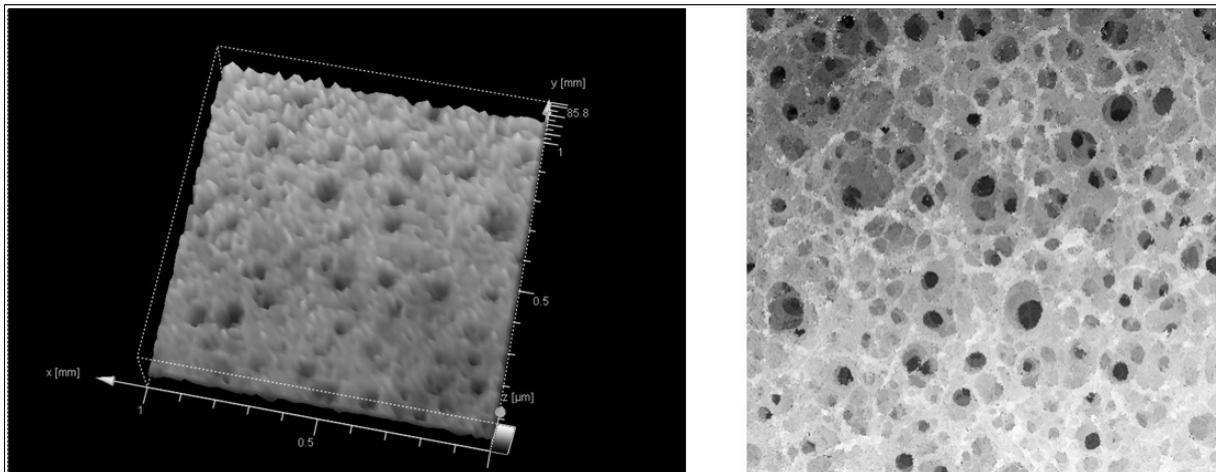


Abbildung 179: Chitosanmembran 20-40  $\mu\text{m}$  (glatte Seite) links 3D-Profil, rechts Tiefenprofil.

Es handelt sich bei Abbildung 179 um die Aufnahmen der rauen Oberflächen der makroporösen Chitosanmembran. Es sind sehr deutlich die Poren in der Membran zu erkennen.

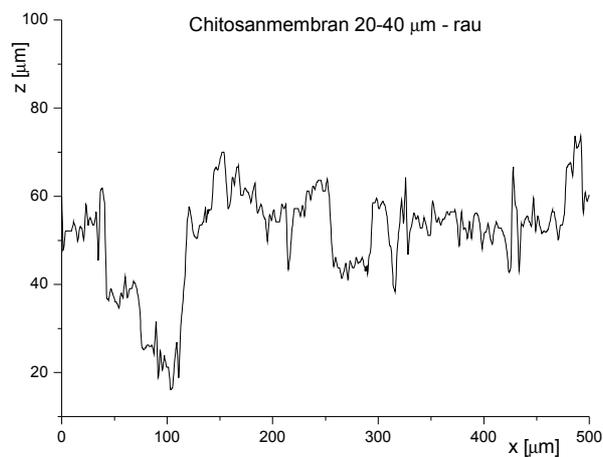
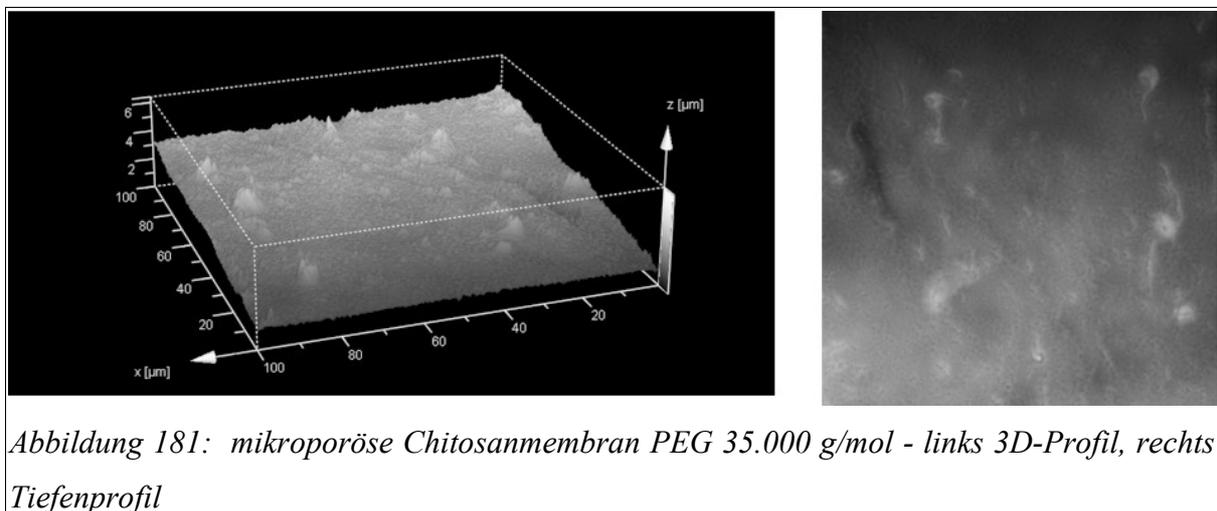


Abbildung 180: Querschnittsprofil einer makroporösen Chitosanmembran (20-40  $\mu\text{m}$ ) – glatte Seite.

Das Querschnittsprofil (Abbildung 180) zeigt mehrere Poren. Von  $X = 40\text{-}120\ \mu\text{m}$  sind zwei zusammenhängende Poren zu erkennen, mit einem Höhen- und Tiefen- Unterschied von ca.  $20\ \mu\text{m}$  bzw  $40\ \mu\text{m}$  bei ungefähr identischer Breite. Bei  $X = 260\text{-}290\ \mu\text{m}$  ist eine weitere Pore mit einer X-Z Ausdehnung von ca.  $20\ \mu\text{m}$  zu erkennen. Es zeigt sich, dass die Tiefenausdehnung der Poren ungefähr identisch mit dem Oberflächendurchmesser der Poren ist.

### 5.3.9.3 Mikroporöse Chitosanmembranen

Die verwendete Chitosanmembran mit Mikroporen wurde durch Hinzugabe von Polyethylenglycol mit einer Molmasse von 35.000 g/mol und ein anschließendes selektives Herauslösen erhalten. Bei den Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen ist es aufgrund der Messtechnik nicht möglich, die Membran im gequollenen Zustand zu vermessen. Bei der Untersuchung der hier verwendeten Chitosanmembran mit Hilfe der konvokalen Lasermikroskopie, wurde die Membran zuvor in Wasser gequollen um den Einfluss der Quellung auf die Oberflächenbeschaffenheit zu Detektieren.



Es handelt sich bei Abbildung 181 um die Aufnahmen der rauen Oberflächen einer mikroporösen Chitosanmembran (PEG 35.000 g/mol).

Aus den REM-Aufnahmen ist bekannt (vergleiche Abbildung 171), dass die Poren einer solchen mikroporösen Membran einen Durchmesser von ca. 1 µm aufweisen. Die sehr kleinen Hügel die in der linken Abbildung zu erkennen sind weisen auf Poren in dieser Größenordnung auch im gequollenen Zustand hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Poren an der Oberfläche durch eine Quellen der Membran in Wasser nicht schließen.

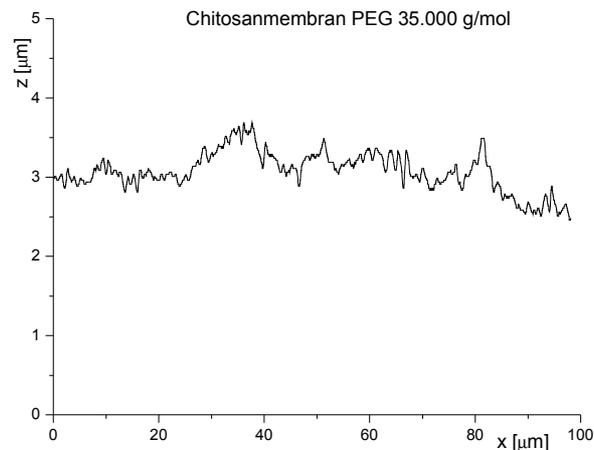


Abbildung 182: Querschnittsprofil einer makroporösen Chitosanmembran ( $1\ \mu\text{m}$ ) – hergestellt mit Hilfe von PEG 35.000 g/mol.

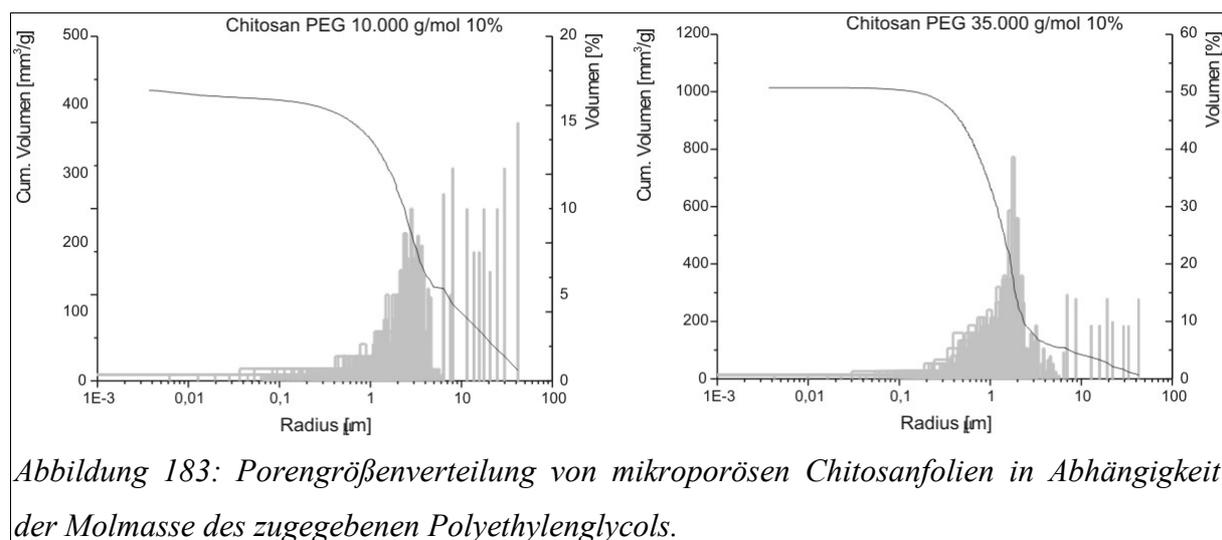
Das Querschnittsprofil (Abbildung 182) zeigt im Mittelwert einen Höhen- und Tiefenunterschied von ca.  $0,5\ \mu\text{m}$ . Die Porenweite weist eine Ausdehnung von  $0,5\text{-}1\ \mu\text{m}$  auf. Eine höhere Auflösung des untersuchten Gebietes, die sich bei solchen feinstruktureicheren Oberflächen anbieten würde, ist messtechnisch nicht möglich. Die erhaltenen Werte für die Porenweite und Porentiefe sind demzufolge mit einem hohen Fehler behaftet. Es kann jedoch gezeigt werden, dass sich die Oberfläche der mikroporösen Chitosanmembran durch eine Quellen in wässrigen Systemen nicht schließt.

### 5.3.10 Porengrößenverteilung

Es wurden makroporöse und mikroporöse Chitosanmembranen hergestellt, um die spezifische Oberfläche der Membranen zu vergrößern. Hierdurch sollen Materialeigenschaften, wie z.B. die Immobilisierung von Mikroorganismen und die hämolytische Wirkung von Chitosan, die an der Grenzfläche zwischen der Wundflüssigkeit und der Chitosanmembran zum Tragen kommt, unterstützt werden. Mit Hilfe der Quecksilber- porosimetrie kann die spezifische Oberfläche und die Porengrößenverteilung in der Chitosanmembran untersucht werden. Es wurden für die Untersuchung gefriergetrocknete, zerkleinerte Chitosanmembranen verwendet. Zur praktischen Durchführung der Messungen wird die Probe in ein Dilatometer aus Glas gegeben. Die Apparatur wird dann bis zu einem Druck von  $100\ \text{Pa}$  evakuiert. Danach wird das Dilatometer mit Quecksilber gefüllt. Unter ständig steigendem Druck strömt Quecksilber in

die Hohlräume der Membran ein. Die Volumenabnahme wird optisch bzw. elektronisch erfasst. Nach der Washburn- Gleichung wird aus dem gemessenen Einpreßdruck der jeweilige Porendurchmesser berechnet. Fehlinterpretationen können dann auftreten, wenn die Wände nicht mit Quecksilber gefüllter Poren zusammenbrechen und somit die Porenstruktur zerstört wird.

Es wurde zur Erzeugung von mikroporösen Chitosanmembranen Polyethylenglycol mit unterschiedlichen Molmassen verwendet. Das Polyethylenglycol wird aus der Chitosanfolie selektiv herausgelöst. Hierdurch entstehen Hohlräume, die die sich u.a. durch die Molmasse des Polyethylenglycols steuern lassen. Es wurde eine ca. 350  $\mu\text{m}$  dicke mikroporöse Chitosanmembran mit einem 120  $\mu\text{m}$  dicken Faserkern (Filterpapier) untersucht. Durch Ausübung von einem Druck bis zu 2000 bar werden die immer kleiner werdenden Poren mit Quecksilber gefüllt und es kann eine Volumenabnahme des Quecksilbers registriert werden.



Die Makroporen (6-70  $\mu\text{m}$ ) der Membranen werden mit einem zweiten Gerät vermessen. Beim Wechseln des Gerätes zur Bestimmung der Mikroporen (<6  $\mu\text{m}$ ) entsteht ein Sprung in den Diagrammen. Die Makroporen nehmen bei der Chitosanmembran mit PEG 10.000 g/mol ca. 30 % des kumulativen Volumen ein. Bei der Chitosanmembran mit PEG 35.000 g/mol nehmen die Makroporen nur ca. 15 % des kumulativen Volumen ein. Die Membranen haben durch den Trocknungsprozess Risse bekommen. Durch das Auseinandertrennen der Membranen liegen auch einige Fasern des Faserkerns frei. Diese relativ großen Hohlräume füllen sich schlagartig mit Quecksilber (Porenradius von >10  $\mu\text{m}$ ) bei Erhöhung des Drucks. Hierdurch entstehen die einzelnen relativ hohen Balken für das Volumen (siehe Abbildung

183). Der cumulative Volumenverbrauch der Chitosanmembran PEG 35.000 nimmt im Bereich von ca. 4  $\mu\text{m}$  bis 0,03  $\mu\text{m}$  stark zu. Bei kleineren Porenradien wird kein Quecksilber mehr aufgenommen. Bei der Chitosanmembran PEG 10.000 steigt der cum. Volumenverbrauch im gleichen Bereich stark an. Bei ca. 10 % der Probe liegen jedoch noch wesentlich kleinere Poren ( $<0,03 \mu\text{m}$ ) vor. Hierbei muss beachtet werden, dass kleine Poren nur wenig Quecksilber aufnehmen. Diese kleinen Poren leisten jedoch einen großen Beitrag zu Vergrößerung der Oberfläche.

In Abbildung 184 ist die spezifische Oberfläche in Abhängigkeit zu den Porenradien aufgetragen. Es stellt sich nun durch die unterschiedliche Wertung der Porengröße ein anderer Zusammenhang dar. So entsprechen die ca. 10 % cum. Volumen bei Poren  $<0,03 \mu\text{m}$  ca. 70 % der spez. Oberfläche. Es zeigt sich deutlich, dass die Oberflächenzunahme der Probe PEG 35.000 zwischen einem Porenradius von 2-0,03  $\mu\text{m}$  liegt. Bei der Probe mit dem niedermolekularen Polyethylenglycol findet ein Großteil (70 %) der Oberflächenzunahme im Bereich unter 0,03  $\mu\text{m}$  statt. Durch die kleine Molmasse besitzt das Polyethylenglycol-Polymerknäuel naturgemäß einen geringeren Platzbedarf. Wird nun das Polyethylenglycol

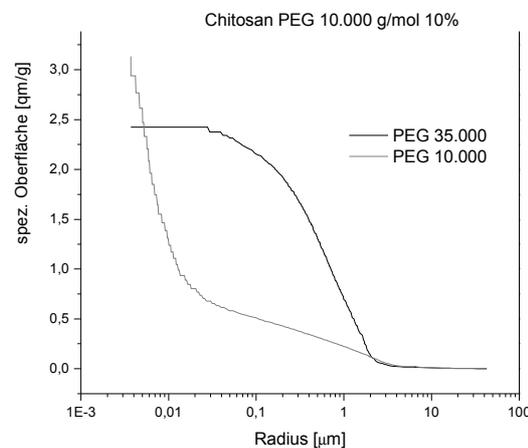


Abbildung 184: spezifische Oberfläche der mikroporösen Chitosanfolien in Abhängigkeit der Molmasse des zugegebenen Polyethylenglycols.

selektiv herausgespült entstehen an diesen Stellen Hohlräume, die sich offensichtlich durch die Wahl der Molmasse des Polyethylenglycol in Ihrer Größe beeinflussen lassen. Durch den Anteil an kleinen Poren in der Probe PEG 10.000 vergrößert sich deshalb auch die spezifische Oberfläche im Vergleich zu der Probe PEG 35.000. Eine ca. 350  $\mu\text{m}$  faserverstärkte glatte

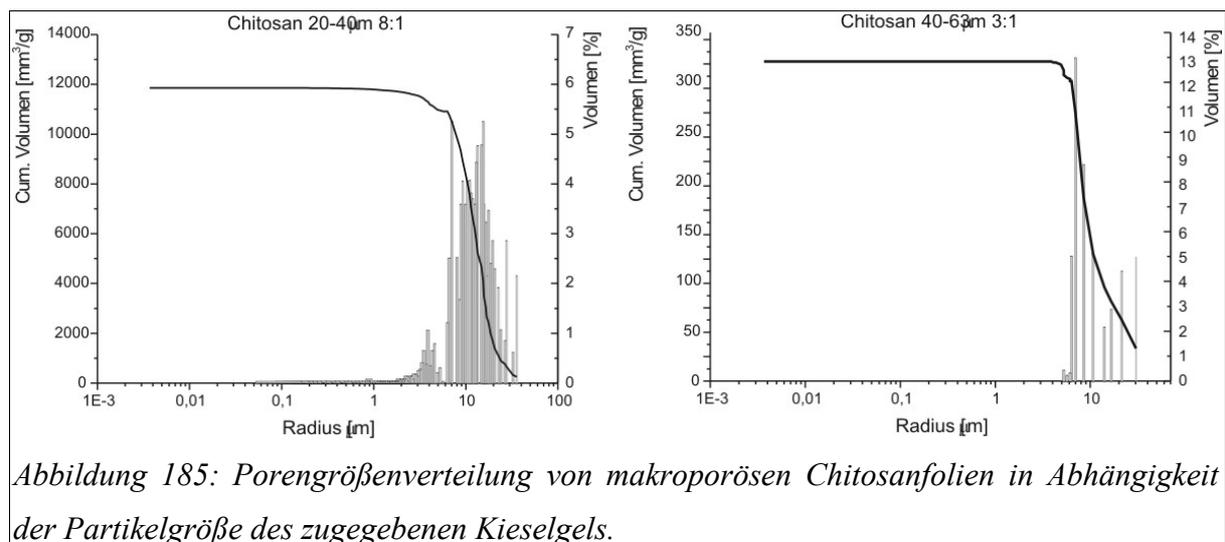
Chitosanmembran weist pro Gramm nur einen Oberfläche von ca. 0,0005 m<sup>2</sup> auf.

Name	cum. Vol. [mm <sup>3</sup> /g]	spez. Oberf. [m <sup>2</sup> /g]	mitt. Porenr. [μm]
PEG 10.000	422	3,13	70 % 0,0067
			30 % 0,18
PEG 35.000	1014	2,42	0,25

Tabelle 44: Übersicht der spezifischen Oberfläche, des kumulativen Volumens und dem mittleren Porenradius der mikroporösen Chitosanfolien in Abhängigkeit der Molmasse des zugegebenen Polyethylenglycols.

So konnte mit diesem Verfahren die spezifische Oberfläche bei der Probe PEG 10.000 um das 6260 fache und bei der Probe PEG 35.000 um das 4840 fache vergrößert werden (Tabelle 44).

Bei Verwendung von Kieselgel (Silica), zur Erzeugung von makroporösen Chitosanmembranen, sollten die Poren ungefähr die Porengröße der verwendeten Silica Partikel aufweisen. Es wurden Membranen mit Kieselgel, mit einer Partikelverteilung von 40-63 μm und 20-40 μm, untersucht. Diese Membranen weisen keinerlei Faserverstärkung im Inneren auf (Abbildung 185).



Es zeigt sich bei beiden untersuchten Proben, dass praktisch das gesamte Volumen vom Messbeginn ca. 50 μm bis ca. 5 μm zur Füllung der Poren in den Membranen verbraucht

wird (Abbildung 185). Bei kleineren Poren wird kaum Volumen verbraucht. Durch unterschiedliche Verhältnisse zwischen dem Kieselgel und dem Chitosan ist es möglich, die Porenanzahl in dem Material zu vergrößern. Dies wird durch den Unterschied des cumulativen Volumen pro Masseneinheit des porösen Materials deutlich.

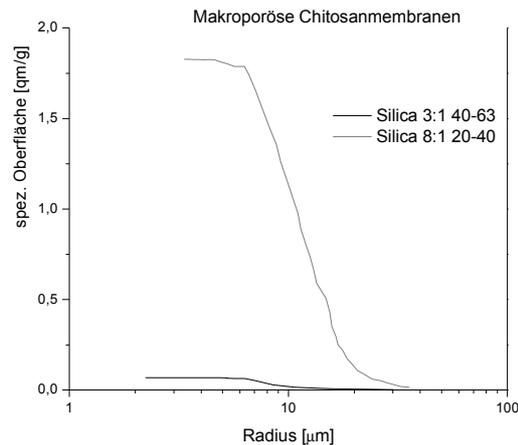


Abbildung 186: spezifische Oberfläche der makroporösen Chitosanfolien in Abhängigkeit der Partikelgröße des zugegebenen Kieselgels.

In Abbildung 186 ist die spezifische Oberfläche in Abhängigkeit zu den Porenradien aufgetragen. Aufgrund der Übersichtlichkeit wird hierbei auf die Darstellung der niedrigeren Porenradien verzichtet. Die Probe mit den Silicapartikel, mit einer Porengrößenverteilung zwischen 20-40 µm, weist hierbei eine mittlere Porengröße von ca. 12 µm auf. Die Probe mit den Silicapartikel, mit einer Porengrößenverteilung zwischen 40-63 µm, weist hierbei eine mittlere Porengröße von ca 14 µm auf. Hierbei ist zu beachten, dass dieses Verfahren für die Bestimmung von Porengrößen > 50 µm nicht geeignet ist. So könnte ein Großteil der großen Poren in dem Material nicht erfasst worden sein weil Poren > 50 µm nicht bestimmt werden können.

Name	cum. Vol. [mm <sup>3</sup> /g]	spez. Oberf. [m <sup>2</sup> /g]	mitt. Porenr. [µm]
Silica 8:1 20-40 µm	11840	1,7	12
Silica 3:1 40-63 µm	321	0,24	14

Tabelle 45: Übersicht über das verbrauchte cumulative Hg-Volumen, der spezifischen Oberfläche und dem mittleren Porendurchmesser.

Es zeigt sich deutlich in Tabelle 45, dass durch eine Erhöhung der Kieselgelmenge im Verhältnis zum Chitosan eine sehr starke Zunahme der spezifischen Oberfläche und des cum.

Volumen zu verzeichnen ist. Es ist also auch mit größeren Poren möglich, eine immense Vergrößerung der Oberfläche zu erreichen.

Es ist noch zu erwähnen, dass diese Chitosanfolien im gefriergetrockneten Zustand untersucht wurden. Durch Kontakt mit Wasser kommt es jedoch zu einer Quellung der Chitosanmembran. Hierbei sollten größere Poren durch die Quellung des makromolekularen Netzwerkes weniger beeinflusst werden als sehr kleine Poren, wie sie z.B. bei der Chitosanmembran unter Verwendung von PEG 10.000 entstanden sind. Für eine Applikation als Wundauflage bei der die Vergrößerung der spezifischen Oberfläche u.a. die Hämostase beschleunigen und die Immobilisierung von Mikroorganismen verbessern soll, sollten daher eher makroporöse Membranen zum Einsatz kommen. Außerdem könnten makroskopische Bestandteile der Wundflüssigkeit (z.B. Proteine) zu kleine Poren verschließen und dadurch die spezifische Oberfläche stark verringern.

