



universität
wien

DIPLOMARBEIT

**A NOVEL METHOD FOR RAPID AND ACCURATE
QUANTITATIVE CHARACTERIZATION
OF PLGA-/PLA- BASED BIOMATERIALS AND BIOMEDICAL DEVICES**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag^a. pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Michaela Zöchling
Matrikel-Nummer: a0201750
Studienrichtung /Studienzweig A 449 Pharmazie
(lt. Studienblatt):
Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Wien, im Oktober 2009

Wahrhaft Mensch zu sein bedeutet nicht sein Leben nach dem zu bemessen, was man erreicht hat im Bezug auf seine Begierde, sondern nach den kurzen Momenten der Integrität, des Mitgefühls, der Vernunft ja sogar der Selbstaufopferung!
Weil wir letztlich nur die Möglichkeit haben die Bedeutung unseres eigenes Lebens nach unserer Wertschätzung des Lebens Anderer zu bemessen!

Francois Lacombe

Zu allererst gilt mein Dank meinem Gott und Vater, der mich treu auf Seinen Wegen führt und meinem Herrn Jesus Christus, der mich durch Seine Liebe am Kreuz errettet hat.

Ich danke Ao. Univ.-Prof. Franz Gabor für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes, für die großzügige Laborausstattung, sowie für seine fachkompetente Betreuung. Danke, Franz, für die freundliche Aufnahme am Institut und dass Du jederzeit um meine Anliegen bemüht warst!

Meinem Co-Betreuer und Kurzzeit-Chef Lukas danke ich für die intensive Betreuung und Beratung bei diversen Problemen, oft trotz Zeitmangel, und dass er bei allen Schwierigkeiten im Zuge dieser Arbeit nie den Humor verlor.

Ich danke Ao. Univ.-Prof. Michael Wirth für die Unterstützung bei diversen Diskussionen und natürlich all meinen Kollegen/innen vom Institut (Fif, Vera, Maus, Verena, Gerda, Claudia, Lisa und Nadine) für die freundschaftliche Umgebung, für alle Scherze und für eine unvergessliche Arbeitszeit.

Vor allem danke ich meinen Eltern, insbesondere meinem Vater, die mir dieses Studium ermöglichten und mich in jeder Hinsicht unterstützten. Meiner lieben Omi danke ich für ihre Geduld und ihren Beistand während meiner gesamten Studienzzeit. Ich liebe dich!

Besonders danke ich Juschab, der mir jederzeit Ratgeber und Helfer war. Meiner lieben Adina danke ich für die wundervolle Studienzzeit und die freundschaftliche Unterstützung. Und ich danke natürlich meinen Geschwistern, Andi, Bine, Dani, El, Michi, Michael, Sasan, Sylvia und Tommy, die immer für mich da sind.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	11
1.1 Nanotechnologie in der Pharmazeutischen Technologie	11
1.1.1 Nanopartikuläre Delivery- und Targetingsysteme	12
1.1.2 Oberflächenmodifikation	13
1.1.3 Probleme und Grenzen	14
1.2 Polymere zur Herstellung von Arzneistoff-hältigen Nanopartikeln	15
1.2.1 Poly-Lactic-co-Glycolic-Acid (PLGA)	17
1.2.2 Bioabbau von PLGA-Partikeln	19
Erosion	20
Degradation	21
1.3 Problemstellung	22
2. VERFÜGBARE LITERATURDATEN ZU HYDROLYSE UND ANALYTIK VON PLGA	25
3. PUBLIKATION:	29
A NOVEL METHOD FOR RAPID AND ACCURATE QUANTITATIVE CHARACTERIZATION OF PLGA-/PLA- BASED BIOMATERIALS AND BIOMEDICAL DEVICES	
3.1 Abstract	31