### **5.3.11 Mechanische Eigenschaften**

Die Membran soll in der feuchten Wundheilung unter anderem eine Barrierefunktion gegenüber pathogenen Keimen aus der Umwelt darstellen.

Für die Applikation der Membran als Wundauflage muss diese eine gewisse Zugfestigkeit aufweisen, damit die Membran bei der Handhabung nicht beschädigt wird. Durch die Variation von Glycerin in unterschiedlichen Verhältnissen zu der Chitosanmembran werden nicht nur die Permeationseigenschaften, sondern auch ganz maßgeblich die mechanischen Eigenschaften beeinflusst. Durch eine Erhöhung des Glycerinanteils in der Membran wird diese flexibler und elastischer.

Hierzu wurde aus den Folien ein „knochenförmiger“ Probenkörper mit einer Länge von ca. 30 mm ausgestanzt. Mit Hilfe eines Mikroskopes konnte exakt die geringste Breite von ca. 4,10 mm bestimmt werden. Die untersuchten Membranen weisen eine Dicke von 60-100 µm auf. Diese wurde mit Hilfe einer Mikrometerschraube bestimmt. Der Probenkörper wird in einer stählernen Schraubzwinde fixiert und die Kraftaufnehmer werden an die Probe „herangefahren“. Die Proben wurden konstant mit 0,1 mm pro Sekunde tangential mechanisch belastet (Abbildung 187). Um die einzelnen Membranen besser vergleichen zu können wurde die Zugfestigkeit auf SI-Einheiten [ $\text{N/m}^2 = \text{Pa}$ ] normiert .

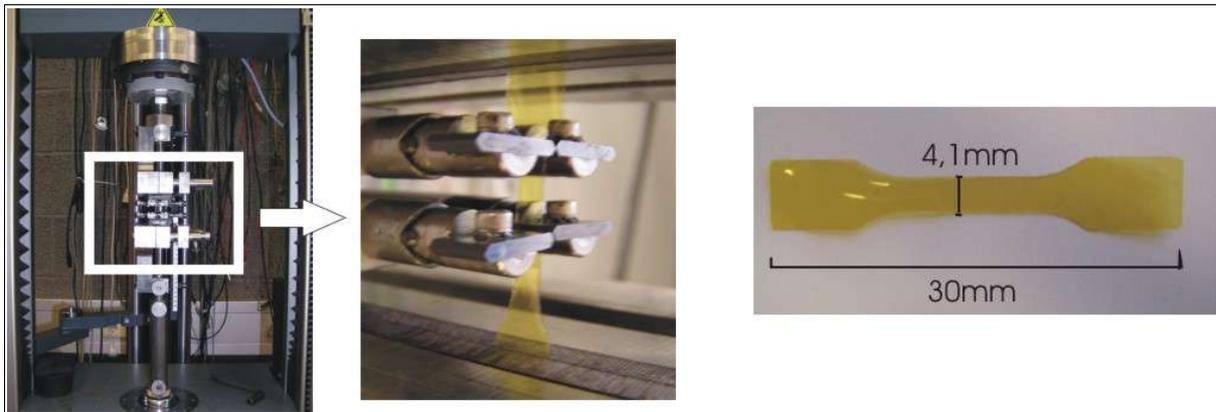


Abbildung 187: von links Messgerät, eingespannte Probe mit Kraufaufnehmer, Probenkörper

Zunächst wurden kommerziell erhältliche Wundauflagen hinsichtlich ihrer mechanischen Beschaffenheit untersucht.

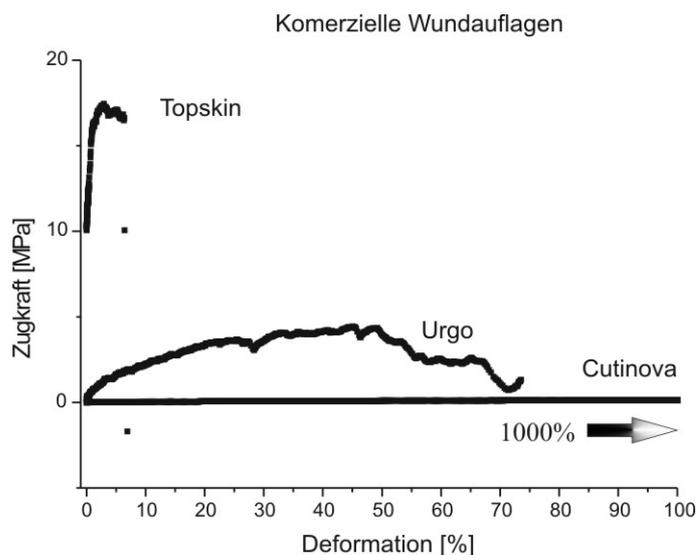
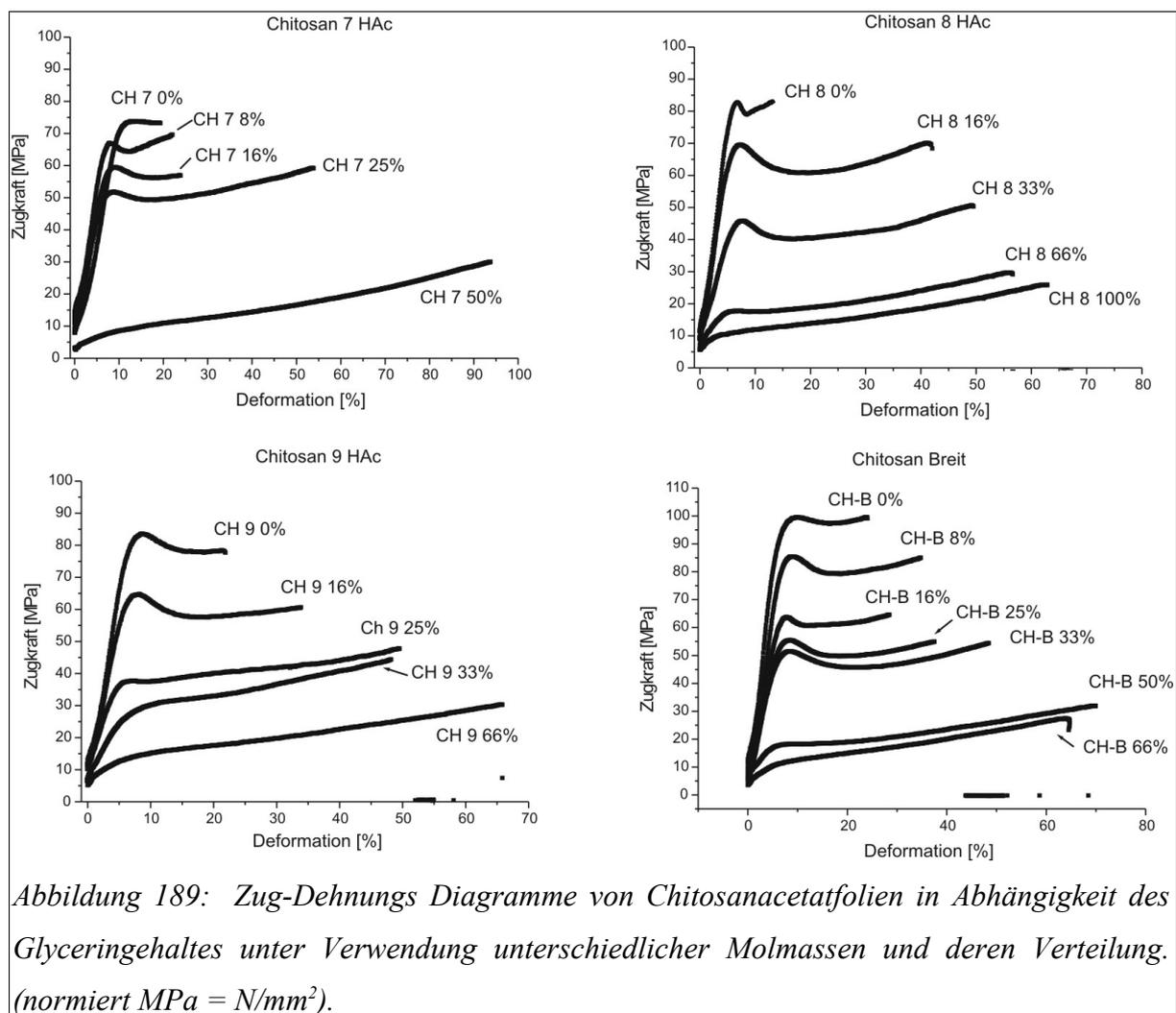


Abbildung 188: Zug-Dehnungs Diagramm von kommerziell erhältlichen Wundauflagen

Es zeigt sich in Abbildung 188, dass die Wundauflagen sehr große Unterschiede hinsichtlich Ihrer Zugfestigkeit und Elastizität aufweisen. So zeigt die Polyurethanauflage (Cutinova) eine sehr hohe Elastizität bei geringer Zugfestigkeit. Hingegen zeigt die Polylactatauflage (Topskin) eine geringe Elastizität bei hoher Belastbarkeit. Es muss jedoch bedacht werden, dass es sich bei den Messwerten um normierte Werte handelt. So wird bei dem Cutinova Produkt eine ca. 1,4 cm dicke Auflage verwendet, die die geringe Zugkraft erhöht. Durch die hohe Zugfestigkeit von ca. 17 MPa beim Topskin (Polylactat) ist es ausreichend, eine ca. 30

$\mu\text{m}$  dicke Folie zu verwenden. Hierdurch resultiert bei einer 1 cm breiten und 30  $\mu\text{m}$  dicken Folie eine gute Zugfestigkeit von 56 N für diese Membran. Bei dem Produkt Urgo handelt es sich um Nylonfasern, die mit einer Mischung aus Vaseline und Carboxymethylcellulose versetzt sind. Diese weisen für Fasern ein typisches Bruchmuster auf das in den Zug-Dehnungs Diagramm in Abbildung 188 abgebildet ist.

Die Untersuchung der Zugfestigkeit von Chitosanauflagen soll zeigen, in wie weit sich die mechanischen Eigenschaften dieser Membranen hinsichtlich des Glyceringehaltes und der Molmasse des verwendeten Chitosan unterscheiden und in wie weit Chitosanauflagen mit anderen Auflagen konkurrieren können. Die angegebenen Glyceringehalte entsprechen dem Glyceringehalt in den Chitosanmembranen.



Bei allen untersuchten Chitosanfolien (siehe Abbildung 189) nimmt die Elastizität mit zunehmendem Glyceringehalt zu. Es muss jedoch eine geringere mechanische Belastbarkeit in Kauf genommen werden. Das Glycerin in den Folien verhält sich wie ein Lösungsmittel. Es kommt hierdurch zu einer Quellung des Netzwerkes. Dies wiederum wird durch eine Aufweitung der Polymerketten bewirkt (vergleiche auch Abbildung 142). Durch eine zunehmende Glycerinkonzentration können sich immer weniger molekulare Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Kräfte zwischen den Polymerketten ausbilden. Das enthaltene Glycerin schirmt hierbei die Polymerketten gegenüber Wechselwirkungen zwischen den Polymeren zum Teil ab. Die Zugfestigkeit zeigt bei diesen Folien ein Auseinanderfließen des Probenkörpers (vergl. z.B. Chitosan 9 – 66 % Glycerin). Hierbei steigt die Zugkraft fast linear mit der Deformation an. Bei den Folien ohne zusätzlichen Weichmacher oder mit nur wenig Glycerin zeigen die Proben einen Epsilon- Bruch d.h., die Zugkraft besitzt ein Maximum. An diesem Punkt werden die molekularen Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten aufgebrochen (Abbildung 189). Wird dieser Punkt überschritten kann die Membran bei Verringerung der Zugkraft nicht mehr in ihre Ausgangsform zurückkehren.

Es wurden drei Chitosane mit unterschiedlicher Molmasse für die Zug-Dehnungs Untersuchungen (Molmasse  $Ch_7 < Ch_9$ ) eingesetzt. Außerdem wurde eine Chitosanprobe mit einer möglichst breiten Molmassenverteilung durch das aquimolare Abmischen der Chitosane 7-9 erreicht (Chitosan-Breit unten rechts in Abbildung 189). Zur Berechnung der Stoffmengen wurden die viskosimetrisch ermittelten Molmassen herangezogen.

Es zeigt sich in Abbildung 189, dass die Zugfestigkeit mit der Molmasse ansteigt. So kann bei Chitosan 7 mit der geringsten Molmasse eine Zugfestigkeit von 75 MPa für die Membran ohne Glycerin festgestellt werden. Bei der Membran aus Chitosan 9 mit der höchsten Molmasse kann ein um 13 % höherer Wert für die Zugbelastbarkeit von 85 MPa (ohne Glycerin) festgestellt werden. Die Deformierbarkeit der Chitosanfolien, mit geringem Chitosangehalt (0,5 %), ist bei den Chitosanfolien mit der höheren Molmasse größer. So kommt es beim Chitosan 7 (niedrige Molmasse) schon bei einer Deformation von 23 %, und demgegenüber bei Chitosan 8 und Chitosan 9 (höhere Molmasse) erst bei einer Deformation von 37-42 % zum Bruch der Membranen. Durch eine geringe Molmasse können weniger Verknüpfungspunkte zwischen den Polymerketten z.B. durch Verschlaufungen geschlossen werden. Diese Wechselwirkungen sind maßgeblich für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich. Die abgemischte Chitosanprobe mit der breiten Molmassenverteilung weist

die höchste Zugfestigkeit von 98 MPa (ohne Glycerin) auf. Durch die breite Molmassenverteilung können nun auch kurze Ketten in „Hohlräume“ vordringen und dort Wechselwirkungen mit den anderen Polymeren eingehen. Hierdurch wird die Zugbelastbarkeit nochmals um 15 % gegenüber dem hochmolekularen Chitosan 9 erhöht.

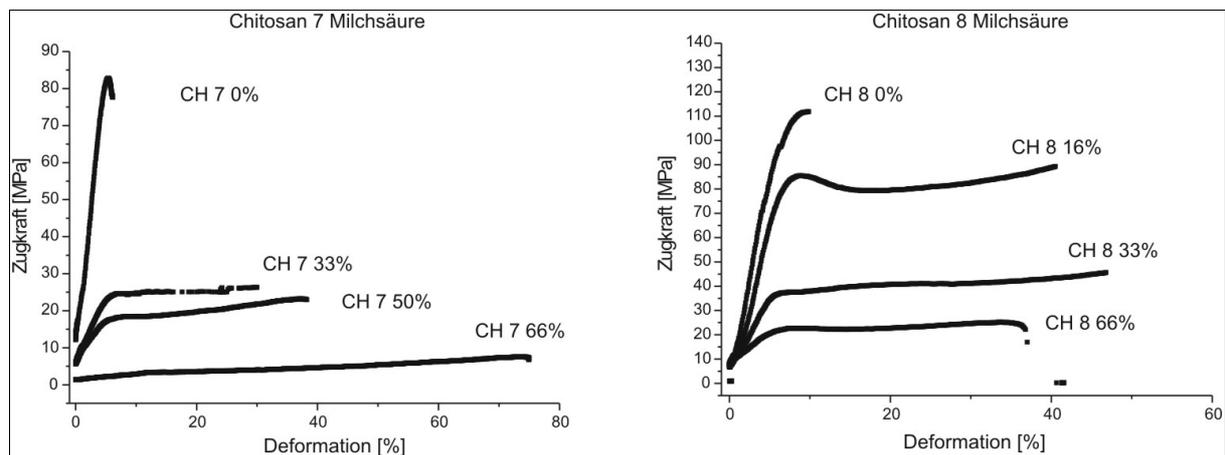


Abbildung 190: Zug-Dehnungs Diagramme von Chitosanlactatfolien in Abhängigkeit des Glyceringehaltes unter Verwendung unterschiedlicher Molmassen (normiert MPa = N/mm<sup>2</sup>).

Auch bei Verwendung von Chitosanlactatfolien (Abbildung 190) gelten hinsichtlich der Molmasse und des Glyceringehaltes im Bezug auf die Zugbelastbarkeit, Flexibilität und Elastizität die beschriebenen Zusammenhänge. Diese Folien weisen generell eine höhere Zugbelastung auf als Folien aus Chitosanacetat. So ist die Zugbelastbarkeit bei Chitosanacetatfolien bei Verwendung von Chitosan 7 um 14 % und bei Chitosan 8 um 25 % größer (Abbildung 190).

Durch die Zugabe von Glycerin wird die Elastizität und Flexibilität der Chitosanfolien erhöht. Die Zugbelastbarkeit nimmt jedoch ab. Es wurden um die vorherige Aussage zu überprüfen vernetzte Chitosanfolien hergestellt, die einen Glyceringehalt von 33 % aufweisen. Als Vernetzer wurde Glyoxal verwendet. Die angegebenen Brüche in Abbildung 191 beziehen sich auf den Vernetzergehalt pro Monomereinheit (z.B. 1/25 = 1 Teil Vernetzer auf 25 Teile Monomere).

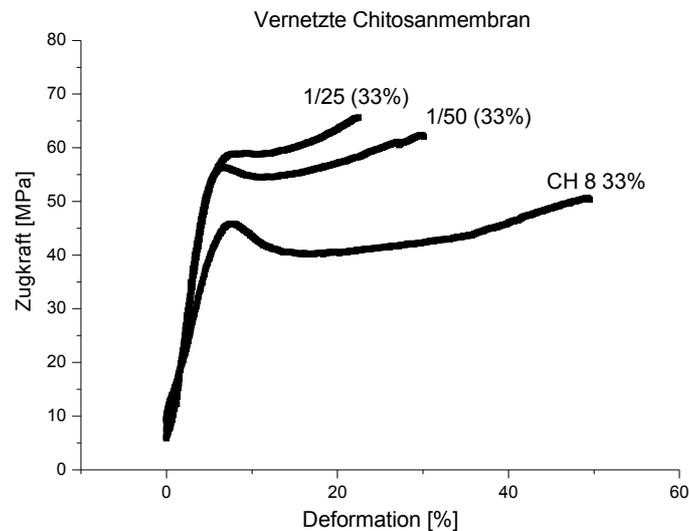


Abbildung 191: Zug-Dehnungs Diagramme von vernetzten Chitosanmembranen in Abhängigkeit des Vernetzergehaltes mit 1 % Glycerin (normiert  $\text{MPa} = \text{N/mm}^2$ ).

Es zeigt sich, dass durch die Vernetzung eine höhere Zugbelastbarkeit erreicht werden kann. Die Deformationsfähigkeit verringert sich mit zunehmender Vernetzung. Durch die neuen kovalenten Verknüpfungen zwischen den Polymerketten entsteht ein Netzwerk mit einer größeren Anzahl von Verknüpfungspunkten. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen - zwischen den Polymeren - erzeugen eine höhere mechanische Festigkeit. Durch die kovalente Verknüpfung nimmt die Elastizität durch verminderte Kettenbeweglichkeit ab. Es ist jedoch bei diesen vernetzten Membranen noch eine ausreichende Elastizität und Flexibilität für den Anwendungsbereich gegeben. Durch die Deformationsfähigkeit von  $>20\%$  entsteht eine Membran mit einer guten Flexibilität die sich bei der Applikation auf eine Wunde dem Wundbett anpassen kann. Hierdurch können sich keine störenden Lufteinschlüsse zwischen Wundbett und der Membran ausbilden die Wundheilung negativ beeinflussen können.

Die hier verwendeten Chitosanfilme quellen in wässrigen Systemen sehr stark und verlieren hierbei weitestgehend ihre mechanischen Eigenschaften. Dies könnte insbesondere bei stark exudierenden Wunden ein Problem darstellen. Durch die hohe Flüssigkeitsaufnahme kann die Membran mechanisch instabil werden und es besteht die Gefahr, dass die Barrierefunktion der Chitosanmembran durch mechanische Einwirkung verletzt wird. Des Weiteren sind die Chitosanmembranen gegenüber seitlich auf den Film einwirkenden Kräften, wie sie z.B. durch Verdrehen und Knicken auftreten, insbesondere in feuchten gequollenem Zustand, mechanisch empfindlich. Um die o.g. Probleme zu lösen, wurden gewebeverstärkte und

faserverstärkte Membranen hergestellt und untersucht (Abbildung 192).

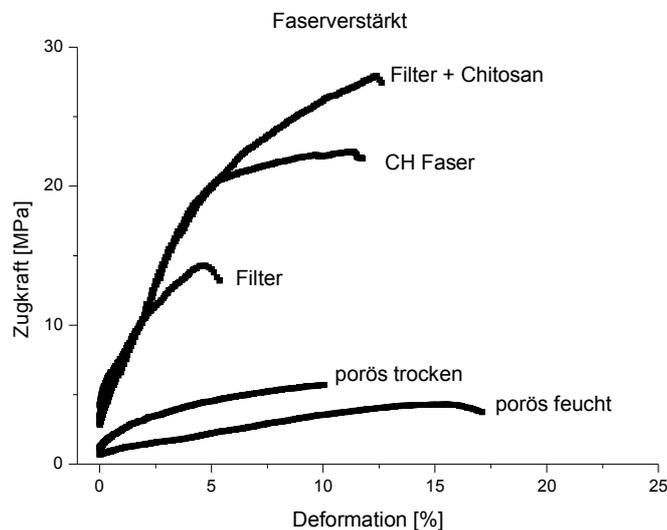


Abbildung 192: Zug-Dehnungs Diagramme von verschiedenen verstärkten Chitosanmembranen in Abhängigkeit des Trägermaterials und der Quellung (normiert  $MPa = N/mm^2$ ).

Als Faserverstärkung wurde ein Rundfilter mit einer Dicke von ca. 120  $\mu m$  verwendet. Dieser weist gegenüber den Chitosanmembranen eine wesentlich geringere mechanische Belastbarkeit auf (14 MPa gegenüber 75-98 MPa). Durch den Faserkern wird deshalb bei der faserverstärkten Chitosanfolie eine geringere mechanische Belastbarkeit hervorgerufen. Bei den mikroporösen faserverstärkten Chitosanfilmen fällt auf, dass diese eine wesentlich geringere mechanische Belastbarkeit (5 MPa) gegenüber den faserverstärkten (glatten) Chitosanmembranen (27 MPa) aufweisen. Diese Abnahme der Zugbelastbarkeit resultiert aus dem mechanisch nicht sehr stabilen mikroporösen schaumartigen Chitosananteil in dieser Composite-Membran. Durch die Verwendung von ca. 300  $\mu m$  dicken Membranen wird jedoch dieser Nachteil sehr gut kompensiert. Eine 1 cm breite faserverstärkte Membran besitzt bei einer Dicke von 300  $\mu m$  demnach eine Zugbelastbarkeit von ca. 85 N (8,5 kg). Eine Gewebeerstärkung mit z.B. einem Geflecht aus Baumwollfäden (Ch Faser) limitiert die Deformationsfähigkeit der Folien. Es wird jedoch wie bei den faserverstärkten Auflagen eine wesentlich höhere Belastbarkeit hinsichtlich seitlich einwirkender Kräfte erreicht. So ist es nur unter hohem Kraftaufwand möglich, gewebeerstärkte bzw faserverstärkte Chitosanfolien zu zerreißen. Insbesondere im feuchten gequollenen Zustand verleihen die Fasern den

---

Membranen einen höhere mechanische Belastbarkeit.

Es zeigt sich, dass das hochmolekulare Chitosan bzw. Chitosan mit einer möglichst breiten Verteilung, hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften das geeignetste Material darstellt. Des weiteren weisen Folien aus Chitosanlactat gegenüber Folien aus Chitosanacetat eine höhere mechanische Belastbarkeit auf. Da die Wundheilungseigenschaften bei beiden fast identisch sind, sollte Chitosanlactat hinsichtlich der mechanischen Belastbarkeit Verwendung finden.

Durch eine Vernetzung der Chitosanfilme kann zusätzlich die Reißfestigkeit erhöht werden bei akzeptabler Elastizität und Flexibilität. Durch das Einbringen von Fasern wie z.B. Papier oder Geweben in die Chitosanfolien kann zusätzlich ein Einreißen der Membranen - auch im feuchten Zustand - zuverlässig verhindert werden. So lassen sich auch Chitosanauflagen herstellen die den starken mechanischen Belastungen standhalten wie dies z.B. bei der veterinärärztlichen Wundversorgung auftreten kann.

### **5.3.12 Langzeitstabilitätsuntersuchungen**

Für eine später mögliche kommerzielle Nutzung der hier vorgestellten Membranen - insbesondere im Bereich der Medizinprodukte - ist es erforderlich, dass die Produkte über eine ausreichende Lagerstabilität verfügen. Des weiteren sollte sich die Membran gegenüber der Wundflüssigkeit inert verhalten. Es wurden deshalb sowohl Untersuchungen der Lagerstabilität und Stabilitätsuntersuchungen der Membranen in simulierter Wundflüssigkeit durchgeführt. Die Lagerstabilität wurde über das Wasserdampfpermeationsvermögen der Chitosanmembranen detektiert, siehe hierzu Kapitel 5.3.6. Die Ergebnisse des Wasserdampfpermeationsvermögen in Abhängigkeit der Lagerungsbedingungen der Chitosanmembranen über einen Zeitraum von 8 Monaten ist in Abbildung 193 dargestellt.

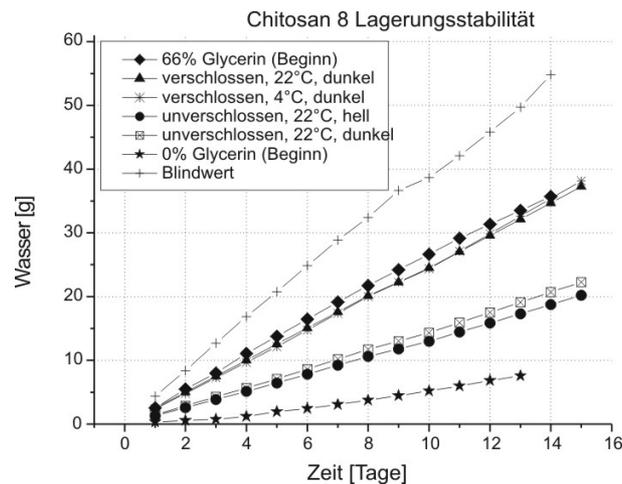


Abbildung 193: Einfluss des Wasserdampfpermeationsvermögens von Chitosanfolien in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur und der Verpackung (Lagerungsstabilität).

Der in der Abbildung 193 angegebene Blindwert gibt die maximale Wasserdampfaufnahme bei dieser Untersuchung wieder. In Abbildung 193 wurden Chitosanmembranen über einen Zeitraum von 8 Monaten unterschiedlichen Lagerbedingungen ausgesetzt. Es handelt sich bei allen Membranen um Chitosanacetatfolien (Chitosan8) die 66 % Glycerin enthalten. Eine Auflage wurde in einen Kunststoffbeutel mit einem Schnellverschlusssystem gegeben und bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) unter Ausschluss elektromagnetischer Strahlung und eine zweite Auflage in einem Kunststoffbeutel im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt. Ein anderer Teil der Membran wurde unverschlossen an einem dunklen Ort und auf der Fensterbank, also unter dem Einfluss von Sonnenlicht, gelagert. Es zeigt sich, dass die verpackten Membranen ihre Permeationseigenschaften über einen Zeitraum von 8 Monaten erhalten konnten. Hierbei kann im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied in der Wasserdampfdurchlässigkeit im Hinblick auf die Lagertemperatur festgestellt werden. Die unverschlossenen Membranen weisen - unabhängig von dem Einwirken elektromagnetische Strahlung - nach 8 Monaten ein deutlich vermindertes Permeationsvermögen auf. Dies ist auf ein langsames kontinuierliches Ausgasen des Glycerins aus der Membran zurückzuführen. Durch den Vergleich mit der Membran ohne Glycerin (0 % Glycerin-Beginn) und dem Zusammenhang zwischen dem Glyceringehalt und dem Permeationsvermögen der Membranen aus Abbildung 151 kann darauf geschlossen werden, dass sich der Glyceringehalt in den Folien auf 50 % verringert hat. Es sollte zur Lagerung eine Verpackung gewählt werden, die eine möglichst hohe Dampfsperreffunktion aufweist. Hierzu bieten sich z.B. Kunststoff-Folien oder beschichtetes Papier an. Durch die Einwirkung von elektromagnetische Strahlung, über einen Zeitraum von

8 Monaten, kommt es bei der Chitosanmembran die dem Sonnenlicht ausgesetzt war, zu einer etwas dunkleren Verfärbung der Membran gegenüber der Chitosanfolie die dem Sonnenlicht nicht ausgesetzt war. Demzufolge sollte das Verpackungsmaterial zusätzlich eine hohe Absorptionsfähigkeit gegenüber elektromagnetische Strahlung aufweisen.

Außerdem wurden mit den Chitosanmembranen Stabilitätstests in einer Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung durchgeführt.

Ein ca. 7 cm großes, rundes Stück einer neutralisierten und einer vernetzten Chitosanmembran wurde in eine Petrischale gegeben und mit ca. 10 ml einer Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung versetzt. Die verwendeten Ringer- Ringer-Lactat-Lösungen wurden aus handelsüblichen Infusionsbeuteln entnommen. Die Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung wurde jede Woche gewechselt damit es zu keiner Verkeimung der Lösung kommen konnte. Dieser Stabilitätstest wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt.

Nach 2 Wochen wurde folgendes festgestellt:

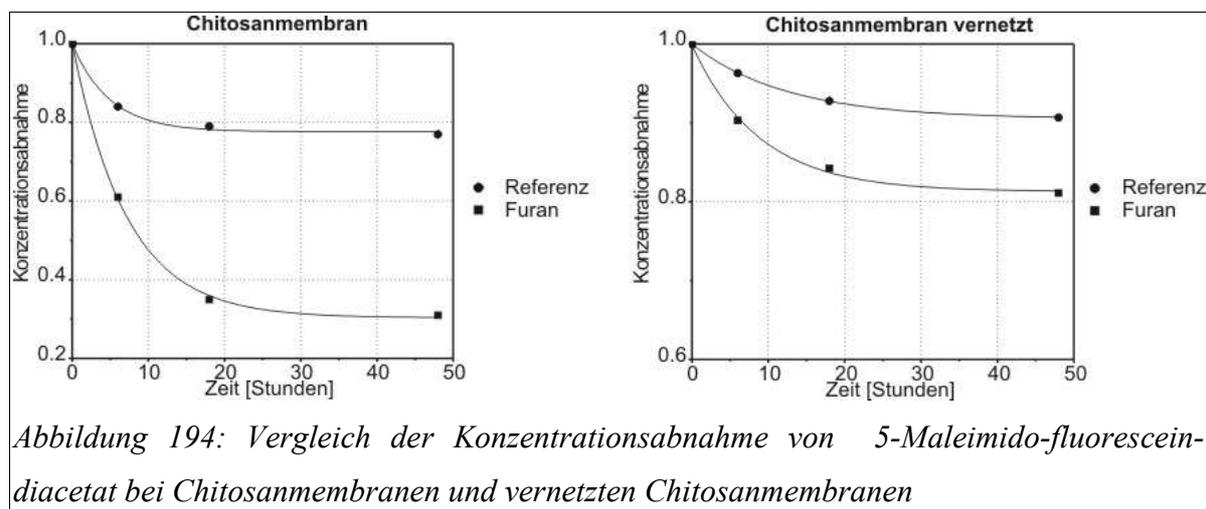
- kein Masseverlust
- keine sinnesphysiologischen Änderungen der Membran
- keine Veränderung der Dicke

Es zeigt sich also, dass sich die Chitosanmembranen, durch langen Kontakt mit einer Ringer- bzw. einer Ringer-Lactat Lösung, nicht nachhaltig beeinflussen lassen. Dies gilt sowohl für das physikalische und das chemische Netzwerk.

### **5.3.13 Diels-Alder-Reaktionen an Chitosanmembranen**

Es wurden furanmodifizierte Chitosanmembranen untersucht. Diese wurden aus einer essigsauren Lösung aus Chitosanfuranamid (DS = 0,23) durch Trocknen gewonnen. Zum Vergleich wurden identische Chitosanmembranen verwendet. D.h. Membranen aus dem gleichen Polymer, die unter identischen Bedingungen hergestellt wurden. Außerdem wurde eine Chitosanfuranamid-Membran ca. 1 Stunde bei 60 °C in einer Lösung, die 0,1 mmol Epichlorhydrin enthält, vernetzt. Die Chitosanmembran, die bei dieser Untersuchung als

Referenz dient, wurde ebenfalls unter identischen Reaktionsbedingungen vernetzt. In Abbildung 194 ist die Konzentrationsabnahme von 5-Maleimido-fluorescein-diacetat bei Anwesenheit von Chitosanfuranamid (DS = 0,23) und „normalen“ Chitosanmembranen abgebildet. Die Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 7.5 beschrieben.



Es zeigt sich, dass sich die unvernetzte, dien-modifizierte Chitosanmembran (linkes Diagramm in Abbildung 194 - Furan) in dem Reaktionsmedium (90 % Natriumphosphatpuffer und 10 % Dimethylsulfoxid) gut umsetzen lässt. Nach 48 Stunden Reaktionszeit kommt es durch Adsorptionsprozesse zu einer Konzentrationsabnahme von ca. 21 % bei der nicht funktionalisierten Membran (Referenz).

Die mit Furanen funktionalisierte Chitosanmembran zeigt eine Konzentrationsabnahme von ca. 70 % nach 48 Stunden. Diese erhöhte Konzentrationsabnahme an 5-Maleimido-fluorescein-diacetat, weist auf eine Diels-Alder-Reaktion an den Membranen hin. Der Umsatz der Reaktion beträgt demnach 51 %. Der dargestellte zeitliche Verlauf zeigt eine exponentielle Abnahme der Farbstoffkonzentration, wobei sich nach ca. 20 Stunden zu >95 % das chem. Gleichgewicht eingestellt hat.

Bei den mit Epichlorhydrin vernetzten Chitosanmembranen zeigt sich, dass sich die Membranen wesentlich schlechter umsetzen lassen. Nach 48 Stunden Reaktionszeit kommt es durch Adsorptionsprozesse zu einer Konzentrationsabnahme von ca. 9 % bei der nicht funktionalisierten vernetzten Membran (Referenz).

Die mit Furanen funktionalisierte vernetzte Chitosanmembran zeigt eine Konzentrationsabnahme von ca. 19 % nach 48 Stunden. Diese erhöhte Konzentrationsabnahme an 5-Maleimido-fluorescein-diacetat weist auf eine Diels-Alder-

Reaktion an den Membranen hin. Der Umsatz der Reaktion beträgt demnach nur 10 %. Der dargestellte zeitliche Verlauf zeigt eine exponentielle Abnahme der Farbstoffkonzentration, wobei sich nach ca. 20 Stunden zu >95 % das chem. Gleichgewicht eingestellt hat.

Die geringe Reaktionsfähigkeit bei den funktionalisierten, vernetzten Chitosanmembranen kann mit der geringeren Quellbarkeit dieser Membranen erklärt werden. Hierdurch wird eine Aufweitung der Netzwerkstruktur verhindert, durch die die Reaktionspartner leichter ineinander diffundieren können und somit auch die Möglichkeit zu Reaktion haben.

Das tatsächlich eine chemische Reaktion stattfindet, zeigt sich auch visuell an der Verfärbung der furanmodifizierten Membranen.



*Abbildung 195: furanmodifizierte Chitosanmembranen (rot) und „normale“ Chitosanmembran nach Reaktion mit 5-Maleimido-fluorescein-diacetat.*

In Abbildung 195 ist eine mit Furanen modifizierte Chitosanmembran und eine normale Chitosanmembran abgebildet. Im linken Photo befanden sich die Membranen 48 Stunden in der gelb-grünen, fluoreszierenden Reaktionslösung. Bei der Membran, die sich deutlich rötlich verfärbt hat, handelt es sich um die mit Furanen modifizierte Membran. Im rechten Photo sind die Membranen nach 48 Stunden Reaktionszeit ohne die Reaktionslösung angegeben. Im linken Reagenzglas des rechten Photos ist deutlich eine Fluoreszenz bei der „normalen“ Chitosanmembran zu erkennen. Diese gelb-grüne Fluoreszenz kann nur durch eine Adsorption oder Diffusion des 5-Maleimido-fluorescein-diacetat ohne chemische Reaktion an oder in die Membran hervorgerufen werden.

Durch die homogene Vernetzung von Chitosan mit Dialdehyten entsteht zunächst ein Hydrogel. Dieses wurde aus einer essigsauren Chitosanlösung bzw. einer essigsauren Lösung aus Chitosanfuranestern mit Glutaraldehyd als Vernetzer (Vernetzer : Polymer - 1:100)

hergestellt. Zur Indizierung des Vernetzungsprozess wurde die Lösung 1 Stunde auf 60 °C erhitzt. Diese Hydrogele (100 mg) wurden direkt in die Reaktionslösung (5 ml) gegeben.

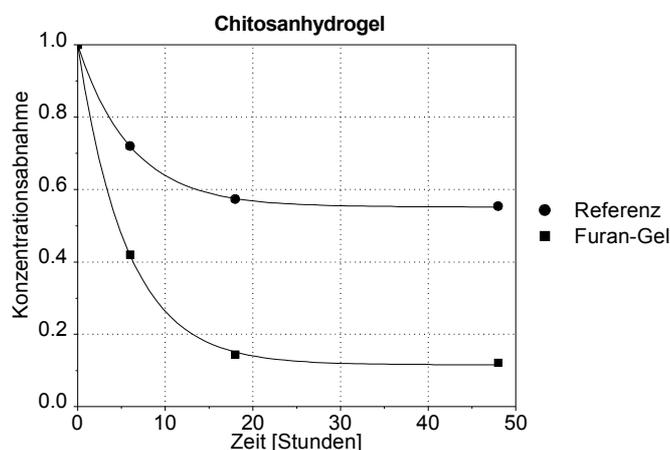


Abbildung 196: Vergleich der Konzentrationsabnahme von 5-Maleimido-fluorescein-diacetat bei vernetzten Chitosanhydrogelen.

Es zeigt sich, dass sich das unvernetzte, dien-modifizierte Chitosanhydrogel in dem Reaktionsmedium gut umsetzen lässt. Nach 48 Stunden Reaktionszeit kommt es durch Adsorptionsprozesse zu einer Konzentrationsabnahme von ca. 43 % bei den nicht funktionalisierten Chitosanhydrogel (Referenz). Das mit Furanen funktionalisierte Hydrogel zeigt eine Konzentrationsabnahme von ca. 89 % nach 48 Stunden. Diese erhöhte Konzentrationsabnahme an 5-Maleimido-fluorescein-diacetat weist auf eine Diels-Alder-Reaktion an den Membranen hin. Der Umsatz der Reaktion beträgt demnach 46 %. Der in Abbildung 196 dargestellte zeitliche Verlauf zeigt eine exponentielle Abnahme der Farbstoffkonzentration. Nach ca. 20 Stunden hat sich zu >95 % das chem. Gleichgewicht eingestellt. Bei den Chitosanhydrogelen kommt es wie bei den Chitosanmembranen zu einer Rotfärbung der dienmodifizierten Hydrogele und zu einer gelb-grünen Fluoreszens der Hydrogele die als Referenz eingesetzt wurden.

### 5.3.14 Zusammenfassung

Die hergestellten und untersuchten Chitosanmembranen zeigen wahrscheinlich das größte Potenzial für die Versorgung von Problemwunden wie z.B. infizierte Wunden auf. Chitosan weist einige sehr hilfreiche Eigenschaften bezüglich der Blutgerinnung und Immobilisierung von Mikroorganismen bei der Versorgung von Wunden auf. Die Einlagerung von Mikroorganismen in die Netzwerkstruktur liegt ursächlich in der Kationizität der Chitosanmembran, die die negativ geladenen Mikroorganismen hauptsächlich durch diese ionischen Wechselwirkungen an sich bindet. Hierdurch werden pathogene Keime unabhängig von ihrer mikrobiologischen Beschaffenheit (starre Zellwand, ein oder mehrlagige Zellwand) aus der Wundflüssigkeit entfernt [195] [196]. Dies stellt einen großen Fortschritt bei der Behandlung von infizierten Wunden dar, da Antibiotika bei resistenten Keimen versagen (Hospitalerreger) und Desinfektionsmittel in Abhängigkeit der mikrobiologischen Beschaffenheit der Erreger unterschiedliche Wirkungsweisen zeigen. Die negative Ladung der Mikroorganismen wird durch die Ausbildung einer Resistenz nicht beeinflusst, so dass unselektiv die Erreger in die Netzwerkstruktur weitestgehend irreversibel aufgenommen werden. Die Chitosanmembran stellt ein ausgesprochen schlechtes Nährmedium für diese Erreger dar, so dass die Reproduktion dieser Erreger in der Auflage stark vermindert ist. Medizinische Studien mit Chitosanfolien zeigen außerdem eine sehr schnelle Trombozytenagglutination der Wundflüssigkeitsbestandteile (Blut) bei Kontakt mit der Membran. Eine Vergrößerung der Oberfläche dieser Membranen sollte demnach zu einer Verstärkung bzw. Beschleunigung der oben beschriebenen physikalischen Adsorptionsprozesse oder der Blutgerinnung führen. Es wurden daher Chitosanmembranen mit einer makro- und mikroporösen Oberflächenstruktur hergestellt. Ein thermisches Aufschmelzen von Chitosan ist durch starke Wasserstoffbrückenbindungen - wie auch bei der Cellulose - nicht möglich. Hierdurch können etablierte Verfahren zur Herstellung von definierten Oberflächenstrukturen mit Hilfe der Spritzgusstechnik nicht angewendet werden. Es ist jedoch möglich, durch die Zugabe von Partikeln oder eines anderen Polymers zu der Chitosanlösung, aus der die Auflagen erzeugt werden, mit einem anschließendem selektiven Herauslösen, diese Substanzen aus der Folie makro- und mikroporöse Oberflächenstrukturen zu erzeugen. Hierbei entspricht die Porengröße weitestgehend der Größe der hinzugefügten Partikel. Durch unterschiedliche Konzentrationen der Partikel und der Chitosanlösung lässt sich des Weiteren die spezifische Oberfläche der Membranen stark verändern. Durch die

Zugabe eines Polymers (z.B. Polyethylenglycol) zu der Chitosanlösung und anschließendes Herauslösen dieses Polymers ist es möglich, mikroporöse Membranen zu erzeugen, wobei hierbei die Porengröße maßgeblich von der Molmasse des zugegebenen Polymers abhängt.

Rheomechanische Schwingungsmessungen im linear viskoelastischen Bereich an unvernetzten Chitosanmembranen konnten zeigen, dass sich die Verhängungsmolmasse durch Zugabe von Glycerin als Weichmacher nur geringfügig ändert. Durch die hervorgerufene Quellung der Chitosanmembranen - durch die Weichmacherzugabe - erhöht sich jedoch der Netzpunktabstand. Man könnte sagen, dass sich die Maschen der Membranen aufweiten. Bei einem Vergleich von Chitosanmembranen unterschiedlicher Molmasse zeigt sich, dass niedermolekulares Chitosan eine wesentlich höhere Quellfähigkeit gegenüber Wasser als hochmolekulares Chitosan aufweist. Eine breite Molmassenverteilung führt aufgrund der hochmolekularen Anteile zu einem ähnlichen Verhalten, wie es bei den hochmolekularen Chitosanauflagen zu beobachten ist.

Durch die Zugabe von Glycerin als Weichmacher zu den Chitosanmembranen verändert sich wie oben beschrieben der Netzpunktabstand. Hierdurch wird die Permeationsfähigkeit dieser Membranen durch eine verbesserte Diffusion von Gasen dieser Membranen stark erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass es auch hier einen Einfluss der Molmasse auf das Permeationsvermögen gibt. Die niedermolekularen Verbindungen zeigen bei geringer Glycerinzugabe nur einen geringen Anstieg der Permeationsfähigkeit (Plateaubereich). Bei hoher Weichmacherzugabe werden jedoch ähnliche Werte wie bei den hochmolekularen Chitosanen erreicht. Die hochmolekularen Chitosane zeigen eine lineare Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit mit Erhöhung der Weichmacherkonzentration. Außerdem werden durch die Glycerinzugabe die mechanischen Eigenschaften der Membran sehr stark verändert. Ein Glycerineinbau in die Membranen erhöht sehr stark die Elastizität und Flexibilität der Membranen. Hierfür muss jedoch eine geringere Zugbelastbarkeit der Membranen in Kauf genommen werden.

Eine heterogene Diels-Alder-Reaktion an Dien-modifizierten Chitosanmembranen ist möglich und wird maßgeblich durch die Quellfähigkeit bzw. durch die Netzwerkstruktur der Membranen bestimmt.

## 6 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle hergestellten Folien hinsichtlich ihrer *in vitro* Untersuchung für die Versorgung von Wunden geeignet sind. Bei der Bakteriencellulose und den Chitosanaufgaben liegen außerdem umfassende medizinische Studien vor, die diesen Membranen eine gute Eignung für die Versorgung von verschiedenen Wunden bescheinigen. Die hergestellten Membranen folgen dem Prinzip der *feuchten Wundheilung*, d.h. der Wundgrund wird hierbei vor einem Austrocknen geschützt. Des Weiteren dienen die Membranen aufgrund ihrer kompakten Struktur als Barriere gegenüber pathogenen Keimen, die von außen in die Wunde gelangen können. Insbesondere bei Chitosanmembranen kann durch Variation der Weichmacherkonzentration die Netzwerkstrukturparameter der Membranen verändert werden. Hieraus resultiert eine höhere Gasdurchlässigkeit und Flexibilität der Membran. Es wurden diverse Untersuchungen mit Glycerin als Weichmacher durchgeführt. Es ist jedoch möglich auch andere Weichmacher wie z.B. Polyethylenglycol zu verwenden. Hierdurch lassen sich die Eigenschaften der Membranen weiter beeinflussen. Außerdem kann die spezifische Oberfläche von Chitosanmembranen stark vergrößert werden. Hierbei entsteht ein offenporiges System innerhalb der Membran mit einer asymmetrischen Porenverteilung. Chitosan weist einige sehr hilfreiche Eigenschaften bezüglich der Blutgerinnung und Immobilisierung von Mikroorganismen bei der Versorgung von Wunden auf. Durch die Vergrößerung der Oberfläche sollen diese positiven Eigenschaften unterstützt werden.

Die Symplexmbranen die eine kompakte Struktur aufweisen zeichnen sich durch einen hohen Quellfähigkeit (bis Faktor 40) gegenüber Wasser aus. Die Gasdurchlässigkeit dieser Membranen ist sehr hoch. Hierdurch wird verhindert, dass sich ein anaerobes Milieu in der Wunde unter der Symplexmbran ausbildet. Hierdurch sind diese Membranen vermutlich auch für die Versorgung von sehr stark exudierende Wunden wie diese z.B. bei der Spalthautentnahme auftreten geeignet. Es liegen jedoch z.Z. keine medizinischen Untersuchungsergebnisse vor.

Die Netzwerkstrukturparameter der Symplexe lassen sich durch die Ladungsdichte und Molmasse der Polyanionen und Polykationen verändern. Die geringe mechanische Stabilität von Symplexen kann leicht durch die Verwendung eines geeigneten Trägermaterial (z.B. Cellulosefasern) kompensiert werden.

Die Bakteriencellulose-Membranen zeigen je nach Aufarbeitungsprozess bzw.

Trocknungsprozess eine stark unterschiedliche Morphologie. Ein Gefriertrocknen der Bakteriencellulose-Membran lässt eine faserartige Struktur entstehen. Durch ein Trocknen bei 60 °C entsteht ein kompakter, milchig-weißer Cellulosefilm. Hierdurch bilden die Cellulosefäden einen kompakten Film, durch den die Gasdurchlässigkeit dieser Membranen im Gegensatz zu den gefriergetrockneten um den Faktor 47 (für Sauerstoff) herabgesetzt wird. Durch den Trocknungsprozess wird außerdem die Quellfähigkeit der bei 60 °C getrockneten Membranen stark herabgesetzt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich Symplexe und Chitosanmembranen in heterogener Reaktionsführung mit Hilfe von Diels-Alder-Reaktionen umsetzen lassen. Hierbei können einfache Verfahren zur Modifizierung der Membranmaterialien mit Dienen oder Dienophilen verwendet werden. Eine Modifizierung von der Bakteriencellulose ist ungleich schwieriger zu realisieren, da eine Umsetzung dieser Cellulose unter Erhalt der Membranstruktur nicht möglich ist.