4. INTRODUCTION	33
5. MATERIALS AND METHODS	37
5.1 Materials	37
5.2 Sample preparation	37
5.2.1 Preparation of standard solutions	37
5.2.2 Lyophilization	38
5.2.3 Hydrolysis of PLGA Polymers	38
5.2.4 Derivatization of lactic- and glycolic acid	39
5.2.5 HPLC Analysis	39
6. RESULTS	41
6.1 Hydrolysis of non-grafted PLGA Polymer and nanoparticles	42
6.2 Derivatization of the monomeric acids	44
6.2.1 Catalysts for derivatization	46
6.3 HPLC analysis and reproducibility	48
6.4 Analytical application	51
7. DISCUSSION	53
7.1 Hydrolysis of PLGA and PLGA-based nanoparticles	53
7.2 Derivatization of monomeric acids	55
7.3 HPLC analysis and reproducibility	57
7.4 Analytical application	59
8. CONCLUSION	61
9. REFERENCES	63
ZUSAMMENFASSUNG	65
LITERATURVERZEICHNIS	67
CURRICULUM VITAE	69

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Nanotechnologie in der Pharmazeutischen Technologie

Viele Bereiche der naturwissenschaftlichen Forschung befinden sich derzeit in einer Phase der „Konzentration auf das Kleine“, der aufblühende Sektor der Nanotechnologie wird in immer größerem Ausmaß erschlossen und bringt frische Impulse für nahezu alle Sparten der modernen Wissenschaft. Altbekannte Materialien besitzen im Nanometermaßstab neue, der Größenskala inhärente Eigenschaften und ermöglichen so neue Ansatzmöglichkeiten zur Lösung bisher kaum fassbarer Problemstellungen.

Die speziellen Eigenschaften der Nanopartikel basieren einerseits auf der geometrischen Größe und andererseits auf den materialspezifischen Besonderheiten von Nanostrukturen. Beim Übergang auf die Nanometerskala treten die Oberflächen- und Grenzflächeneigenschaften gegenüber den Volumeneigenschaften des Materials immer mehr in den Vordergrund.

Die Bewältigung vormalig schwieriger Problemstellungen in den Bereichen Diagnostik, Chirurgie, sowie bei der Entwicklung pharmazeutischer Arzneistoffträger- und Freisetzungssysteme, sind wesentliche Potenziale der Nanotechnologie.

1.1.1 Nanopartikuläre Delivery- und Targetingsysteme

Jene Bereiche, welche stark von diesen Innovationen profitieren, sind die Pharmazie und Medizin, wo durch die Entwicklung nanopartikulärer Arzneistoffträger neue Wege zum Targeting erkrankter Gewebe und zur Anwendung stabilitätslimitierter, neuer Wirkstoffe wie siRNA, DNA und Proteinen offenstehen. Weiters sind die Optimierung von Analyseverfahren in der Diagnostik sowie die Fertigung medizinischer Implantate als Anwendungsperspektiven zu nennen.

In der pharmazeutisch-technologischen Forschung besteht großer Bedarf an Arzneistoffträgern, welche biologische Wirkstoffe effizient zu ihrem Ziel transportieren, da aus herkömmlichen Darreichungsformen letztlich nur ein Teil des inkorporierten Arzneistoffs den gewünschten Wirkort erreicht, die unspezifische Verteilung im Körper jedoch Nebenwirkungen hervorrufen kann. Auf Grund ihrer Größe können Nanopartikel bisher schwer überwindbare biologische Barrieren, wie Zellmembranen, passieren und stellen daher hervorragende „Fähren“ dar, mit deren Hilfe Arzneistoffe präzise an ihr Ziel im menschlichen Körper transportiert, dort kontrolliert abgegeben und wirksam werden können, wie beispielsweise zur Therapie von Tumoren: Da die Endothelschicht der Gefäße im Bereich eines Tumorgewebes größere Zellzwischenräume aufweist als bei gesunden Blutgefäßen und die Basalmembran Fenestratio- nen besitzt, durchqueren arzneistoffhaltige Nanopartikel dieses fenestrierte Endothel bevorzugt und können so spezifisch in Tumorgeweben angereichert werden.

Eine weitere Anwendung nanotechnologischer Arzneistoffträger besteht im Controlled Drug-Delivery, wo biologisch wirksame Substanzen über definierte Zeiträume von bis zu mehreren Monaten im Organismus dosiert freigesetzt werden können.

Deshalb sind Nanopartikel aus biologisch abbaubaren Polymeren als Arzneistoffträgersysteme Gegenstand intensiver Forschungen. Im Zentrum der Entwicklung neuer nanopartikulärer Arzneimittel steht eine optimierte Therapie mit erhöhter Wirksamkeit bei gleichzeitiger Minimierung der Nebenwirkungen, was durch eine möglichst auf das zu therapierende Gewebe beschränkte Wirkstoffverteilung und -abgabe erreicht wird.