Die durchgeführten Diels-Alder-Reaktionen an den Membranen stellen nur einen ersten Schritt für die Ankopplung von Wirkstoffen dar. So wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Modellsubstanzen an die Membran gekoppelt, die noch keinen pharmakologischen Nutzen aufweisen. Des Weiteren wurden hauptsächlich Furanderivate als Dien-Komponente eingesetzt, die dann in einer Diels-Alder-Reaktion mit einem „normalen Elektronen-Bedarf“ mit Maleinimidderivaten umgesetzt wurden. Hierbei wirkt die Ester- bzw. Amid-Bindung an der 2-Position des Furans desaktivierend auf die Diels-Alder-Reaktion. Ein weiteres Problem stellt die Reversibilität von den Diels-Alder-Reaktionen dar. Dieses lässt sich durch eine nachträgliche Reaktion an dem Diels-Alder-Addukt unterbinden. Des Weiteren bieten sich „neuartige“ Diene oder Dienophile an, die die Diels-Alder-Reaktion z.B. durch Abspaltung von Stickstoff irreversibel gestalten. Hierdurch könnte eine höhere Anbindungsausbeute bei gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionskinetik resultieren.

---

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Modifizierung von Chitosan mit Dienen oder Dienophilen

#### 7.1.1 Homogene Umsetzung

Chitosan ist ein Copolymer aus 2-Amino-glucose und 2-Acetamid-glucose und besitzt demzufolge an der 2-Position eine Aminogruppe und an der 3- und 6-Position eine Hydroxyl-Gruppe, die mit geeigneten dien- oder dienophil-Derivaten umgesetzt werden kann.

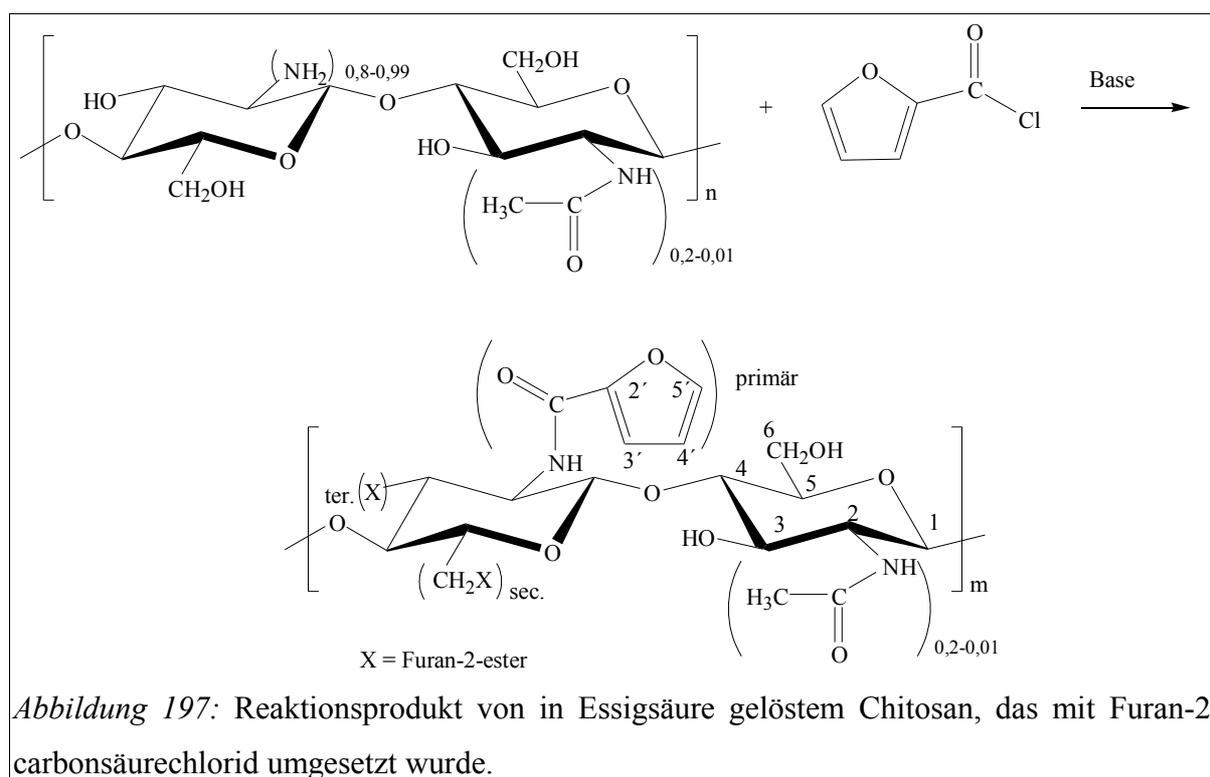
Chitosan löst sich in wässrigen Medien unter Zugabe von verdünnten Säuren. So konnten in diesem Lösungsmittelsystem verschiedene Derivatisierungen des Chitosan durchgeführt werden.

#### Herstellung von Chitosanamiden

5 g Chitosan wird in einen 500 ml Rundkolben gegeben und mit ca. 200 ml einer 1 % Essigsäure gelöst. Zu dieser hochviskosen Lösung wird ca. 200 ml Methanol oder Ethanol gegeben und die Lösung wird unter intensivem Rühren homogenisiert.

Anschließend wird zu der Lösung das entsprechende Carbonsäurechlorid des Diens oder Dienophils gegeben. Teilweise erfolgte eine Zugabe von Triethylamin, die um ca. 10 % höher lag als die zugegebene Stoffmenge des Diens oder des Dienophils.

Die Lösung wird intensiv gerührt und teilweise erhitzt. Nach einer Reaktionszeit von 1-24 Stunden wird das Methanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers aus der Lösung abdestilliert. Die restliche Lösung wird 1-2 Tage dialysiert um die entstandenen Nebenprodukte abzutrennen. Diese so gereinigte Lösung wird eingefroren und mit Hilfe der Lyophilie gefriergetrocknet. Das Produkt ist nach einigen Tagen getrocknet.



Es bildet sich aufgrund der höheren Reaktivität der Aminogruppe gegenüber dem eingesetzten Säurechlorid hauptsächlich die entsprechenden Chitosanamide. Eine Veresterung der Hydroxylgruppen des Chitosan tritt nur bei hohen Umsetzungsgraden auf. Diese weisen jedoch nur eine geringe Löslichkeit in wässrigen Systemen auf und sind daher für die Herstellung von Membranen ungeeignet.

Lösungsmittel	2-Furan-COCl (Äquivalente)	Base	Temperatur	Zeit	DS
Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	4	Et <sub>3</sub> N	RT	48h	ca. 0,63*
Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	2	Et <sub>3</sub> N	RT	48h	0,17
Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	0,25	Et <sub>3</sub> N	RT	48h	0,02
Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	2	Et <sub>3</sub> N	100°C	12h	0,21

Tabelle 46: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter homogenen Reaktionsbedingungen.

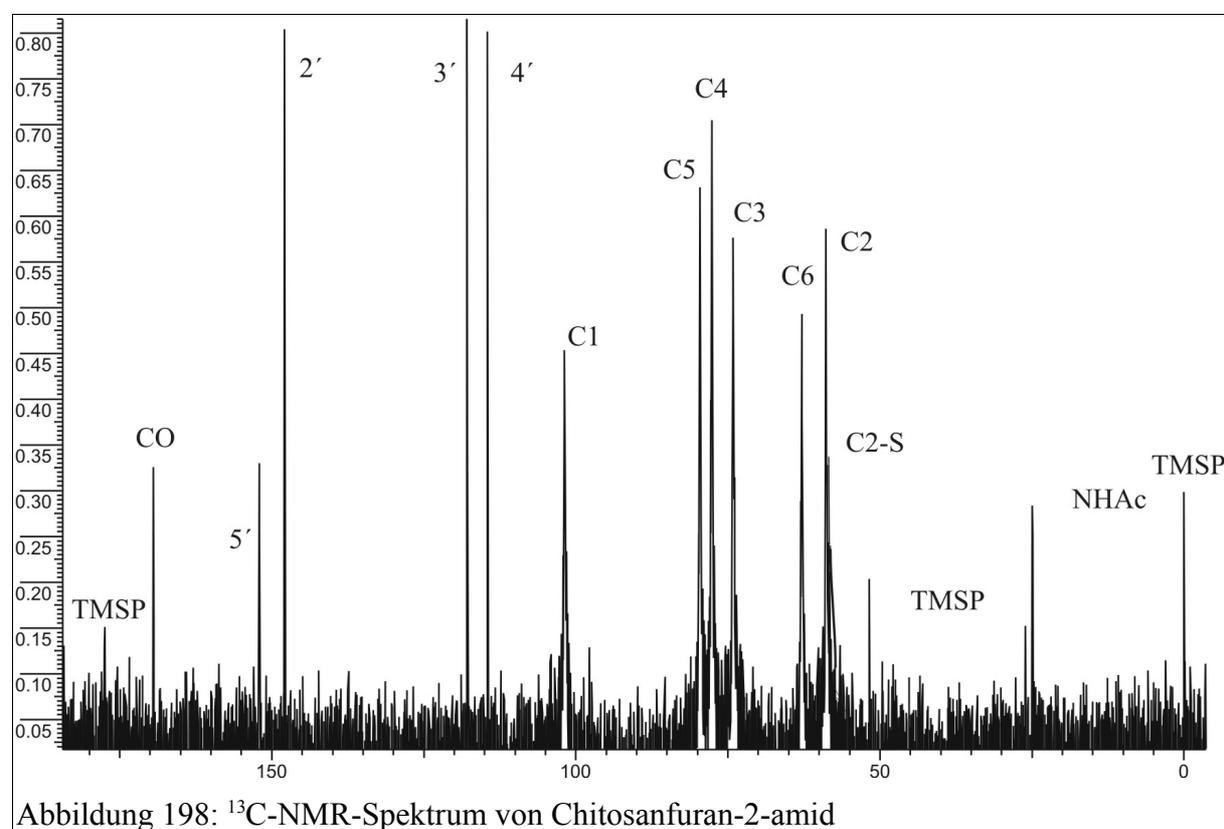
\* Bestimmt über Elementaranalyse wegen Unlöslichkeit

Es wurde mit dieser Reaktionsvariante verschiedenen durchschnittliche Substitutionsgrade erhalten. Die erste Reaktion in der Tabelle 46 weist eine Unlöslichkeit des Produktes in

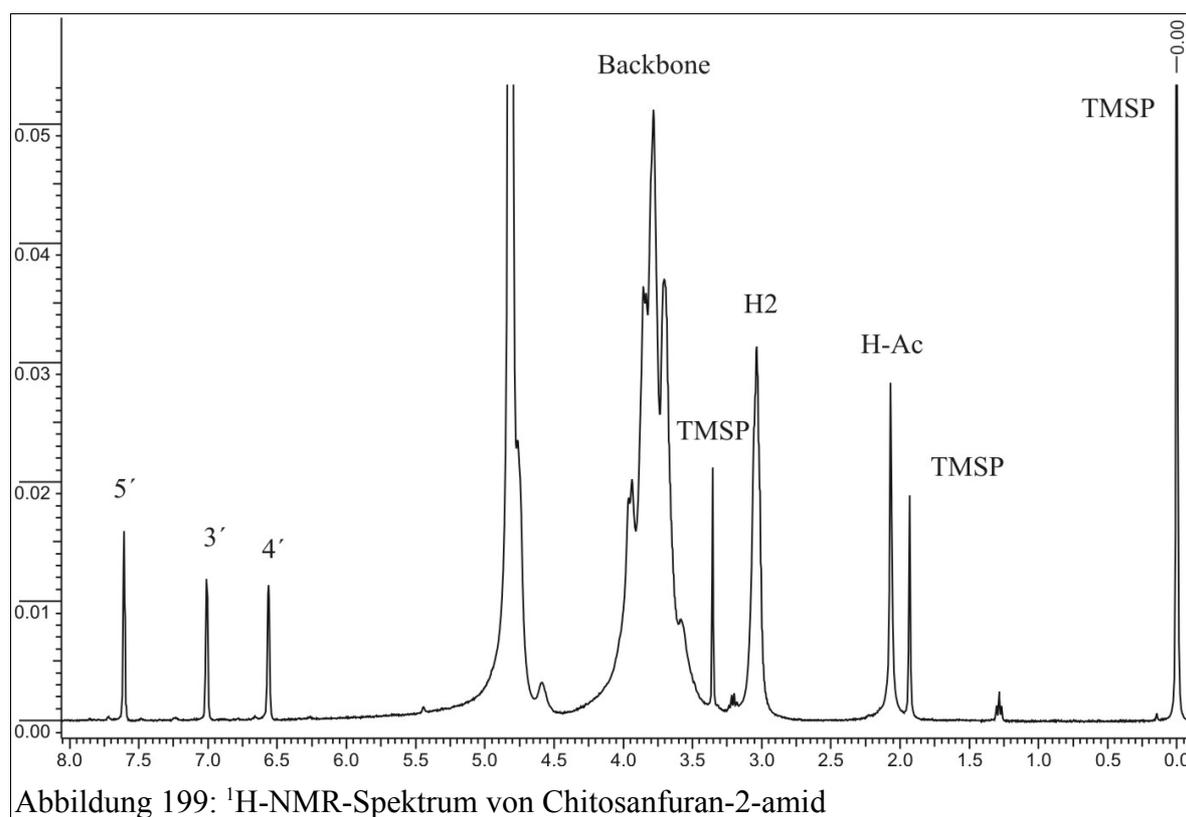
wässrigen Systemen auf aufgrund zu hoher Substitution ( $DS = 0,63$ ) und damit verbundenen Hydrophobierung. Eine Temperaturerhöhung führt zu einem höheren Umsatz bzw. Substitution. Durch eine homogene Reaktionsführung kann nur wenig Chitosan in Lösung gebracht werden, weshalb nur geringe Mengen Chitosan zur Reaktion gebracht werden können. Durch die aufwendige Aufarbeitung (Dialyse und Gefriertrocknung) ist dieses Verfahren sehr zeit- und natürlich Kostenintensiv.

### Analytik:

Zum besseren Vergleich der NMR-Spektren siehe Abbildung 197.



$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{CD}_3\text{COOD}$ ):  $\delta = 0,00$  TMSP; 24,91 (s, NHAc); 25,84 (TMSP); 51,70 (s, TMSP); 58,32 (C2-S); 58,67 (C2); 62,96 (s, C6); 73,88 (s, C3); 77,59 (s, C4); 79,56 (s, C5); 101,87 (s, C1); 114,48 (s, 4'); 117,86 (s, 3'); 147,91 (s, 2'); 152,03 (s, 5'); 169,42 (s, C=O); 177,40 (TMSP).

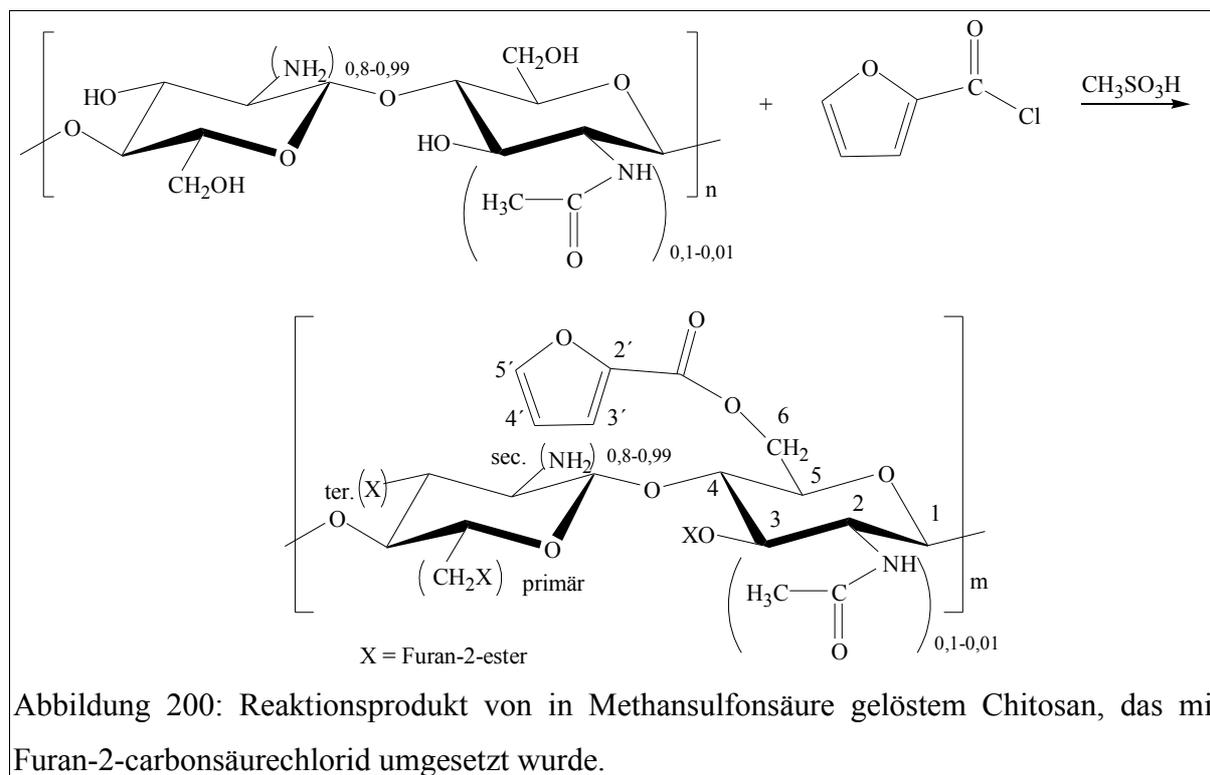


$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 0,00$  TMSP; 1,93 (TMSP); 2,07 (s,  $\text{CH}_3$ -Acetyl); 3,04 (s, H-2); 3,35 (TMSP); 3,49-4,02 (m, Backbone); 4,58 (a, H1-Ac); 6,56 (s, 4'); 7,01 (s, 3'); 7,61 (s, 5').

### Herstellung von Chitosanestern (6-Position)

5 g Chitosan wird in einen 500 ml Rundkolben gegeben und mit ca. 200 ml einer 10-50 % Methansulfonsäure gelöst. Anschließend wird zu der Lösung das entsprechende Carbonsäurechlorid des Diens oder Dienophils gegeben. Durch die Methansulfonsäure bildet sich bevorzugt der Furanester an der 6-Position des Chitosans. Nach Hitoshi Sashiwa et. al. [202] wird der Angriff der Aminogruppe durch einen Salzeffekt der Methansulfonsäure weitestgehend verhindert. Des weiteren hat auch die Konzentration des verwendeten Carbonsäurechlorids einen starken Einfluss auf die Regioselektivität der Umsetzung .

[202] Hitoshi Sashiwa, Norioki Kawasaki, Atsuyoshi Nakayama, Einosuke Muraki, Noboru Yamamoto, and Sei-ichi Aiba, Chemical Modification of Chitosan-Synthesis of Water-Soluble Chitosan Derivatives by Simple Acetylation, Biomacromolecules, Vol. 3, (2002), S. 1126-1128



Die Lösung wird intensiv gerührt und teilweise erhitzt. Nach einer Reaktionszeit von 1-4h wird die viskose Lösung mit einer äquimolaren Menge Natriumhydroxid versetzt. Im leicht sauren Bereich kann die Lösung durch Dialyse gereinigt werden. Im alkalischen Milieu fällt das Chitosan aus und kann prinzipiell durch Filtration abgetrennt werden. Die dialysierte Lösung wird eingefroren und mit Hilfe der Lyophille gefriergetrocknet. Das Produkt ist nach einigen Tagen getrocknet.

Lösungsmittel	2-Furan-COCl (Äquivalente)	Base	Temp	Zeit	DS
MeSO <sub>3</sub> H 10 %	5	Et <sub>3</sub> N	RT	18h	0,11
MeSO <sub>3</sub> H 10 %	3	Et <sub>3</sub> N	50°C	2h	0,27
MeSO <sub>3</sub> H konz.	1	-	RT	48 h	0,36
MeSO <sub>3</sub> H 15 %	1	-	RT	48h	0,18
MeSO <sub>3</sub> H 15 %	1	-	RT	3h	0,02

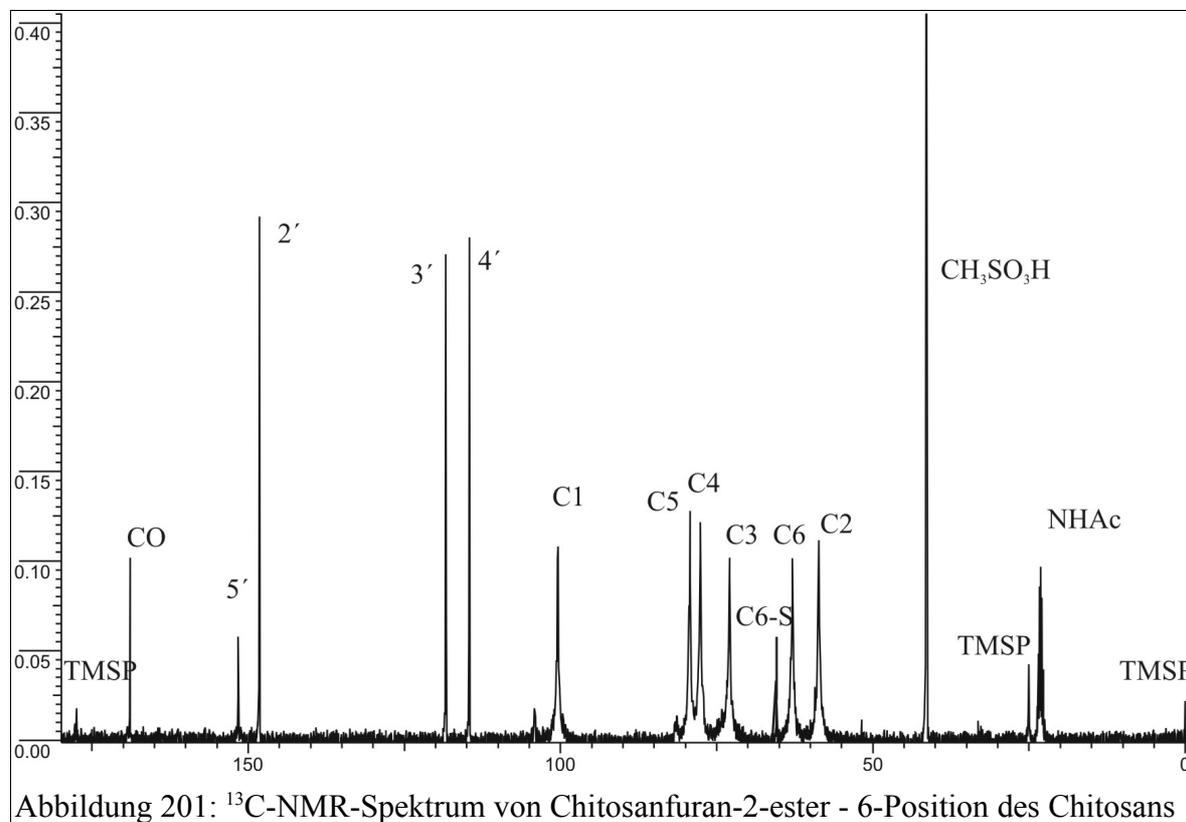
Tabelle 47: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter homogenen Reaktionsbedingungen.

Es entsteht bei allen homogenen Reaktionen fast ausschließlich der 2-Furanestern an der 6 Position des Chitosans. Die Variation der Konzentration der eingesetzten Methansulfonsäure hat hierauf anscheinend kaum einen Einfluss. Ein Vergleich der beiden ersten Reaktionen zeigt, eine starke Zunahme des DS von 0,11 auf 0,27 durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C. Hierbei kann trotz der wesentlich kürzeren Reaktionszeit und der geringeren Menge an Furancarbonsäurechlorid einen höherer DS-Wert erreicht werden. Die dritte Umsetzung in Tabelle 47 zeigt den höchsten Substitutionsgrad. Hierbei wurde konz. Methansulfonsäure verwendet, die im hohen Maße die azidative Spaltung des Chitosans bewirkt. Durch die damit verbundene Viskositätsverringern und höhere Kettenbeweglichkeit der Polymere wird der chemische Angriff der Reaktanten erleichtert. Die beiden letzten Umsetzungen zeigen, dass auf die Zugabe einer Base verzichtet werden kann. Eine lange Reaktionszeit erhöht hierbei den Umsetzungsgrad.

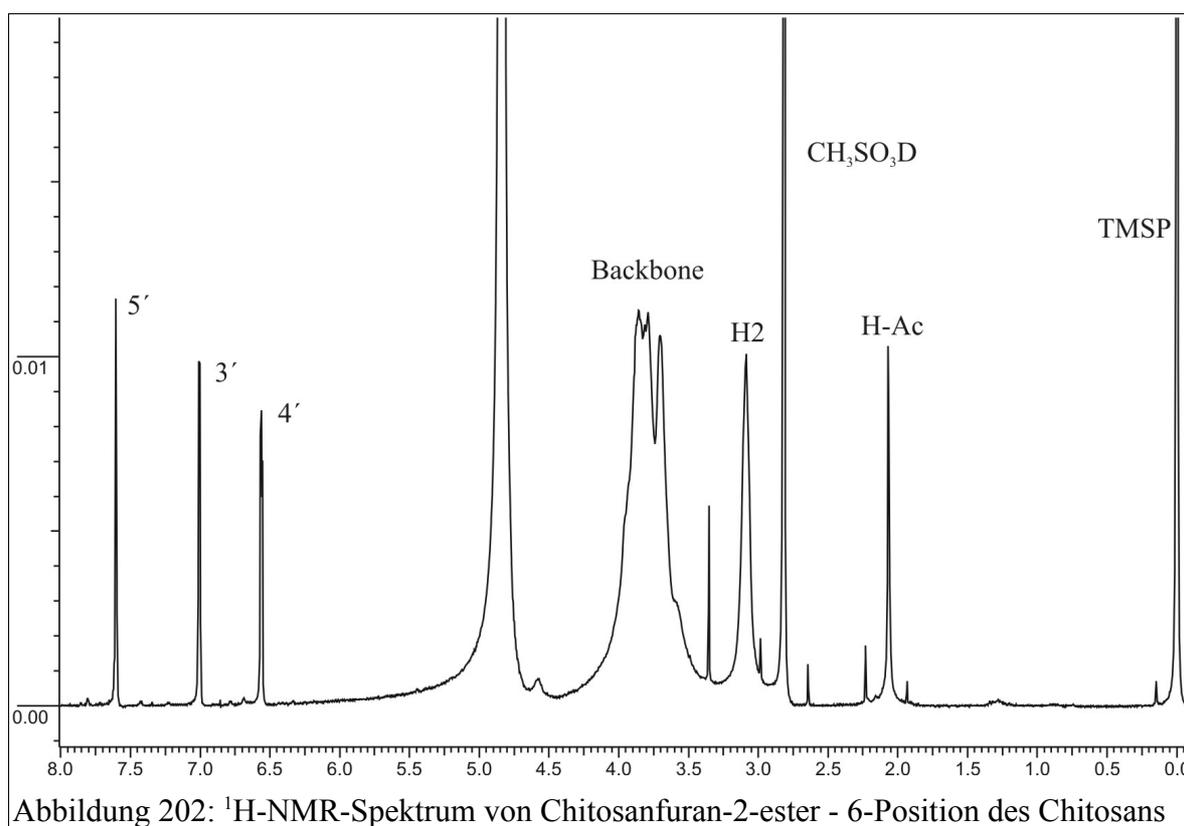
Durch die homogene Reaktionsführung kann nur wenig Polymer in Lösung gebracht werden, hierdurch können nur geringe Mengen Chitosan umgesetzt werden. Durch die aufwendige Aufarbeitung (Dialyse und Gefriertrocknung) ist dieses Verfahren sehr zeit- und natürlich kostenintensiv. Es lassen sich jedoch so wasserlösliche Derivate mit einem durchschnittlichen Substitutionsgrad von 0,02-0,37 herstellen. Außerdem bleibt durch diese Syntheseführung die Aminogruppe des Chitosans an der 2 Position unbeeinflusst. Hierdurch wird durch die Substitution des Chitosans die Ladungsdichte nicht verändert. Diese Chitosane eignen sich daher besonders gut für die Herstellung modifizierter Symplexmbranen, bei denen Polykationen mit einer möglichst hohen Ladungsdichte eingesetzt werden sollten.

**Analytik:**

Zum besseren Vergleich der NMR-Spektren siehe Abbildung 200.



$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{CD}_3\text{COOD}$ ):  $\delta = 0,00$  (TMSP); 23,14 (s, NHAc); 25,04 (TMSP); 41,43 ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{D}$ ); 58,73 (s, C2); 62,91 (s, C6); 65,47 (C6-S); 72,99 (s, C3); 77,64 (s, C4); 79,33 (s, C5); 100,47 (s, C1); 114,66 (s, 4'); 118,38 (s, 3'); 148,26 (s, 2'); 151,63 (s, 5'); 168,96 (s, C=O); 177,54 (TMSP).



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 0,00$  TMSP; 2,07 (s,  $\text{CH}_3$ -Acetyl); 2,82 (s,  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{D}$ ); 3,09 (s, H-2); 3,49-4,02 (m, Backbone); 4,59 (a, H1-Ac); 6,56 (s, 4'); 7,00 (s, 3'); 7,61 (s, 5').

### Herstellung von Chitosanimiden

5 g Chitosan wird in einen 500 ml Rundkolben gegeben und mit ca. 250 ml einer 1 % Essigsäure gelöst. Zu der hochviskosen Lösung wird das entsprechende Aldehyd des Diens oder Dienophils gegeben. Es bildet sich nach kurzer Zeit meist schon bei Raumtemperatur ein starkes Hydrogel aus. Dieses entstandene Hydrogel ist jedoch unlöslich in einer Reihe polarer und unpolarer Lösungsmittel und daher für die Herstellung von hydrophilen Membranen ungeeignet.

#### 7.1.2 Heterogene Umsetzung

Zur heterogen Umsetzung wird das Chitosan direkt in einem Lösungsmittlegemisch aus 50 % Methanol und 50 % einer 5 % wässrigen Essigsäurelösung suspendiert. Durch die Alkohlzugabe wird die Polarität des Lösungsmittlegemisches herabgesetzt, so dass sich das

Chitosan nicht lösen kann. Es kommt jedoch zu einer Aufquellung des Chitosans die eine chemische Umsetzung ermöglicht.

Anschließend wird zu der Lösung das entsprechende Carbonsäurechlorid des Diens oder Dienophils gegeben. Teilweise erfolgte eine Zugabe einer Base die um ca. 10 % höher ist als die zugegebene Stoffmenge des Diens oder des Dienophils. Die Lösung wird intensiv gerührt und teilweise erhitzt. Nach einer Reaktionszeit von 1-72 Stunden wird die Suspension unter Verwendung eines Büchnertrichter filtriert. Der erhaltene Feststoff wird dreimal mit einer 50 % Ethanollösung gewaschen. Das Filtrat wird verworfen. Das Produkt wird am Rotationsverdampfer bei ca. 40 °C unter stark verminderten Druck getrocknet.

Eine heterogene Umsetzung der Chitosan birgt aus Zeit- und Kostengründen viele Vorteile. Die Reaktion kann leicht und schnell aufgearbeitet werden und es kann im Vergleich zur homogenen Umsetzung viel Polymer im Lösungsmittel suspendiert werden. Es zeigt sich, dass auch mit einer heterogenen Prozessführung Chitosanfurane erhalten werden können. Es bilden sich hier wie auch schon bei der homogenen Umsetzung in Essigsäure beschrieben hauptsächlich das Chitosanfuran-2-amid. In den folgenden Tabellen sind die Variationen der Reaktionsbedingungen und der durchschnittliche Substituierungsgrad aufgeführt.

<i>Lösungsmittel</i>	<i>2-Furan-COCl (Äquivalente)</i>	<i>Base</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>DS</i>
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	3	Et <sub>3</sub> N	RT	48h	0,18
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	2	Et <sub>3</sub> N	RT	48h	0,16
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1	Et <sub>3</sub> N	RT	48h	0,12

*Tabelle 48: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter heterogenen Reaktionsbedingungen.*

In der Tabelle 48 wurde unter Variation der Furancarbonsäurechlorid (2-Furan-COCl) Anteile die Reaktion bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Es entstehen in Abhängigkeit der zugegebenen Mengen des Carbonsäurechlorides DS-Werte von 0,12 bis 0,18.

<i>Lösungsmittel</i>	<i>2-Furan-COCl (Äquivalente)</i>	<i>Base</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>DS</i>
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	5	Et <sub>3</sub> N	RT	24h	0,05

<i>Lösungsmittel</i>	<i>2-Furan-COCl (Äquivalente)</i>	<i>Base</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>DS</i>
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	2	Et <sub>3</sub> N	RT	24h	0,03
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/EtOH	2	Et <sub>3</sub> N	RT	24h	0,02

*Tabelle 49: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter heterogenen Reaktionsbedingungen.*

In Tabelle 49 wurde die Reaktion nur 24 Stunden betrieben. Es entstehen hierbei auch bei hoher Zugabe des Carbonsäurechlorides nur sehr geringe Substitutionsgrade von 0,02-0,05. Durch die Reaktionszeitverlängerung werden als bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen höhere Umsätze erreicht. Hierbei scheint die Diffusion der Reaktanten in das als Feststoff vorliegende Chitosan der wichtigste Faktor zu sein.

<i>Lösungsmittel</i>	<i>2-Furan-COCl (Äquivalente)</i>	<i>Base</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>DS</i>
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1,5 (gefriergetrocknet)	Et <sub>3</sub> N	RT	20h	0,31
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1 (gefriergetrocknet)	Et <sub>3</sub> N	RT	20h	0,21
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	0,5 (gefriergetrocknet)	Et <sub>3</sub> N	RT	20h	0,11
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1 (getrocknet)	Et <sub>3</sub> N	RT	20h	0,18

*Tabelle 50: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter heterogenen Reaktionsbedingungen.*

In der Tabelle 50 ist gefriergetrocknetes Chitosan umgesetzt worden. Es werden bei einer Reaktionszeit von ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur auch schon bei geringer Zugabe von dem Carbonsäurechlorid hohe DS-Werte (0,3 - 0,1) erhalten. Dies kann zwei Ursachen haben: zum einen wird bei der Gefriertrocknung die Oberfläche des Materials sehr stark vergrößert und zum anderen wird das Polymer getrocknet. Die letzte Probe aus der Tabelle 50 wurde durch thermische Erwärmung des Polymers getrocknet. Hierdurch wurde das Chitosan von einen Wassergehalt von ca. 10 % befreit ohne das die Oberfläche der Polymerflocken verändert wurde. Hierbei zeigt sich ein ähnlich hoher DS-Wert wie bei den gefriergetrockneten Proben. Das Trocknen des Polymeres führt somit hauptsächlich zur Erhöhung der Umsetzungsrate. Durch die vergrößerte Oberfläche der gefriergetrockneten Proben kann der Umsatz nur im untergeordneten Maße erhöht werden.

<i>Lösungsmittel</i>	<i>2-Furan-COCl (Äquivalente)</i>	<i>Base</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>DS</i>
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	5	Et <sub>3</sub> N	100°C	12h	0,16
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	5	Et <sub>3</sub> N	RT- 100°C	48h- 4h	0,23
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	0,5	Et <sub>3</sub> N	RT- 100°C	48h- 3h	0,03

*Tabelle 51: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter heterogenen Reaktionsbedingungen.*

Die Tabelle 51 zeigt, dass eine Temperaturerhöhung den DS-Wert erwartungsgemäß erhöht. Bei einem Vergleich der beiden ersten Reaktionsruten aus diesem Block zeigt sich auch hier die maßgebliche Diffusionskontrolle der heterogenen Reaktion. So wird bei einem 12 stündigen Erhitzen ein geringerer DS-Wert erhalten als bei einem kurzzeitigen Erhitzen mit anschließender langer Reaktionszeit bei Raumtemperatur.

<i>Lösungsmittel</i>	<i>2-Furan-COCl (Äquivalente)</i>	<i>Base</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>DS</i>
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1 (getrocknet)	Bu <sub>3</sub> N	40°C	3h	0,27
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1,5	Bu <sub>3</sub> N	RT	18h	0,10
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1	Bu <sub>3</sub> N	RT	18h	0,06
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	0,25	Bu <sub>3</sub> N	RT	72h	0,13
5 %Essig/H <sub>2</sub> O/MeOH	1	Bu <sub>3</sub> N	100°C	1,5h	0,03

*Tabelle 52: Durchgeführte Umsetzungen von Chitosan mit 2-Furancarbonsäurechlorid unter heterogenen Reaktionsbedingungen*

Bei Verwendung von Tributylamin als Base zeigt sich, dass bei allen Umsetzungen höhere Umsetzungsgrade erreicht werden können (Tabelle 52). Wie schon bei den anderen Umsetzungen führt ein Trocknen der Probe zu hohen DS-Werten und dies auch schon bei kurzer Reaktionszeit unter milden Reaktionsbedingungen. Die zweite bis vierte Reaktionsbedingung der Tabelle 52 zeigt, dass eine Verlängerung der Reaktionszeit auch bei geringer Zugabe des Carbonsäurechlorids den DS-Wert erhöht. Ein Grund hierfür ist die schon erwähnte Diffusionskontrolle der Reaktion. Die letzte Reaktionsvariante zeigt das ein kurzzeitiges Erhitzen der Reaktionslösung nur zu einer geringen Substitution führt.

Durch die heterogene Prozessführung, kann auf einfachem und kostengünstigen Weg Chitosanfuran-2-amide erhalten werden. Dieses Verfahren könnte auch im Industriellen Maßstab eingesetzt werden, da viel Polymer im Verhältnis zum Lösungsmittel eingesetzt werden kann. Des weiteren besteht die Möglichkeit Chitosanmembranen mit diesem Verfahren zu Modifizieren. Ein Problem könnte hierbei die Diffusion der Reaktanten in die Membran darstellen, so dass möglicherweise nach dem Herstellungsprozess Nebenprodukte oder nicht umgesetzte Reaktanden in der Polymermatrix eingeschlossen werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit die Oberfläche der Membranen z.B. im einem Coatingverfahren mit den hier hergestellten Verbindungen zu beschichten.

Durch die Diffusionskontrolle der Reaktion führen insbesondere längere Reaktionszeiten (auch bei niedriger Reaktionstemperatur) zu einem höheren Wert für den DS-Wert. Ein Trocknen des Chitosan vor der Reaktion führt zu wesentlich höheren Umsätzen. Die bei den Umsetzungen erhaltenen niedrigen Substitutionsgrade sind für die geplante Anwendung ausreichend. Es entstehen so modifizierte Chitosane, die sich im wässrigen Systemen lösen und daher für die Herstellung oder Beschichtung von Membranen geeignet sind. Des weiteren könnte bei der geplanten kovalenten Kopplung von Wirkstoffen an diese Verbindungen auch schon bei einem geringen Substitutionsgrad von ca. 1 % eine sehr große Menge Wundflüssigkeit von Störfaktoren befreit werden, da diese nur in sehr geringer Konzentration in der Wundflüssigkeit vorliegen. Bei einer Komplexierung von z.B. dem TNF- $\alpha$  (siehe Abbildung 29) könnte bei einer mit 1 % Wirkstoffen versehene Membran mit einer Fläche von  $1 \text{ dm}^2 > 10 \text{ Liter}$  Wundflüssigkeit von diesem Störfaktor befreit werden (unter der Annahme einer vollständigen Adsorption des Störfaktors an die Membran).

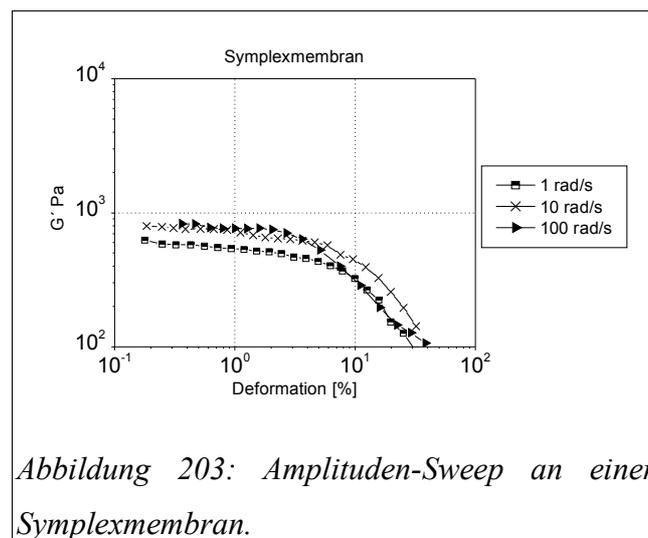
## **7.2 Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter mittels Rheomechanischen Untersuchungen**

Für die Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter wurden rheomechanische Oszillationsmessungen im linear viskoelastischen Bereich durchgeführt. Durch den hierbei direkt messbaren Speichermodul ( $G'$ ) kann mit Hilfe von einfachen Gleichungen die Netzwerkstrukturparameter ermittelt werden (näheres siehe Kapitel 2.2.2).

Für die korrekte Bestimmung der oszillatorischen Materialfunktionen muss sichergestellt sein, dass die gemessenen Materialfunktionen nur von der angelegten Schwingungsfrequenz

abhängen und nicht durch die Deformationsamplitude beeinflusst werden. Durch schrittweise Erhöhung der Amplitude (Deformation), bei konstanter Frequenz durchlaufen die Materialfunktionen ( $G'$  und  $G''$ ) zunächst einen Plateaubereich, in dem das beobachtete Verhalten unabhängig von der angelegten Deformation ist. In diesem sogenannten linear viskoelastischen Bereich wird die innere Struktur der Materialien nicht durch anliegende Kräfte verändert wodurch sich die Substanz in ihrem Gleichgewichtszustand untersuchen lässt werden. Wird die Deformation weiter gesteigert und überschreitet eine kritische Deformation, so fallen die Materialfunktionen durch Bruch des Netzwerkes ab.

Es wurde für alle untersuchten Membranen ein Amplituden-Sweep bei einer Frequenz von 1, 10 und 100 rad/s durchgeführt, um die maximal mögliche frequenzunabhängige Deformierbarkeit der Probe zu bestimmen.



In Abbildung 203 ist exemplarisch für die untersuchten Membranen ein Amplituden-Sweep, der an Symplexmembranen durchgeführt wurde, dargestellt. So zeigt sich, dass eine Deformation von 3 % ausreicht, um bei der geringsten Schwingungsfrequenz (1 rad/s) ein Abfall der Materialfunktionen zu erhalten. Um im linear viskoelastischen Bereich die Membran vermessen zu können, wurde für Chitosanmembranen und Bakteriencellulose-Membranen eine Deformierbarkeit von 0,5-0,9 % ermittelt. Symplexmembranen können wie oben gezeigt bis zu 2 % deformiert werden. Sie wurden jedoch zumeist bei einer Deformation um 1 % vermessen.

Die Oszillationsmessungen können mit verschiedenen Geometrien bestimmt werden. Hierzu

bietet sich eine Gouette- und eine Platte-Platte- Geometrie an. Substanzen, die z.B. durch einen Vernetzer aus einer Polymerlösung in ein Polymergel überführt werden können einfach mit einer Gouette-Geometrie bestimmt werden. Aufgrund der großen Oberfläche der Geometrie im Verhältnis zu dem Gel können leicht Oszilationsmessungen durchgeführt werden. Für die Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter der Chitosanhydrogele wurde mit einer Gouette-Geometrie mit einer stark strukturierten Oberflächenstruktur an dem schubspannungsgesteuerten Rheometer UDS200 der Firma Physica Messtechnik GmbH gearbeitet.

Die hergestellten Membranen (Symplexmembranen, Chitosanfolien, und Bakteriencellulosemembranen) wurden mit einer Platte-Platte- Geometrie auf dem schergeschwindigkeitsgesteuerten Rheometer ARES der Firma Rheometric Scientific vermessen.

Der Spaltabstand in einer Platte-Platte- Geometrie kann aufgrund unterschiedlicher Membrandicken nicht auf einen konstanten Wert eingestellt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, die bewegliche Platte schrittweise zusammenzuführen um einen ausreichenden Kontakt der Membranen zwischen der Geometrie zu ermöglichen. Durch einen axialen Kraftaufnehmer ist es außerdem möglich, die Geometrie mit einer definierten Kraft auf die Probe zu pressen. Hierbei besteht jedoch die Gefahr, bei einer zu hohen Krafteinwirkung auf die Membran, die Netzwerkstruktur zu deformieren. Hierdurch werden tendenziell höhere Werte für den Speichermodul ermittelt. Eine zu geringe Krafteinwirkung auf die Probe kann jedoch zu einem unzureichenden Kontakt der Membran mit der Geometrie führen. Dies wiederum führt zu zugeringen Werten für der Speichermodul.

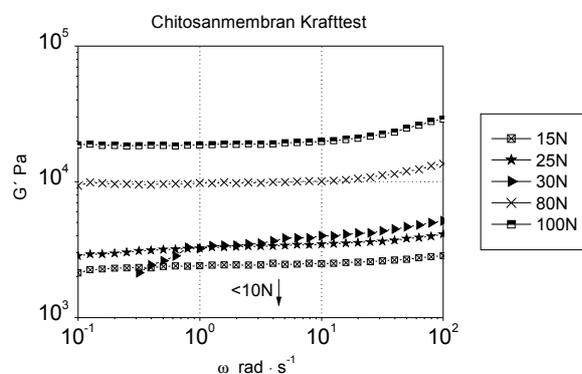


Abbildung 204: Bestimmung des optimalen Anpressdrucks bei Oszilationsmessungen.

---

In Abbildung 204 ist zur Bestimmung der optimalen axial wirkenden Kraft, bzw. des Anpressdrucks auf die Probe, eine Anpressdruck Messung an einer Chitosanmembran durchgeführt worden. Die Messwerte steigen erwartungsgemäß mit zunehmendem Anpressdruck der Geometrie an. Hierbei zeigt eine axiale Kraft von weniger als 10 N, die auf die Membran wirkt, wesentlich geringere Werte für  $G'$  als die hier abgebildeten. Dies ist auf einen nicht ausreichenden Kontakt der Geometrie mit der Probe zurückzuführen. Bei einer Kraft von 25-30 N zeigt der Speichermodul kaum noch eine Beeinflussung von der angelegten Kraft. Hier liegt für diese Membran die optimale Kraft, die auf die Probe wirken muss, um einen ausreichenden Kontakt zwischen der Membran und der Geometrie zu ermöglichen. Diese relativ geringe Krafteinwirkung führt nur zu einer geringen Kompression des Netzwerkes. Bei höheren axialen Kräften kommt es durch die zunehmende Kompression des Netzwerkes zu einem starken Anstieg der Materialfunktionen. Es wurde für alle verwendeten Membranen ein optimaler Anpressdruck ermittelt, der bei allen vergleichenden Messungen eines Membrantyps auf diesen Wert eingestellt wurde bzw. konstant gehalten wurde. Der Anpressdruck ergibt sich aus der verwendeten Geometriefläche und der axial wirkenden Kraft ( $p = F/A$ ). Bei der verwendeten Platte-Platte-Geometrie mit einem Durchmesser von 25 mm ergibt sich für z.B.  $F = 25 \text{ N}$  einen Anpressdruck von ca.  $p = 500 \text{ hPa}$ . Die durch unterschiedliche Membrandicken bedingten unterschiedlichen Spaltabstände der Geometrie, aufgrund unterschiedlich dicker Membranen, wurden bei jeder Messung genau ermittelt ( $\pm 1 \text{ }\mu\text{m}$ ) und bei der Berechnung der Speichermolule berücksichtigt.

### 7.3 Bestimmung der Permeabilität von Membranen

Es wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Permeabilität der Membranen herangezogen. Die Wasserdampfpermeation erlaubt die Bestimmung der Durchlässigkeit der Membranen gegenüber gasförmigen Wasser. Die Gaspermeation von z.B. Sauerstoff erlaubt die Bestimmung der Gasdurchlässigkeit von Membranen. Diese ist bei der Wundheilung von entscheidender Bedeutung da sich bei zu geringer Sauerstoffdurchlässigkeit in der Wundflüssigkeit unter der Membran ein anaerobes Milieu ausbildet, durch dass die Bildung von pathogenen Keimen in der Wunde angeregt wird. Dies gilt es durch eine ausreichende Sauerstoffdurchlässigkeit der Membran zu verhindern.

### 7.3.1 Wasserdampfpermeation

Die Wasserdampfpermeation der Membranen wurde wie folgt bestimmt:

In ein 25ml Braunglasfläschchen wird 5 g  $\text{CaCl}_2$  (wasserfrei) genau eingewogen. Auf die Öffnung des Braunglasfläschchens wird eine Membran mit Hilfe eines Sekundenklebers oder eines Zweikomponentenklebers fixiert. Hierbei ist unbedingt auf einen vollständigen Verschluss des Braunglasfläschchens durch die Membran zu achten.

In ein zweites Braunglasfläschchen werden Glasperlen gegeben und die Öffnung ebenfalls wie zuvor beschrieben verschlossen. Diese Probe dient als Blindprobe und wird von den eigentlichen Messwerten abgezogen um eine Aufnahme von Wasserdampf in die Membran auszugleichen (Abbildung 205).



Abbildung 205: Bestimmung der Wasserdampfpermeation.

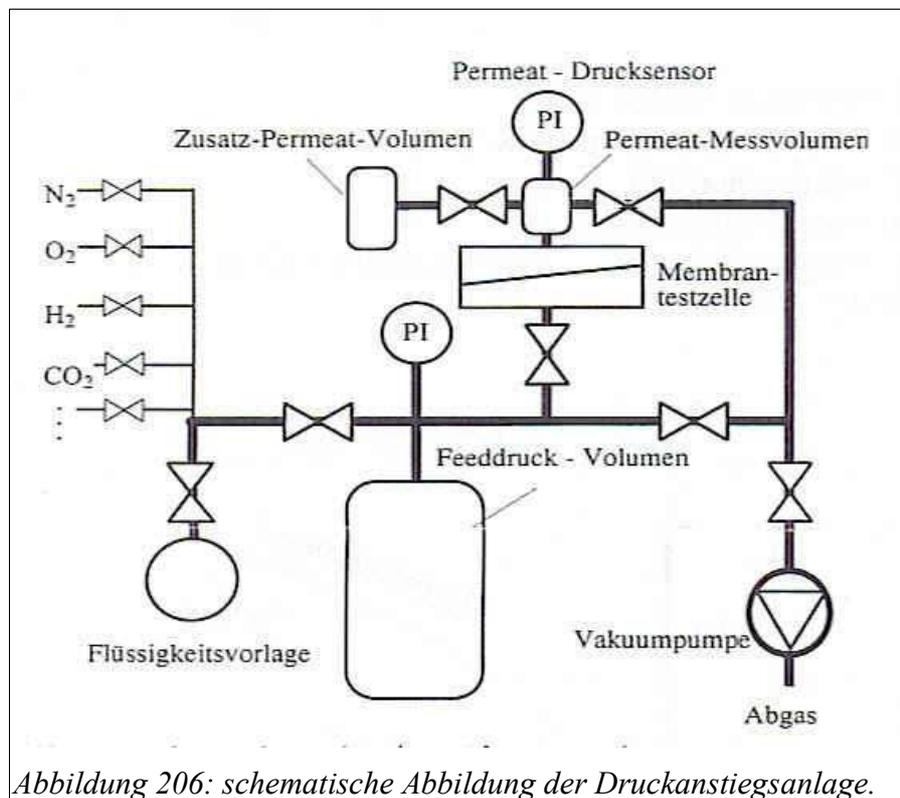
Diese so verschlossenen Braunglasfläschchen werden in einen Exikkator gegeben, der eine gesättigte  $\text{NaCl}$  Lösung enthält. Die rel. Luftfeuchte innerhalb des Exsikkator wird so auf 75 % ( $\pm 1$  %) eingestellt.

Jeder Messpunkt der Wasserdampfaufnahme wird über Mittelwertbildung einer 5 fach Bestimmung für eine Membran mit  $\text{CaCl}_2$  (wasserfrei) ermittelt. Der Blindwert wird über eine Mittelwertbildung einer 2 fach Bestimmung ermittelt und von dem Mittelwert der Wasserdampfaufnahme abgezogen. Die Wasserdampfdurchlässigkeit wird dann täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen über Auswiegen der Proben mit Hilfe einer Analysenwaage

( $\pm 0,1$  mg) ermittelt.

### 7.3.2 Gaspermeation (Wasserstoff; Sauerstoff; Stickstoff; Kohlendioxid)

Zur Charakterisierung von Membranen mit Gasen und Dämpfen eignet sich die Druckanstiegsmessung. Diese basiert auf einer einfachen gasartunabhängigen Druckmessung. Mit diesem Messprinzip lassen sich die Permeabilitäten einer Membran von unterschiedlichen Gasen und Dämpfen bestimmen. Es wurde eine automatische Druckanstiegsanlage des GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH verwendet. Die nachfolgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten automatischen Druckanstiegsanlage.



Die Einheit der Permeabilität ergibt sich aus der Stoffmenge ( $m_N^3$ ) die pro Zeiteinheit (h) bei einer bestimmten Druckdifferenz (bar) durch eine definierte Membran pro Fläche ( $m^2$ ) hindurchtritt. Die Permeabilität (L) wird wie folgt berechnet:

$$L = \frac{V \cdot 22,41 \cdot 3600}{R \cdot T \cdot A \cdot t} \cdot \ln\left(\frac{p_F - p_o}{p_F - p_{P(t)}}\right)$$

*Gleichung 55: Bestimmung der Permeabilität*

Hierbei gilt:

V = Permeatvolumen [m<sup>3</sup>]; R = Gaskonstante 0,008314 [m<sup>3</sup> · bar · kmol<sup>-1</sup> · K<sup>-1</sup>]; T = Temperatur [K]; A = Membranfläche [m<sup>2</sup>]; t = gemessenen Zeit [s]; 3600 = Umrechnungsfaktor [s/h]; 22,41 = molares Volumen [m<sub>N</sub><sup>3</sup>/kmol].

Als Einheit der Permeabilität L resultiert bei Verwendung der oben angegebenen Beziehungen [m<sub>N</sub><sup>3</sup>/ m<sup>2</sup>·h·bar].

#### 7.4 Bestimmung der Zugbelastung

Die Zugbelastung der Membranen wurde mit dem Gerät Zwick/Roell Z010 der Technischen Universität Hamburg Harburg bestimmt. Hierzu wurde ein Probenkörper mit einer Gesamtlänge von 50 mm und einer Breite von 4,1 mm aus der Membran ausgestanzt. Der so erhaltenen Probenkörper wurde zwischen zwei Schraubzwingen eingespannt. Die Zugbelastung wurde bei einem Vortrieb von 0,1 mm - 1 mm pro Sekunde bestimmt. Die Auswertung erfolgt über einen angeschlossenen Computer, der die Daten des Kraftaufnehmers und der Deformation speichert.

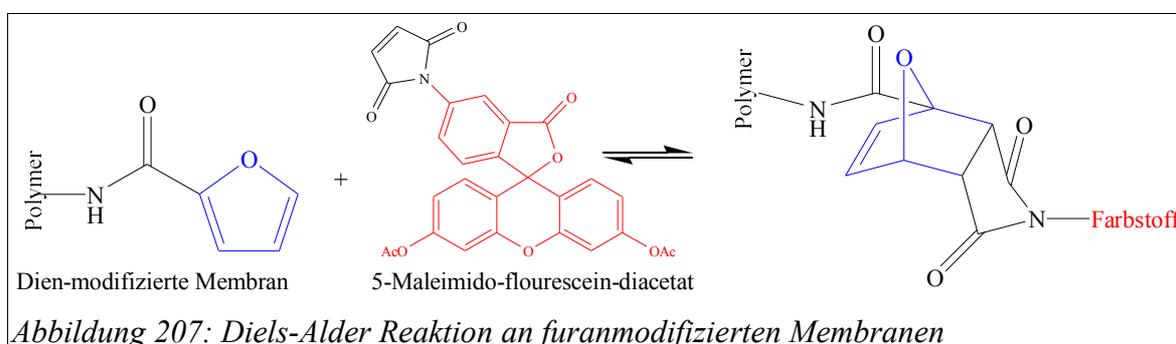
#### 7.5 Diels-Alder Reaktionen an Membranen

Es sollte zusätzlich untersucht werden, ob mit Hilfe einer Diels-Alder Reaktion an der Membranoberfläche Substanzen kovalent gebunden werden können. Diese Reaktion soll idealerweise heterogen, mit einer Membran (Chitosanmembran, Sympexmembran und Bakteriencellulose-Membran), die zuvor mit geeignete Dienen oder Dienophilen modifiziert wurde, erfolgen. Zur „reibunglosen“ Herstellung der aktiven Membranen in größerem Maßstab sollten kontinuierliche Tauchbadverfahren eingesetzt werden.

Durch Anbringen von bestimmten zuckerhaltigen bzw. peptidischen Strukturen an die Membran-Oberfläche der Membran können gezielt bestimmte Lektine oder Integrine angesprochen werden. Die Folge wäre eine selektive Adhäsion bestimmter, unerwünschter

Substanzen an der Membranoberfläche und die damit verbundene gezielte Entfernung aus dem Wundmilieu. Für eine Wechselwirkung mit Lektinen sollen dies zuckerhaltige Verbindungen sein [203]. Zur Interaktion mit Integrinen hingegen sind peptidische Strukturen notwendig [204] [205]. Inhibitoren der Matrix-Metall-Proteinasen (MMPs) sind hinlänglich bekannt [206].

Um aufzuzeigen, dass eine solche heterogene Umsetzung möglich ist, wurden Membranen, die mit einem Furanderivat als Dien verknüpft wurden, mit einem fluoreszierenden Maleiminderivat als Modellsubstanz für eine pharmazeutische Substanz umgesetzt.



Hierzu wurde 5 mg 5-Maleimido-fluorescein-diacetat in 25 ml eines Puffersystem aus einem Teil einer 0,1 mol/l Natriumhydrogenphosphat und zwei Teilen einer 0,1 mol/l Natriumdihydrogenphosphat Lösung (pH = 6.97) suspendiert. Aufgrund zu geringer Löslichkeit wurde dieser Suspension 10 % Dimethylsulfoxid zur Verringerung der Polarität zugesetzt. Es entsteht nach 2 Stunden Rühren bei RT eine gelb-grün fluoreszierende Lösung, die ein Absorptionsmaximum bei 490 nm aufweist.

In Abbildung 208 ist die Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen in einer 1/15 verdünnten Lösung dargestellt.

[203] Lingwood C.A., Oligosaccharide receptors for bacteria: a view to a kill, *Current Opinion Chem. Biol.*, Vol. 2, (1998), S. 695-700

[204] Davids J.W., Selektive Inhibierung von Interleukin-1 durch Antisense Peptide, *Angew., Chem.*, Vol. 109, (1997), S. 999-1004

[205] van Well R.M. et al, Solid Phase Synthesis of Cyclic RGD-Furanoid Sugar Amino Acid Peptides as Integrin Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, Vol. 13, (2003), S. 331-334

[206] Grams F. et al., Pyrimidine-2,4,6-Triones: A New Effective and Selective Class of Matrix Metalloproteinase Inhibitors, *Biol Chem*, Vol. 382 (2001), S. 1277

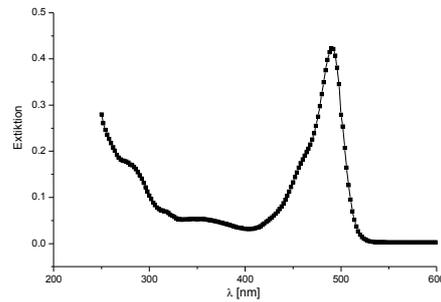


Abbildung 208: Extinktionsmaximum von 5-Maleimido-fluorescein-diacetat bei pH 7.

Die Herren Bouguer, Lambert und Beer entdeckten photometrische Gesetzmäßigkeiten, die als Lambert-Beersches Gesetz bekannt wurden.

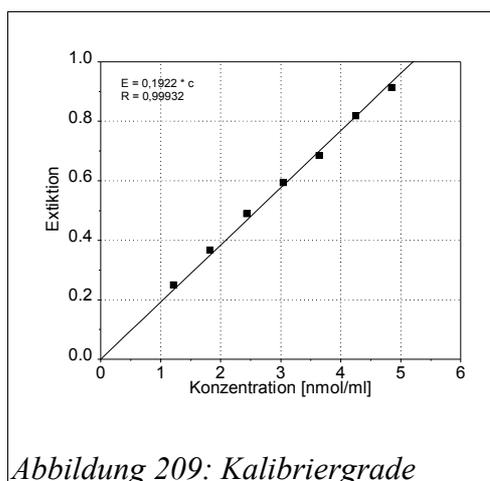
Bouguer und Lambert fanden heraus, dass die relative Intensitätsabnahme  $I$  proportional der durchstrahlten Schichtdicke  $d$  ist. Beer stellte fest, dass die relative Intensitätsabnahme proportional der Konzentration  $c$  der gelösten absorbierenden Substanz ist.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad E = -\log \frac{I}{I_0}$$

Hierbei ist  $E$  die Extinktion die sich aus der abgeschwächten Lichtintensität ( $I$ ) und dem eingestahlten Licht ( $I_0$ ) ergibt. Der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Extinktion ( $E$ ) und der Konzentration ( $c$ ) des zu untersuchenden Stoffes bei gegebener Schichtdicke ( $d$ ).

So kann das Lambert-Beersche-Gesetz zur Konzentrationsbestimmung einer Substanz genutzt werden.

Durch eine Verdünnungsreihe der 5-Maleimido-fluorescein-diacetat Lösung konnte am Adsorptions-maximum (490 nm) in einer Küvette mit der Schichtdicke von 1 cm ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Extinktion ermittelt werden (siehe Abbildung 209).



Der molare Extinktionskoeffizient in diesem Lösungsmittelsystem weist einen Wert von  $1,922 \cdot 10^{10}$  l/mol cm auf. Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass eine pH-Wert Änderung die Adsorptionseigenschaften des Farbstoffes stark verändern kann. Das verwendete Puffersystem kann jedoch auch größere Mengen an Säuren oder Basen abfangen, ohne dass der pH-Wert merklich beeinflusst wird.

In 5 ml dieser Lösung (enthält  $1,8 \mu\text{mol}$  Farbstoff) werden jeweils 20 mg einer mit Furanen derivatisierte Chitosan oder Symplexmembra gegeben. Durch eine Diels-Alder Reaktion wird das 5-Maleimido-fluorescein-diacetat an die Membranen kovalent gebunden und wird so aus der Reaktionslösung entfernt. Die Abnahme der Konzentration in der Reaktionslösung kann mit Hilfe eines UV-VIS-Photometers bestimmt werden. Als UV/VIS-Gerät kam das Jasco V530 UV/VIS der Firma Dewert Labor-Technik mit der Software „Spectramanager for Windows“ in der Version 1.3 zum Einsatz. Durch die parallele Untersuchung von nicht weiter derivatisierten Membranen können mögliche Adsorptionsprozesse des Farbstoffes auf der Membran, ohne dass eine Diels-Alder-Reaktion stattfindet, erfasst werden.

Die Abnahme der Extinktion am Adsorptionsmaximum wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden bei einer Reaktionstemperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  bestimmt.

## 7.6 Membranmodifizierung

Um die hier hergestellten Membranen mit Dienen oder Dienophilen zu versehen, bieten sich verschiedene Verfahren an. Bei der Herstellung von Symplex- oder Chitosanmembranen kann zum einen ein vorher derivatisiertes Polymer eingesetzt werden oder die Membran wird

anschließend mit Dienen oder Dienophilen umgesetzt. Des Weiteren kann z.B. bei der Chitosanmembran eine mehrschichtige Membran hergestellt werden. Hierbei wird ein dünner Film auf die Membran z.B. durch Aufsprühen des derivatisierten Polymers aufgebracht. Hierdurch befinden sich die Polymere mit den Dienen oder Dienophilen nur an der Oberfläche die gegebenenfalls auch mit ihren Untergrund z.B. durch Dialdehyde vernetzt werden können. Da in einem anschließenden Verfahren durch eine Diels-Alder-Reaktion z.B. Wirkstoffe an die Auflage in einer Oberflächenreaktion angebracht werden sollen, brauchen sich die Koplungskomponenten auch nur auf der Oberfläche befinden. Es muss bei diesem Verfahren nur eine sehr geringe Menge des hochpreisigen Chitosanderivats eingesetzt werden. Die Membraneigenschaften der Chitosanmembranen bleiben erhalten. Außerdem kann z.B. die Chitosanmembran in einem anschließenden Verfahren heterogen umgesetzt werden. Die Aufreinigung der Membranen erweist sich jedoch hierbei als sehr aufwendig, so dass die anderen Verfahren vorzuziehen sind.

Im Falle der Bakteriencellulose erweist sich eine heterogene Derivatisierung der Membranen als schwierig, da bei der notwendigen Aktivierung der Cellulose in Natronlauge die Membranstruktur durch eine Abnahme der Kristallinität der Cellulose kollabiert. Hierdurch gehen die positiven Membraneigenschaften verloren. Deshalb wurde derivatisierte Cellulose mikrobiologisch erzeugt. Es wurde hierzu regiospezifisch an der 3 Position der Glucose Diene oder Dienophile eingeführt und diese modifizierte Glucose zur Herstellung des Nährmediums verwendet. (Näheres siehe Kapitel Bakteriencellulose - Glucose).

## 7.7 Ultraschalldegration

Die Ultraschalldegradation erfolgte mit einem Sonifer W-450 der Firma Branson Schallkraft GmbH (Heusenstamm, Deutschland) mit einem  $\frac{3}{4}$ -Zoll Titanresonator, der mit einer Frequenz von 20 kHz arbeitet. Für die Degradation wurden je 200 g einer 0,4 gew.-% igen Probenlösung in ein 400 ml hochwandiges Becherglas eingewogen. Die Titanspitze wurde 1 cm tief in die Probelösung eingetaucht. Das Becherglas wurde in ein Ethanol-Kühlbad Haake K F 4 (Haake, Berlin, Deutschland) mit einer Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestellt, der Abbau erfolgte bei der Temperatur der Probelösung von  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Abbau wurde ca. 30-45 Minuten durchgeführt. Der Titanantrieb wurde mit einer Zentrifuge des Typs Z-383 der Firma Hermle (Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland) innerhalb von 30 Minuten bei 12.000 U/min abgetrennt. Anschließend wurde die Lösung eingefroren und an einer Lyophilie BETA 1-16

---

der Firma Christ (Osterode, Deutschland) gefriergetrocknet.

## 7.8 Trockengehaltsbestimmungen

Zur Bestimmung des Trockengehalts wurden je ca. 1 g der entsprechenden Probensubstanz in ein weithalsiges Gläschen eingewogen und im Trockenschrank bei 110 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Vor dem Auswiegen wurden die Proben je eine Stunde zum Abkühlen in den Exsikkator gestellt um ein einkondensieren von Wasserdampf in die Probe zu verhindern.

## 7.9 Viskosimetrie

Die viskosimetrischen Messungen wurden mit einem Mikrokapillarviskosimeter Ic bzw. II nach Ubbelohde der Firma Schott-Geräte (Hofheim, Deutschland) in einem Wasserbad des Typ D 40.S Nr. 60208 der Firma Lauda (Königshofen, Deutschland) durchgeführt. Zur Bestimmung der Durchflusszeiten kam im Wasserbad ein Gestell mit integrierter Lichtschranke des Typs S 3 Nr. G03028 der Firma Lauda (Königshofen, Deutschland) zum Einsatz, das mit einem digitalen Zählwerk vom Typ Viscoboy 2 (VB/2 Nr. 607003) verbunden war. Die Messungen erfolgten soweit nicht anders angegeben bei 25,0°C, wobei zur Temperierung ein externer Thermostat des Typs 002-4278 K 20 von der Firma Haake (Karlsruhe, Deutschland), mit der Steuereinheit DC1 Typ 002-9917 eingesetzt wurde.

## 7.10 Lichtstreu-Untersuchung mit (GPC - FFF/MALLS/DRI)

### Laufmittelzubereitung:

Über eine Aktivkohle- und Ionenaustauscher-Säulen (Adsorber, Universal und Research, Novodirect, Kehl/Rh.) gereinigtes, deionisiertes Wasser wurde mit 0,1 mol/l Natriumnitrat versetzt. Dieser Lösung wurde 200 ppm (3 mmol) Natriumazid zum Schutz vor bakteriellem Befall zugefügt. Das Natriumnitrat (reinst) und das Natriumazid wurden von der Firma Merck (Merck eurolab GmbH, Darmstadt) bezogen. Das Lösungsmittel wurde über einen Celluloseacetat-Filter (Sartorius, Göttingen) der Porengröße 0,2 µm filtriert.

**Größenausschlußchromatographie:**

Das Laufmittel wurde mittels eines Degasers ERC 3315a (ERC Inc., Alteglofsheim) entgast und von einer HPLC-Pumpe Gynkotek 300C (Gynkotek, Germering) gefördert.

Darüber hinaus wurde ein Pulsationsdämpfer von Techlab verwendet und das Lösungsmittel über einen Inline-Filter der Porengröße 0,02 µm (Whatman International Ltd., Maidstone, England) filtriert. Die Proben wurden über den Autosampler HP Series 1100 (Hewlett Packard) injiziert. Direkt vor den Säulen befindet sich ein weiterer Filter mit der Porengröße 0,8 µm (Polycarbonatfilter, Nucleopore, Corning Costar, Bodenheim).

Die Trennung erfolgte über vier TSK-PW<sub>XL</sub> -Säulen (30, 40, 50, 60) der Firma (TosoHaas, Stuttgart), die mit abnehmenden Porendurchmesser hintereinandergeschaltet wurden. Zum Schutz der Säulen wurde eine Vorsäule des gleichen Materials vorgeschaltet. Das Eluat wurde anschließend inline mittels Lichtstreuung und Differential Refraktometrie untersucht.

***Feld-Fluss-Fraktionierung:***

Das Elutionsmittel wurde mit einer HPLC Pumpe des Typs ConstaMetric 3200 (TSP, Egelsbach, Deutschland) gefördert. Unmittelbar vor der Pumpe war ein Degaser des Typs Knauer 3-Kanal K-5005 (Knauer, Berlin, Deutschland) geschaltet, hinter der Pumpe befanden sich zwei Filter – ein Anodis- Filter der Porengröße 0,02 µm und eine Einmalfilter Anopore ebenfalls der Porengröße 0,02 µm (beide Whatmann International Ltd., Maidstone, Großbritannien). Es wurde ein Pulsationsdämpfer (Techlab, Erkerode, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe eine Injektionsventils mit Injektionsschleife bekannten Volumens wurde die Probenlösung injiziert. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Steuerung der Flußpumpe und der Ventile erfolgte mit dem Programm AFFF-e und der zugehörigen Software (ConSensus, Ober-Hilbersheim, Deutschland).

Die Fraktionierung erfolgte in einem Kanal der Firma ConSensus (ConSensus, Ober-Hilbersheim, Deutschland). Hierbei handelt es sich um einen Edelstahlkanal mit Plexiglasdeckel. Es wurde ein Abstandshalter (Spacer) der Dicke 190 µm eingesetzt. Der darin ausgeschnittenen, trapezoide Kanal hatte die Abmessungen: Länge = 28,6 cm, Breite = 2,12 cm am Kanaleinlaß und Breite = 0,47 cm am Kanalauslaß. Die Länge der zugeschnittenen Enden am Kanaleinlaß betrug 2,04 cm und am Kanalauslaß 0,54 cm. Daraus ergibt sich einen Fläche A von 36,33 cm<sup>2</sup> an der Membran auf der Kanalrückseite und eine ausgeschnittene Fläche am Kanaleinlaß von 2,25 cm<sup>2</sup>. Als Membran wurde eine regenerierte

---

Cellulose des Typs YM-10 (Amicon, Millipore Incorp., Bedford, USA) verwendet.

**Lichtstreu-photometer:**

Zur Streulichtmessung wurde ein DAWN-F (GPC) bzw. ein DAWN-EOS Lichtstreu-photometer (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, USA) verwendet, dessen Lichtquelle ein He-Ne-Laser ( $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$ ) ist. Das Streulicht wurde simultan von fünfzehn Fotodioden im Winkelbereich von  $26,56^\circ$  bis  $144,46^\circ$  aufgenommen. Die Durchflusszelle besteht aus hochbrechendem Glas (K5,  $n_g = 1,52064$ ). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Shodex RI SE-71 (Showa Denko, Tokyo, Japan) Differenzialrefraktometer, welches zuvor mit einer Konzentrationsreihe von Natriumchloridlösung kalibriert wurde. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte auf einem Standard PC mit dem Programm ASTRA 2.11b und die Auswertung mit der Version ASTRA for Windows 4.73.04 (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, USA).

**Differentialrefraktometer:**

Das Brechungsindexinkrement wurde auf dem Interferometer Optilab DSP Interferometric Refraktometer (Wyatt Technology Deutschland) mit einer P2L-Messzelle und der Software DnDc 5.2 (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, USA) bestimmt.

**7.11 NMR-Spektroskopie**

Zur Aufnahme der Spektren wurde ein Bruker Avance 400 (Rheinstetten, Deutschland) eingesetzt, welches mit einem 10 mm SEX  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ - Dualprobenkopf ausgestattet ist. Die IGATED-Spektren wurden mit einer Messfrequenz von 100 Mhz und einer Entkopplerfrequenz von 400 Mhz aufgenommen. Die Pulslänge betrug  $9 \mu\text{s}$  und das Relaxationsdelay 5-10 s. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software ACD Lab Specview (Bremen, Deutschland).

## 8 Anhang

### 8.1 Sicherheitshinweise

Verbindung	Gef. Symbol	R-Sätze	S-Sätze	Entsorgung
1-Chor-2,3-epoxypropan	T	45-10-E23/24/25-34-43	53-45	5
5-Maleimido-fluorescein-diacetat	-	-	-	4
Acrylsäurechlorid	F,C	11-35-37	7/9-16-26-36/37/39-45-51	5
Bariumhydroxid	C	20/22-34	26-36/37/39-45	3
Chitosan	-	-	-	-
Diacetonglucose	-	-	-	4
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37	5
Essigsäure	C	10-35	23.2-36-36/37/39-45	1
Ethanol	F	11	7-16	4
Furan-2-carbonsäurechlorid	C	34-37	26-36/37/39-45	5
Furfural	T	21-23/25-36/37-40	26-36/37/39-45	4
Glutaraldehyd	T,N	22/23-34-42/43-50	26-36/37/39-45-61	4
Glycerin	-	-	-	4
Glyoxal	Xn	20-36/38-43-68	36/37	4
Heptan	F,Xn,N	11-38-50/53-65-67	9-16-29-33-60-61-62	4
Methanol	F,T	R 11-23/24/25-39	7-16-36/37-45	4
Methansulfonsäure	C	34	26-36/37/39-45	1
Michsäure	Xi	38-41	26-39	1
N,N-Dimethylacetamid	T	R61-E20/21	53-45	4
NaN <sub>3</sub>	T <sup>+</sup> , N	28-32-50/53	28.1-45-60-61	2
NaNO <sub>3</sub>	O, Xn	8-22-36	22-24-41	2
Natriumhydrogencarbonat	Xi	36/37/38	8-22-24/25	3

Verbindung	Gef. Symbol	R-Sätze	S-Sätze	Entsorgung
Natriumhydroxid	C	35	24/25/26-28-37/39	3
P-DADMAC	-	-	-	-
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1	4
Sulfoethylcellulose	-	-	-	-
TMSP	-	-	-	4
Tributhylamin	T,N,Xi	22-23/24-38-51/53	36/37-45-61	4
Triethylamin	F,Xn,C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45	4

Entsorgungsschlüssel:

Säuren nitratfrei = 1; Säuren nitrathaltig = 2; Basen = 3; organische Substanzen halogenfrei = 4; organische Substanzen halogenhaltig = 5

## 8.2 Verwendete Chemikalien

### Chemikalien:

Die Chemikalien die für die mikrobiologische Herstellung von Cellulose genutzt wurden wurden über die Firma Sigma-Aldrich bezogen und wurden für die mikrobiologische Eignung getestet (Firmenangaben). Die verwendeten Furanderivate wurden von der Firma Acros bezogen. Die Sulfoethylcellulose stammt von der Firma Wolff-Cellulosics. Die verwendeten Chitosane stammten von den Firmen Aldrich, Fluka und Biomexx. Es handelte sich hierbei um Chitosane die aus den Schalen von Krustentieren (Crustacea) über das klassische chemische Verfahren der alkalischen Deacetalisierung gewonnen wurde. Alle anderen verwendeten Chemikalien stammen von der Firma Merck. Lösungsmittel geringer Reinheit wurden über eine einfache Rektifikation von Verunreinigungen befreit. Die verwendeten Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösungen besitzen folgende Zusammensetzung.

<i>Ringer-Lactat Lösung</i>		<i>Ringer Lösung</i>	
[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]
6,0 NaCl	130 Na <sup>+</sup>	8,6 NaCl	148 Na <sup>+</sup>
0,4 KCl	5 K <sup>+</sup>	0,3 KCl	4 K <sup>+</sup>

<i>Ringer-Lactat Lösung</i>		<i>Ringer Lösung</i>	
0,27 CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,8 Ca <sup>2+</sup>	0,33 CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2,2 Ca <sup>2+</sup>
3,12 Na-Lactat	112 Cl <sup>-</sup>	-	156 Cl <sup>-</sup>
-	28 Lactat <sup>-</sup>	-	-

### 8.3 Fehlerdiskussion

Man unterscheidet bei wissenschaftlichen Arbeiten drei Arten von Fehlern, die die Ergebnisse beeinflussen.

Menschlicher Fehler (human error): Diese Fehler entstehen aus einem Benutzerfehler, d.h. eine Probe wurde im Autosampler falsch platziert oder es wurden Beschriftungen vertauscht. Daraus resultiert ein falscher Messwert für diese Proben. Für diese Benutzerfehler gibt es keine statistische Beschreibung und sie sind auch bei sorgfältiger Arbeitsweise nicht total auszuschließen und führen zu einem Fehler von 100 Prozent.

Systematischer Fehler (systemic error): Systematische Fehler sind ebenfalls nicht statistisch zu analysieren und resultieren z.B. aus einer fehlerhaften Kalibrierung von Instrumenten. Dies führt zu einer Messwertverschiebung, die auf alle Messungen denselben Einfluss haben. Man spricht in diesem Fall auch von einer konstanten Verschiebung der Messwerte. Ein weiteres Beispiel ist ein immer auf die gleiche Art falsch abgelesenes Messinstrument.

Deshalb wurden das Abwiegen, das Einfüllen, das Abmessen und die Probenbehandlung immer mit den selben Geräten (Spatel, Pipetten, Waagen, Zentrifugen, Schüttelapparat, usw.) durchgeführt, um den systematischen Fehler gering zu halten (Gleichbehandlung aller Proben).

Der absolute Fehler in der Lichtstreuung hängt von der Genauigkeit der Kalibrierung des Lichtstreuophotometers ab und ist wegen der Unsicherheit der zugrunde gelegten Absolutstreuung von Toluol nicht genau bekannt. Eine weitere Fehlerquelle ist die Bestimmung des Versatzes zwischen Lichtstreuophotometer und Konzentrationsdetektor. Der Versatz hat einen Einfluss auf die Zuordnung von den Signalen des Lichtstreuophotometers und des Konzentrationsdetektors, d.h. welche Konzentration welchem Lichtstreusignal zugeordnet wird. Insgesamt kann ein Fehler von  $\pm 10\%$  für die Lichtstremessungen angegeben werden.

Die prozentuale Wiederfindungsrate WR hat einen Fehler von  $\pm 10\%$ , der aufgrund der

Probenvorbereitung, der Volumengenauigkeit bei der Injektion im Autosampler und der integralen Massenbestimmung mittels eines konstanten Brechungsindexinkrements erfolgt. Ein Wert von über 85 % entspricht einer sehr guten Wiederfindungsrate.

Den größten Einfluss auf die Bestimmung der relativen Viskositäten hatte die Temperatur. Deshalb wurde ein moderner Thermostat zur Temperierung eingesetzt, der aber auch nicht frei von geringen Temperaturschwankungen war. Eine weitere wichtige Fehlerquelle war die Probenpräparation (Gleichbehandlung). Die Viskosimetrieanlage verfügte schon über ein Lichtschranken gestütztes Zeiterfassungssystem im hundertstel Sekunden Bereich. Für die Viskosimetrie ergibt sich ein Fehler von 3 % für die Messungen.

Die Bestimmung des durchschnittlichen Substitutionsgrad (DS) bzw. durchschnittlichen Deacetalisierungsgrad erfolgte über  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanz Untersuchungen. Der Fehler liegt hierbei bei ca.  $\pm 1-2$  %.

Bei der Bestimmung der Zugbelastbarkeit von Membranen können geringe Schäden oder Verschmutzungen in der Membran die Ermittelten Werte stark verfälschen. Es wurden daher nur visuell gleichförmige Membranen untersucht. Für diese Untersuchungen ergibt sich eine Fehler von ca.  $\pm 5$  %.

Bei der Bestimmung der Wasserdampfpermeabilität der Membranen wurden 5 fach Untersuchungen durchgeführt, um eine Standardabweichung ermitteln zu können. Diese beträgt nach wenigen Untersuchungstagen ca.  $\pm 10-15$  %. Dies ist auf den geringen Massenunterschied zwischen der Anfangsmasse und der Masse nach wenigen Tagen zurückzuführen. Nach einer Messzeit von 14 Tagen verringert sich dieser Fehler auf  $\pm 2-3$  %.

Die Fehler der Gas-Permeabilitäten die mit dem Verfahren des Druckanstiegs ermittelt wurden, liegen wenn man von homogenen Membranen ausgeht bei ca.  $\pm 1$  %.

Der Fehler der Quecksilber Porosimetrie kann nur schwer erfasst werden, da bei der Berechnung der spezifischen Oberfläche eine Reihe von Näherungen durchgeführt werden. So muss die Membran inkompressibel sein, darf sich nicht mit Quecksilber benetzen lassen und bei den enthaltenen Poren wird für die Berechnung von Zylindrischen-Poren ausgegangen. Der Fehler kann daher mit ca.  $\pm 10$  % angegeben werden.

Die Bestimmung der Netzwerkstrukturparameter durch Oszillationsmessungen im linear viskoelastischen Bereich sind stark von der axial wirkenden Kraft abhängig (Vergleiche Kapitel 7.2). Bei den Messungen unterlag die axial wirkende Kraft einer Schwankungsbreite von ca. 5 N. Hierdurch resultiert ein Fehler von ca.  $\pm 5$  % für die ermittelten Speichermodule.

Zufälliger Fehler (random error): Zufällige Fehler sind der Hauptbereich der statistischen

Auswertung und können zwei Quellen haben. Ersten eine zufällige Variabilität bzw. Uneinheitlichkeit der Proben oder Substanzen und zweitens eine limitierte Präzision des analytischen Equipments. Um diese Fehler zu beschreiben, gibt es die beiden Größen Standardabweichung und mittlere Abweichung.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
A	Fläche
a	Exponent der $[\eta]$ -M-Beziehung (Aufweitungsparameter)
A <sub>2</sub>	zweiter Viralkoeffizient
BC	Bakteriencellulose
c	Lichtgeschwindigkeit
c	Konzentration
c*	kritische Konzentration
c <sub>[η]</sub> *	kritische Konzentration der Viskosität
c <sub>LS</sub> *	kritische Konzentration der Lichtstreuung
DDA	durchschnittlicher Deacetalisierungsgrad
d <sub>n</sub> /d <sub>c</sub>	Brechungsindexinkrement
DRI	Konzentrationsdetektor
DS	durchschnittlicher Substitutionsgrad
F	Kraft [N]
g	Schergeschwindigkeit
G	Elastizitätsmodul
G′	Speichermodul
G″	Verlustmodul
G*	Komplexes Scubmodul
GPC	Größenausschlußchromatographie
h	Stunde
I	Intensität des Lichtstrahls
IGATED	Inverse-gated-decupling
I <sub>b</sub>	Streulichtintensität
K <sub>η</sub>	Koeffizient der $[\eta]$ -M-Beziehung
m	Masse
M	Molmasse
M <sub>e</sub>	Verhängungsmolmasse
n	Stoffmenge
N <sub>A</sub>	AVOGADO-Zahl
N <sub>A</sub>	AVOGADRO-Konstante

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
p	Druck
P-DADMAC	Poly-Diallyldimethyl-Ammoniumchlorid
$p_0$	Druck
$P_e$	Polymerisationsgrad der Verhängungsmolmasse ( $M_e$ )
R	Gaskonstante
r	Radius
SEC	Sulfoethylcellulose
T	Temperatur
t	Zeit
TMSP	Trimethylsilylpropionsäure-d4-Natriumsalz
V	Volumen
$\alpha$	Quellung in einer Raumrichtung
$\gamma$	Deformation
$\delta$	chemische Verschiebung
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
$\eta$	Scherviskosität
$\eta_{sp}$	Spezifische Viskosität
$[\eta]$	STAUDINGER-Index
$\lambda$	Wellenlänge des Lichts
$\lambda_0$	Wellenlänge des Lichts im Vakuum
$\mu$	Mikro
$\nu$	Frequenz
$\nu_e$	Netzpunktdichte
$\xi$	Netzpunktstand
$\rho$	Dichte
$\rho_{\text{Polymer}}$	Dichte des Polymerknäuels in Lösung ohne das eingeschlossene Lösungsmittel
$\sigma_{21}$	Schubspannung
$\omega$	Kreisfrequenz

## 10 Literaturverzeichnis

[1]	Tanaka T.: Gels, Scientific American, Vol. 224, (1981), S. 110-123
[2]	Dworschak M.: Wunderpulver im Schrumpfpaket, Der Spiegel, Vol. 26, (2002), S. 178
[3]	Brannon-Peppas L., Harland R.S., Absorbent Polymer Technology, in Studies in polymer science 8 (Eds. L. Brannon-Peppas, R. S. Harland) Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokio, (1990)
[4]	DE 2706135, Verdickungsmittel für ausgeschiedenen Darminhalt und Harn, Barthell E., Schmidt O., (1978)
[5]	Kulicke W.-M., Nottelmann H., Preparation, Characterization and Rheological Behavior of Waterswellable Polymer Networks, Polymers as rheology modifiers, ACS-Book Series, Vol. 462 (1991), S. 62
[6]	Kulicke W.-M., Eidam D., Kath F., Kix M., Kull A., Hydrocolloids and Rheology: Regulation of Visco-elastic Characterization of Waxy Rice Starch in Mixture with galactomannans., Starch/Stärke, Vol. 48/3 (1996), S. 105-114
[7]	von Homeyer A., Kulicke W.-M., Rheo-mechanische Untersuchungen der Netzwerkstruktur von Elektrodenkontaktgelen und HPLC-Methode zur Bestimmung des Restmonomergehalts, Angew. Makromol. Chemie, Vol. 256, (1998), S. 29-37
[8]	Eggersdorfer M., Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in Energiewirtschaft und Chemie, Spektrum der Wissenschaft, (1999), S. 96-102
[9]	Research, Das Bayer Forschungsmagazin, 11, (1999), S.8
[10]	Levenson S.M., Wound Repair and Regeneration, Wound healing: a personal odyssey, Vol. 2. Issue 4 (1994), S.238-259
[11]	Hospitation, Dr. Bisqua, Zentrum für Schwerbrandverletzte, Berufsgenossenschaftliches Krankenhaus Boberg, April 2004
[12]	Gretener S.B., Siebenthal D. von, Huber T., Rüede P., Die Lokalthherapie chronischer Wunden: Auswahlhilfe moderner Wundaufgaben, Schweizer med. Forum, (8), 2001, S.10-18
[13]	DP 10041221.1, Wießler M., Verfahren zur Herstellung wasserlöslicher Sacharidkonjugaten und Sacharidmimetika durch Diels-Alder-Reaktion und ihre Verwendung als Therapeutika oder Diagnostika, (2000)

[14]	DE 19813663.3, Beiersdorf AG, Wundauflagen zur Entfernung von Störaufgaben aus Wundflüssigkeit, (1999)
[15]	Kratochvil P., Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Jenkins, A. D. (Hrsg.), Polymer Science Library Ed.5, Elsevier, (1987), S. 58-67
[16]	C. Clasen, W.-M. Kulicke, Viskosimetrie of Polymers and Polyelektrolytes, Springer Verlag, Heidelberg, (2004)
[17]	Rayleigh J., Strutt, J. W., On James Bernoulli's theorem in probabilities, Philosophical Magazine, Vol 47/5, (1899), S. 246-251
[18]	Smoluchowski, Ann. Phys. 25, (1908), S. 205
[19]	Raman C.V., A new radiation, Indian J. Phys., 2, (1927), S.387
[20]	Debye P., Light Scattering in Solutions, J.Appl. Phys., Vol. 15, (1944), S.338-342
[21]	Zimm B.H., J. Chem. Phys., 13, (1945), S.141
[22]	Wyatt Technology, Produktbroschüre zum DAWN EOS, (1999)
[23]	Kratochvil P., Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Elsevier, New York, 1987, S. 48-93
[24]	Mie, G., Beiträge zur Optik trüber Medien spezieller kolloidaler Metalllösungen, Annalen der Physik, Vol. 25, (1908), S. 377-445
[25]	Barth H.G., Water Soluble Polymers, Adv. in Chemistry Series, Vol. 213, (1986), S. 31-55
[26]	Kulicke W.-M., Böse N., Coll. Polym. Sci., Vol. 262, (1984), S. 197
[27]	Giddings, J. C., A new separation concept based on a coupling of concentration and flownonuniformities, Sep. Sci., Vol. 1, 1966, S. 123
[28]	Giddings, J. C., Graff, K. A., Caldwell, K. D., Myers, M. N., „Field-Flow Fractionation: Promising approach for the separation and characterization of macromolecules“, ACS Advances in Chemistry Series, No. 203, Craver, C. D. (Hrsg.), (1983), S. 257
[29]	Janca, J., „Field-Flow Fractionation: Analysis of Macromolecules and Particles“, Chromatographic Science-Series, Vol. 39, (1988), S. 336
[30]	Myers, M. N., „Overview of Field-Flow Fractionation“, J. Microcolumn Sep., Vol. 9, (1997), S. 151
[31]	Schimpf, M. E., „Characterization of Polymers by thermal field-flow fractionation“, J. Chrom., Vol. 517, (1990), S. 405
[32]	Cölfen, H., Antonietti, M., „Field-Flow Fractionation Techniques for Polymer and Colloid Analysis“, Adv. Polym. Sci. Vol. 150, (1999), S. 67

[33]	Giddings, J. C., Yang, F. J., Myers, M. N., „Theoretical and Experimental Characterization of Flow Field-Flow Fractionation“, <i>Anal. Chem.</i> , Vol. 48, (1976), S. 1126
[34]	Lee, H.-L., Reis, J. F. K., Dohner, J., Lightfoot, E. N., „Single-phase chromatography: solute retardation by ultrafiltration and electrophoresis“, <i>AIChE J.</i> , Vol. 20, (1974), S. 776
[35]	Wahlund, K.-G., Giddings, J. C., „Properties of an Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall“, <i>Anal. Chem.</i> , Vol. 59, (1987), S. 1332
[36]	Wahlund, K.-G., Litzén, A., Application of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel to the Separation and Characterization of Proteins, Plasmids, Plasmid Fragments, Polysaccharides and Unicellular Algae, <i>J. Chromatogr.</i> , Vol. 461, (1989), S. 73
[37]	Casartelli, E. A.; Miekeley, N., Determination of thorium and light rare-earth elements in soil water and its high molecular mass organic fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry and on-line-coupled size-exclusion chromatography, <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i> , Vol. 377, Issue 1, (2003) S. 58-64
[38]	Koplik, R.; Pavelkova, H.; Cincibuchova, J.; Mestek, O.; Kvasnicka, F.; Suchanek, M., Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, <i>Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences</i> , Vol. 770, Issue 1-2, (2002), S. 261-273
[39]	Jacobs, A., Dahlmann, O., Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, <i>Biomacromolecules</i> , Vol. 2, (2001), S. 894-905
[40]	Kaivez, A.; Gallez, X. A.; Daoust, D.; Devaux, J.; Godard, P., Molecular structure characterization of linear and branched polystyrene blends by size exclusion chromatography coupled with viscometry, <i>Polymer</i> , Vol. 43, Issue 11, (2002), S. 3181-3190

[41]	Mrkvičková, L., Porsch, B., Sundelöf, L.-O., Study of Poly(methylmethacrylate) Stereocomplexes by Size Exclusion Chromatography and Dynamic Light Scattering, <i>Macromolecules</i> , Vol. 32, (1999), S. 1189-1193
[42]	Barth, H. G., Boyes, B. E., Jackson, C., Size Exclusion Chromatography and Related Separation Techniques, <i>Anal. Chem.</i> , Vol. 70, (1998), S. 251R-278R
[43]	Kulicke W.-M., <i>Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen</i> , Hüthing & Wepf Verlag, (1986). Mezger, T., <i>Das Rheologie-Handbuch</i> , Vincentz Verlag, Hannover, (2000)
[44]	Gehm, L., <i>Rheologie</i> , Vincentz Verlag, Hannover, (1998)
[45]	Flosdorf, E.W., Chambers L.A., <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , (1933), Vol. 55, S. 3501
[46]	Schnabel W., <i>Polymer Degradation</i> , Carl Hanser Verlag, München, 1981
[47]	Basedow A.M., Ebert H.K., <i>Ultrasonic Degradation of Polymers in Solution</i> , <i>Adv. Polym. Sci.</i> , (1977), Vol. 22, S. 83-148
[48]	Didenko Y.T., McNamara III W.B., Suslick K.S., <i>Nature</i> , (2000), Vol. 407, S. 877-879
[49]	Nguyen, T.Q., Liang, Q.Z., Kausch, H.H., <i>Polymer</i> , (1997), Vol. 38, S. 3783-3793
[50]	Milas M., Rinaudo M., Tinland B., <i>Carbohydr. Polymer</i> , (1986), Vol. 6, S. 95
[51]	Malkotra S.L., <i>Ultrasonic degradation of hydroxypropylcellulose solutions in water, ethanol and tetrahydrofuran</i> , <i>J. Macromol. Sci. Chem.</i> , (1982), Vol. A17, Issue 4, S. 601–636
[52]	W.-M. Kulicke, M. Otto, A. Baar, <i>Improved NMR characterisation of high molecular weight polymers and polyelectrolytes through use of prelineary ultrasonic degradation</i> , <i>Macromol. Chem.</i> , (1993), Vol. 194, S. 751-765
[53]	M.Hesse, H. Meier, B. Zeeh, <i>Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie</i> , Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1991)
[54]	US 3013467, Minsky M., <i>Microscopy apparatus</i> , (1957)
[55]	Minsky M., <i>Memoir on inventing the confocal scanning microscope</i> , <i>Scanning</i> , (1988), Vol. 10, S. 128–38
[56]	Hamilton D.K., Wilson T., Sheppard C.J.R., <i>Experimental observation of the depth-discrimination properties of scanning microscopes</i> , <i>Opt. Lett.</i> , (1981), Vol. 6, S. 625
[57]	Wilson T., <i>Depth response of scanning microscopes</i> <i>Optik</i> , (1989), Vol. 81, S. 113
[58]	Wilson T., <i>Confocal Microscopy</i> , (1990), New York, Academic P.
[59]	Hamilton D.K., Wilson T., <i>Three-dimensional surface measurement using the confocal scanning microscope</i> , <i>Appl. Phys.</i> , (1982), Vol. B 27, S. 211

[60]	Carlsson K., Åslund N., Confocal imaging for 3-D digital microscopy, Appl. Opt., (1987), Vol. 26, S. 3232
[61]	Massig J.H., Preissler M., Wegener A.R., Gaida G., Real-time confocal laser scan microscope for examination and diagnostics of the eye in vivo, Appl. Opt., (1994), Vol. 33, S. 690
[62]	Hamilton D.K., Wilson T., Surface profile measurement using the confocal microscope, J. Appl. Phys., (1982), Vol. 53, S. 5320
[63]	Xiao G.Q., Kino G.S., A real-time confocal scanning optical microscope, (1987), Proc. SPIE, Vol. 809, S. 107
[64]	Xiao G.Q., Corle T.R., Kino G.S., Real-time confocal scanning optical microscope, Appl. Phys. Lett., (1988), Vol. 53, S. 716
[65]	Hellmuth T., Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie, Phys. Blätter, (1993), Vol. 49, S. 489
[66]	Dixon A.J., Doe N., Pang T.M. Industrial applications of confocal scanning optical microscopy Proc. SPIE (1987), Vol. 809, S. 37
[67]	Petran M., Hadravsky M., Egger M.D., Galambos R., Tandem-scanning reflected-light microscope J. Opt. Soc. Am., (1968), Vol. 58, S. 661
[68]	Tiziani H.J., Jordan H-J., Contributions to Optical Non-Contact Techniques for Engineering Surface Metrology, BCR Information, European Commission, (1995), Report EUR 16161 EN
[69]	Jordan H-J, Optische Mikrotopometrie und Rauheitsmessung an technischen Oberflächen, Berichte aus dem Institut für Technische Optik der Universität Stuttgart, (1996)
[70]	Jordany H.J., Wegner M., Tiziani H., Highly accurate non-contact characterization of engineering surfaces using confocal microscopy, Meas. Sci. Technol., (1998) Vol. 9, S. 1142–1151
[71]	Winter G., Nature, Vol. 193, (1962) S. 293
[72]	Turner T.D., Wound Rep. Reg., Vol. 2, (1994) S. 202
[73]	Achterberg V., J. Wound Care, Vol. 5, (1996), S. 79
[74]	Härtel P., Verbrennungen und ihre Behandlung, Krankengymnastik, München, 24. Jahrgang, 1, (1972) S. 1-6
[75]	Butenandt I., Coerdts I., Verbrennungen im Kindesalter, Stuttgart, Enke Verlag, (1979)

[76]	Röthel H., Vanscheid W., Basisinformationen zum Wundmanagement (I): Die Reinigung der Wunde, Hartmann Wund Forum, 1/1997, S. 24-28
[77]	Röthel H., Vanscheid W., Basisinformationen zum Wundmanagement (II): Defektauffüllung und Reepithelisierung, Hartmann Wund Forum, 2/1997, S. 24-28
[78]	Mast B.-A., Schultz G.-S., Interaktionen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proterasen in akuten und chronischen Wunden, Hartmann Wund Forum, 3/1997, S. 16-24
[79]	Kull W., Kulicke W.-M., Dissertation, Universität Hamburg, (1996)
[80]	S. Knop, H. Thielking, W.-M. Kulicke, Symplex Membranes of Sulphoethylcellulose and Poly(diallyldimethylammonium chloride) for the Pervaporation of Water-Alcohol Mixtures, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 77, (2000), S. 3169-3177
[81]	Kaiser U., Dissertation, Universität Hamburg, 1991
[82]	Adolphi U., Dissertation, Universität Hamburg, 1996
[83]	Bartsch S., Dissertation, Universität Hamburg, 1998
[84]	Manns S., Nachwachsende Rohstoffe, Ulmer Verlag, Stuttgart, 1998
[85]	Waskow F., Leitfaden Nachwachsende Rohstoffe, C.F. Müller Verlag, Heidelberg, 1998
[86]	Walton A.G., Blackwell J., Biopolymers, Academic Press, New York 1973
[87]	Muzzarelli R.A.A., Peter M.G. (Hrsg.): Chitin Handbook, Atec, Grottammare 1997
[88]	Bader H.J., Birkenholz E., Chitin – Ein wertvolles Polysaccharid aus Krabbenpanzern PdN-Chemie 1996, 45
[89]	Muzzarelli R.A.A., Chitin in Nature and Technology, Plenum Press, de Gruyter, New York 1986
[90]	Rout D.K., Pulapura S.K., Gross R.A., Gel-Sol Transition and Thermotropic Behavior of a Chitosan Derivative in Lyotropic Solution, Macromolecules, 1993, 26, 6007-6010
[91]	Hye Keong Jun, Ji Sook Kim, Kong Kyoon No, Samuel P. Meyers: Chitosan as a Coagulant for Recovery of Proteinaceous Solids from Fofu Wastewater, J. Agric. Food Chem., 1994, 42, 1834-1838
[92]	Laue Carsten, Synthesis and Application of hybrid Natural/Synthetic Watersoluble Cationic Graft-copolymers, Dissertation, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2000

[93]	Rether Alexander: Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstofffunktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen, Dissertation, Anorganisch-chemisches Institut der technischen Universität München, 2002
[94]	Deuchi K., Kanauchi O., Imasato Y., Kobayshi E., Effect of the viscosity or deacetalion degree of Chitosan on fecal fat excrement from rats fed on a high-fat diet. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 1995a, 59(5), 781-785
[95]	Kanauchi O., Deuchi K., Imasato Y., Shizukuish iM., Kobayshi E., Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 1995, 59(5), 786-790
[96]	OVG-Reinland-Pfalz, 26.6.1999, Az. 6A 10716/99
[97]	VGH Baden-Württemberg, 22.2.2000, Az. 9S 188/00
[98]	Nakatuka S., Andrady A.-L., Permeability of Vitamin B-12 in Chitosan Membranes. Effect of Crosslinking and Blending with Poly(vinylalcohol) on Permeability, in: <i>Journal of Applied polymer Science</i> , 44 (1992), 17-28
[99]	Zeng Xianfang, Ruckenstein Eli, Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes, <i>Ind. Eng. Chem. Res.</i> 35,1996, 4169-4175
[100]	Marie Emanuelle, Landfester Katharina, Antonietti Markus, Synthesis of Chitosan-Stabilized polymer Dispersions, Capsules, and Chitosan Grafting Produkts via Miniemulsion, <i>Biomacromolecules</i> , 3, 2002, 475-481
[101]	Teixeira Marc A., Patterson William J., Dunn Edward J., Li Qiangliang, Hunter Brian K., Goosen Mattheus F. A., Assessment of Chitosan gels for the Controlled Release of Argochemicals, <i>Ind. Eng. Chem. Res.</i> 29, 1990, 1205-1209
[102]	Okamoto Y., et.al., Analgesic effekts of chitin and chitosan, <i>Carbohydrated Polymers</i> , Vol. 49, Issue 3, (2002), S. 249-252
[103]	No Hong Kyoon, Meyers Samuel P., Preparation of chitin and chitosan, <i>Chitin Handbook</i> , Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G., European Chitin Society, (1997), ISBN- 88-86889-01-1
[104]	J.-F. Revol, J. Li, R. H. Marchessault, Effect of Degree of deacetylation of Chitin on the Properties of Chitin Crystallites, <i>J. Appl. Polym. Sci.</i> , Vol. 65 (1997), S. 373-380
[105]	Bough W.A., Salter W.L., Wu A.C.M., Perkins B.E, <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , (1978), Vol. 20, S. 1931

[106]	US 4195175, Peniston Q.P., Jonson E.L., Process for the manufacture of chitosan, (1980)
[107]	Alimuniar A., Zainuddin R., Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier Applied Science, Essex, UK, (1992) S. 627
[108]	Brzeski M. M., Hirano S., Tokura S., Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan, The Japan Society of Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan, S. 15
[109]	Lusena C.V., Rse R.C., J. Fisch. Res. Board Can., Vol. 10, (1953), S. 521
[110]	Lavertu M., Xia Z., et al., A validated 1H-NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 32, (2003), S. 1149-1158
[111]	Butler G.B., Ingley F.L.; J. Am. Chem. Soc., (1951), 72, S. 894
[112]	Ottenbrite R.M., Shillady D.D. , Polymeric amines and ammonium salts, (1980) Pergamon Press, Oxford, S. 143
[113]	Masterman T.C, Dando N.R., Weaver D.G., Seyferth D., J. Polym. Sci., Part B: Polym. Physics, Vol. 32, (1994), S. 2263
[114]	Lancaster J.E., Bacchei L., Panzer H.P., J. Polym. Sci, Polym. Lett., Vol. 14,(1976), S. 549
[115]	Wandrey C., Jarger W., Reinisch G., Hahn M., Engelhard G., Jancke H, Ballschuh D., Acta Polym, Vol. 32, (1981), S. 179
[116]	EP 0265710, Jaeger W., Wandrey C., Hahn M., Ballschuh D., Ohme R., Staeck R., Biering H., (1987)
[117]	W. Oppermann, Th. Schulz, Interaction Between oppositely charged Polyelectrolytes in aqueous Solution, Macromol. Chem. - Macromolecular Symposia, Vol. 39 (1990), S. 293 – 299
[118]	V- A. Kabanov, A.-B. Zezin, U.-V. Izumrudov, T.-K. Bronitch et al., Structure formation and Gelation Phenomena in Solutions of Solutions of Ternary Interpolyelectrolyte Complexes, Macromol. Chem. - Macromol. Symposium, Vol. 39 (1990), S. 155 - 169
[119]	Wang Hanfu, Li Wenjun, Lu Yuhua, Wang Zhiliang, Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complex. I. Preparation, structure, pH-sensitivity, and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semi-interpenetrating polymer network, Journal of Applied Polymer Science 65(8), (1997), S. 1445-1450

[120]	Tsuchida Eishun, Yamamoto Kimihisa, Shouji Eiichi, Electrophilic reaction of phenyl bis(phenylthio)sulfonium cation as an active species for the oxidative polymerization of diphenyl disulfide, <i>Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry</i> , A31(11), (1994), S. 1579-1589
[121]	Lee Kueir-Rarn, Lai Juin-Yih, Pervaporation of aqueous alcohol mixtures through a membrane prepared by grafting of polar monomer onto nylon 4, <i>Journal of Applied Polymer Science</i> , 57(8), (1995), S. 961-968
[122]	Dautzenberg Horst, et.al., Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications, <i>Annals of the New York Academy of Sciences</i> , 875(Bioartificial Organs II), (1999), S. 46-63
[123]	Dauzenberg H. et al., Polyelektrolytes - Formation, Characterisation and Application, in: Gardener Cincinnati, (1994)
[124]	Susanne Knop, W.-M. Kulicke, Dissertation, Synthese und Charakterisierung von Symplex-Membranen zur Pervaporation von Alkohol-Wasser-Mischungen, Universität Hamburg, 2000
[125]	Dunn E. J., Zhang X., Sun D., Goosen M. F. A., Synthesis of N-(aminoalkyl) chitosan for microcapsules, <i>Journal of Applied Polymer Science</i> , 50(2), (1993), S. 353-365
[126]	Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W., <i>Comprehensive Cellulose Chemistry</i> , Wiley-VCH Weinheim, Vol.2, (1998)
[127]	Jonas R., Farah L.F., Produktion and application of microbial cellulose, <i>Polym. Degrad Stab.</i> (1998), 59, S. 101-106
[128]	Ross P., Mayer R., Benziman M., Cellulose biosynthesis and function in bacteria, <i>Microbiol. Rev.</i> (1991), Vol. 55, S. 35-58
[129]	Cannon R.E., Anderson S.M., Biogenesis of bacterial cellulose, <i>Crit. Rev. Microbiol.</i> (1991), Vol. 17, Issue 6, S. 435-447
[130]	Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura N. et. al., The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, <i>J. Mater Sci.</i> , (1989), Vol. 24, S. 3141-3145
[131]	Brown A.J., On an acetic ferment which forms cellulose, <i>J. Chem. Soc.</i> , (1886), Vol. 49, S. 172-186
[132]	Brown A.J., The chemical action of pure cultivation of bacterium aceti., <i>J. Chem. Soc.</i> (1886), Vol. 49, S. 432-439

[133]	Fontana J.D. et. al, Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 24/25, (1990), S. 253-263.
[134]	Klemm D., Schumann D., udhardt U., Marsch S., Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery, progress in Polymer Science, Vol. 26, Issue 9, (2001), S. 1561-1603.
[135]	Jonas R., Farah L.F., Produktion and application of microbial. cellulose, Polym. Degrad. Stab. (1998), Vol. 59, S. 101-106
[136]	De Wulf P., Joris K., Vandamme E.J., Improved cellulose formation by <i>Acetobacter xylinum</i> mutant limited in (keto)gluconase synthesis, J. Chem. Technol. Biotechnol, (1996), Vol. 67, S. 376-380
[137]	Samon S., Hudson S.M., Crystal morphology, biosynthesis, and physical assembly of cellulose, chitin and chitosan, JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys., (1997), Vol. C37, Issue 2, S. 199-279
[138]	Vandamme E.J., De Baets S., Vanbaelen A., Joris K., De Wulf P., Improved production of bacterial cellulose and its application potential, Polym. Degrad. Stab. (1998), Vol. 59, S. 93-99
[139]	Hirai A., Horii F., Cellulose Assemblies by Acetobacter Yxlinum, ICR Annual Report, Vol 6, (1999), S. 28-29
[140]	Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A., Bacterial cellulose – a masterpiece of nature 's arts. J. Mater Sci. (2000), Vol. 35 S. 261-270
[141]	Schmauder H-P., Frankenfeld K., Lindner B., Hornung M., Ludwig M., Mülverstedt A., Bakteriencellulose – ein interessantes Biomaterial, Bioforum, Vol. 23, Issue 7/8, (2000) S. 484-486
[142]	Pitanguy I., Brentano J.M.S., Bos H., Salgado F. Mazzarone F., Rev. Bras. Cir. Vol. 78, Issue 1, (1988). S. 67-78
[143]	Castro O.C., Ribeiro Filho A.S., Nogueira V.M., HFA-Publ. Tech. Cient. (Brasilia), Vol. 3, Issue 3, (1988), S. 209-232
[144]	Pires M.C., Reis V.M.S., Gatti T.R., Pegas J.R.P., Guerra J.M.M., Sapiéri A., VI World Congress of Dermatology, Rio de Janero, Rev. Bras. Dermatology (1989)
[145]	Gattaz hochbringen A., Rev. Bras. Cir., Vol. 79, Issue 1, (1989), S. 45-51
[146]	Mayall R.C., Mayall A.C.D.G., Rocha H.C., XIX World Congress of the International Society for Cardiovascular Surgery, Toronto, Rev. Bras. Angiol., (1989)

[147]	Effectiveness of a Biocellulose Wound Dressing for the Treatment of Chronic Venous Leg Ulcers: Results of a Single Center Randomized Study Involving 24 Patients, Alvarez O., et.al., Wounds, Vol. 16, No.7, July 2004, S. 23
[148]	Hestrin S., Schramm M., Synthesis of Cellulose by <i>Acetobacter xylinum</i> , Biochem J., Vol. 58, (1954), S. 345-352
[149]	Son H.J., Heo M.S., Lee S.J., Optimzation of fermentation conditions fpr the production of bacterial cellulose by newly isolated Acetobacter sp. A9 in shaking cultures, Biotechnol. Appl. Biochem. Vol. 33, (2000) S. 1-5
[150]	Fontana J.D. et al., Nature of Plant Stimmulators in the Produktion of <i>Acetobacter xylinum</i> („Tea Fugus“) Biofilm Used in Skin Therapy, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol 28/29, (1991), S. 341-351
[151]	Schmauder H.P., Einfeld L., Geyer U., Klemm D., Biosynthesis of cellulose by <i>Acetobacter xylinum</i> using of Glucose and modified carbon-source, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., Vol 57, Issue 4a, (1992), S. 1797-1800
[152]	Geyer U., Klemm D., Schmauder H-P., Kinetics of the Utlization of Different C Sources and the cellulose Formation by Actobacter xylinum, Acta Biotechnol. Vol. 14, Issue 3, (1994), S. 261-266
[153]	Gent P.A., Gigg R., Synthesis of Benzyl and Allyl Ethers od D-Glucopyranose, Carbohydratet Reaserch, Vol. 49, (1976), S. 325-333
[154]	Meyer W., Schulz N., Kreimeier R., Synthese, Strukturaufklärung trans-verknüpfter 3,6-Anhydro-1,2-O-isoprpyliden-a-D-hexofuranosen, Liebings Ann. Chem., (1994), S. 337-346
[155]	Limousin C., Cléophax J., Loupy A., Petit A., Synthesis of Benzoyl and Dodecanol derivates from Protected Carbohydrates under Focused Microwave Irradiation, Tetrahedron, Vol. 54, (1998), S. 1367-1378
[156]	Gramera R.E., Bruce R.M., Hirase S., Whister R.L., Synthesis of 5-Amino-5-desoxy Derivates of L-Idose, Notes, (May, 1963), S. 1401-1403
[157]	Bruker Industrial Automation, SAINT 6.02 A, Program for data reduction, (2000)
[158]	SADABS, Program for area detector absorption corrections, Siemens Analytical X-Ray Instruments
[159]	G. Sheldrick, SHELXTL-NT V 5.1, Bruker Crystallographic Research Systems, Bruker Analytical X-Ray Instr. Inc., Madison, Wisconsin, USA, (1997)
[160]	G. Sheldrick, SHELXS-97, Program for Crystal Structure Refinement, Universität Göttingen, (1997)

[161]	G. Sheldrick, SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, Universität Göttingen, (1997)
[162]	Bruker AXS, XSELL, V 4.01, (2000)
[163]	David S., de Sennyey G., Synthèse des 1-(5-Dèsoxy- $\beta$ -D-ribo-hexofuranosyl)cytosine et 1-(2,5-Didèsoxy- $\beta$ -D-érythro-hexofuranosyl)cytosine, et de leurs phosphates. Contribution À l'étude de la spécificité d'une pibonucléotide-réductase de mammifère, Carbohydrate Research. Vol 77, (1979), S. 79-97
[165]	Wadouachi A. et al., Carbohydrate Res., Vol. 238, (1993), S. 327-334
[166]	Somanathan R., Tappa H.D., Smith K.M., Synthesis of Buchananine a Novel Pyridine Alkaloid, J. Org. Chem., Vol. 45, (1980), S. 4999-5000
[167]	Yamauchi N., Kakinuma K., Enzymatic carbocycle Formation im microbial Secondary Metabolism. The Mechanism of the 2-Deoxy-scyllo-inosose Synthase Reaktion as a Crucial Step in the 2-Desoxystreptamine Biosynthesis in Streptomyces Fradiae, J. Org. Chem. Vol. 60 (1995), S. 5614-5619
[168]	Lemieux R.U., Bose R.J., Reactions of 2-Acetoxy-4,6-di-O-acetyl-3-O-(2,6-dichlorobenzoyl)-D-glucal, Tri-O-acetyl-3-desoxy- $\alpha$ -D-erythro-hex-3-enopyranosyl chloride, and related Compounds, Canadian Journal of Chemistry, Vol 44, (1966), S. 1855-1862
[169]	Krishna P.R., Kannan V., Ilangovan A. Scharman G.V.M., Asymmetric Baylis-Hillman reaction using sugar acrylates-synthesis of optically active $\alpha$ -methylene- $\beta$ -hydroxy alkanooates, Tetrahedron Asymmetry, Vol. 12, (2001), S. 829-837
[170]	Ouchi T., Jokei S., Chikashita H., Synthesis of 1,2:5,6-Di-O-isopropylidene-3-O-[3-(uracil-1-yl)propionoyl]- $\alpha$ -D-glucofuranose and 1,2-mono-O-isopropylidene-6-O-[3-(uracil-1-yl)propionoyl]- $\alpha$ -D-glucofuranose, J. Heterocyclic Chem., Vol. 19, (1982), S. 935
[171]	Koßmehl G., Volkheimer J., Synthesis of Polymerizable Hexose Derivates, Liebigs Ann. Chem. (1989), S. 1127-1130
[172]	Tamai N., Tatsumi D., Matsumoto T., Rheological Properties and Molecular Structure of Tunicate Cellulose in LiCl/1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone, Biomacromolecules, Preprint, (2004)
[173]	Chrapava S., Touraud D., Rosenau T., Potthast A., Kunz W., The investigation of the influence of water and temperature on the LiCl/DMAc/cellulose system, Phys. Chem. Chem. Phys., Vol. 5, (2003), S. 1842-1847

[174]	Ishii D., Tatsumi D., Matsumoto T., Effect of Solvent Exchange on the Solid Structure and Dissolution Behavior of Cellulose, <i>Biomacromolecules</i> , Vol. 4, (2003), S. 1238-1243
[175]	McCormick, C.L.; Callais, P.A.; Hutchinson, B.H., Jr.; Solution Studies of Cellulose in Lithium Chloride and N,N-Dimethylacetamide; <i>Macromolecules</i> , Vol. 18, (1985), S. 2394-2401
[176]	DD 270012 A1, Verfahren zu Herstellung von Membranen aus Polyelektrolytkomplexen, Dauzenberg H., (1989)
[177]	Scharnagl N.; Peinemann K.-V.; Wenzlaff A.; Schwarz H.-H.; Behling R.-D.; Dehydration of organic compounds with SYMPLEX composite membranes, <i>Journal of Membrane Science</i> , (1996), 113(1), S. 1-5
[178]	Lukás J., et. al., Surface characterization of polyelectrolyte complex membranes based on sodium cellulose sulfate and poly(dimethyldiallylammonium chloride), <i>J. Membr. Sci.</i> , 106 (3), (1995), S. 281-288
[179]	DE 4322956A1, Folie aus Chitosan zur Wundversiegelung und Verfahren zu ihrer Herstellung, (1995)
[180]	US 4572906 Chitosan Based Wound Dressing Materials, (1986)
[181]	DE 3321446C2, Verwendung von Chitosan zur Erzielung einer Hämostase, zur Inhibierung der Fibroplastie und zur Förderung der Geweberegeneration einer Wunde, (1993)
[182]	DE 10117234, Poröse und nichtporöse Matrices auf Basis von Chitosan und Hydroxycarbonsäuren, (2002)
[183]	DE 10064314, Microbially produced, physiologically compatible, permeable film comprised of Cellulose that contains Chitosan, (2002)
[184]	US 6521243, Ionic chitosan -iodine complexes: antiseptic hydrogels and wound healing promoters, (2003)
[185]	US 5902798, Method of promoting dermal wound healing with chitosan and heparin or heparin sulfate, (1999)
[186]	US 5773033, Fibrinogen/chitosan hemostatic agents, (1998)
[187]	US 6638918, Chitosan compositions, (2003)
[188]	US6699287, Dermal scaffold using alkaline pre-treated chitosan matrix or alkaline pre-treated chitosan and alkaline pre-treated collagen mixed matrix, (2004)
[189]	DE 69720479 (EP 0927053 B1), Fragmentierte Polymere Hydrogele zur Verhinderung von Gewebeverklebung und Ihre Herstellung, (2003)

[190]	DE 68922630T2, Chitosanfasern mit hoher Festigkeit und damit hergestelltes Gewebe
[191]	US 5420197, Gels Formed by the Interaction of polyvinylpyrrolidone with chitosan derivatives
[192]	DE 10135676A1, Physiologisch verträglicher, Cellulose enthaltener Film
[193]	EP 1246650 B1, Flexibler Chitosanfilm zur Verwendung als Wundaufkl
[194]	DE 19948120 C2, 3D-Matrix zur Herstellung von Zelltransplantaten, (2001)
[195]	Gorovoj L.F., Burdyukova L.I., et. al., Chitin-containing materials Mycoton for wound treatment, <i>Advan. Chitin Sci.</i> , Vol. 4, (2000), S. 404-410
[196]	Alekseev A.A., Krutikov M.G., et. al., Activetex wound dressings in burn treatment, <i>Annals of Burns and Fire Disasters</i> , Vol. XV, Issue 1, (März 2002), S. 53-78
[197]	Minami S., Okamoto Y., Veterinary practice with chitin and chitosan, <i>EXS</i> , (1999), Vol. 87, S. 265-277
[198]	Khan T.A., Peh K.K., A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats, <i>J. Pharm. Pharmaceut. Sci.</i> , Vol. 6, Issue 1, (2003), S. 20-26
[199]	Kahn T.A., Peh K.K., Ch'ng H.S., Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing, <i>J. Pharm. Pharmaceut. Sci.</i> , Vol. 3, Issue 3, (2000), S. 303-311
[200]	M. Mattioli-Belmonte, B. Muzarelli and R. Muzarelli Chitin and Chitosan in woundhealing and other biomedical applications, <i>Carbohydrates Europe</i> , Vol. 19, (1997), S. 30-36
[201]	Gorovoj L.F., L.I. Burdyukova, V.S Zemskov, A.I. Prilutsky, V.S. Artamonov, S.O. Ivanyuta, A.B. Prilutskaya, Chitin-containing materials Mycoton for wound treatment, <i>Advan. Chitin Sci.</i> , Vol. 4, (2000), S. 68-75
[202]	Hitoshi Sashiwa, Norioki Kawasaki, Atsuyoshi Nakayama, Einosuke Muraki, Noboru Yamamoto, and Sei-ichi Aiba, Chemical Modification of Chitosan-Synthesis of Water-Soluble Chitosan Derivatives by Simple Acetylation, <i>Biomacromolecules</i> , Vol. 3, (2002), S. 1126-1128

# Lebenslauf

---

## **Persönliche Information**

---

Familienstand: ledig, keine Kinder  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Alter: 31 Jahre  
Geburtsort: Hamburg

## **Schule & Ersatzdienst**

---

1980 – 1984            Grundschule Bovestraße, Hamburg

1984 – 1990            Realschule Griebstraße/Marienthaler Straße, Hamburg

1990 – 24.6.1994      Doppeltqualifizierender Bildungsgang, Chemisch Technische Assistenz (CTA) in Verbindung mit der Allgemeinen Hochschulreife  
Gewerbeschule 13 – CTA Note: 1,9  
Gesamtschule Bergedorf – Abitur Note: 2,1

9/1994 – 12/1995      Zivildienst: Deutsches Rotes Kreuz, Sanitätswache, Internationaler Flughafen Hamburg, Terminal 4

## **Studium**

---

4/1996 – 4/1998      Grundstudium: Chemie/Diplom, Universität Hamburg Note: Gut

5/1996 – 8/2001      Hauptstudium: Schwerpunkt, Organische Chemie

8/2001 – 3/2002      Diplomarbeit: „Synthese und Derivatisierung von technischen Symplexmembranen auf Basis nachwachsender Rohstoffe  
Abschluss: Diplom, Note: Sehr gut

4/2002 – 4/2005      Promotion: „Hydrophile makromolekulare Netzwerke“