1.1.2 Oberflächenmodifikation

Ein entscheidender Vorteil, der Nanopartikel für die pharmazeutische Forschung besonders attraktiv macht, liegt in der enormen spezifischen Oberfläche im Verhältnis zum Volumen, die mit abnehmendem Partikeldurchmesser zunimmt und so auch die Basis für äußerst effiziente Oberflächenmodifikationen bildet.

Nach Eintreten in den Blutkreislauf werden Nanopartikel aus körperfremdem Material durch Zellen des Immunsystems rasch aus der Blutzirkulation entfernt. Diese physiologische Clearance stellt einen Vorteil dar, wenn der adsorbierte oder inkorporierte Arzneistoff gezielt in die phagozytierenden Zellen des Immunsystems transportiert und dort angereichert werden soll, wie etwa bei Infektionen oder zur Immunisierung. Bei allen anderen Therapie-Ansätzen wird der Arzneistoffträger jedoch zu rasch aus der Zirkulation entfernt, was eine zu kurze Verweildauer im Blut und damit einer verringerten Wirksamkeit des Arzneimittels bewirkt.

Eine Modifikation der Partikeloberfläche kann eine zielgerichtete Adressierung in spezifische Gewebe (aktives Drug-Targeting) und einen Schutz vor einer frühzeitigen Elimination durch das Immunsystem bewirken. Vorrangige Motivation zur Oberflä-

chenmodifikation ist die Unterbindung der Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit gesunden Gewebezellen oder Phagozyten. Dies kann durch unspezifische oder spezifische Modifikation erreicht werden.

Eine unspezifische, der Nanopartikel-Oberfläche inhärente Eigenschaft bildet hierbei die chemische Beschaffenheit der Trägerpolymere, wie Hydrophobizität, Ladungsverteilung und -dichte, sowie die Art und Anzahl der funktionellen Gruppen. Ein „Coating“ der Nanopartikel mit Oberflächenstrukturen wie hydrophilem Polyethylenglykol (PEG) als spezifischem Schutz, bewirkt durch Unterbindung hydrophober Wechselwirkungen eine sterische Behinderung der Anlagerung von körpereigenen Proteinen (Opsoninen), die das Andocken der Phagozyten an die Partikel erleichtern („Stealth“-Technologie). Zum zielgerichteten Transport findet auch Weizenkeim-Agglutinin (Wheat germ agglutinin - WGA) im Bereich des Glykotargeting Anwendung. WGA gehört als zuckerbindendes Protein zur Gruppe der Lektine. Seine Bindung an die Hülle von Nanopartikeln kann eine Internalisierung bewirken und so unerwünschte Interaktionen mit Nicht-Zielzellen minimieren.

Um die gezielte Akkumulation wirkstoffhaltiger Nanopartikel weiter zu erhöhen, kann die Matrix mit hoch affinen Erkennungsdomänen ausgestattet werden. Dazu können beispielsweise Aptamere oder Antikörper-Fragmente als Liganden eingesetzt werden.

1.1.3 Probleme und Grenzen

Trotz großer Euphorie über Nanopartikel muss angemerkt werden, dass viele Bereiche dieses zukunftssträchtigen Gebiets der Wissenschaft noch weitgehend uner-

forscht sind. Wenngleich die Nanotechnologie im anorganischen Bereich der Physik und Materialwissenschaften rasante Erfolge und wissenschaftlichen Fortschritt entfaltet, wird erst seit Kurzem daran gearbeitet, das Potential auf biologischem Gebiet auszuloten.

Generelle Probleme im biologischen Bereich bestehen vor allem in der frühzeitigen Clearance, d.h. in der raschen Inaktivierung und kurzen Verweildauer der Nanopartikel im Blut, sodass eine entsprechende Oberflächenfunktionalisierung unentbehrlich ist. Zusätzlich erschweren die geringe Beladbarkeit mit Wirkstoff und die teilweise mangelnde Stabilität die Anwendung. Letztlich zeichnen sich im Scale-up, auf Grund der aufwändigen Produktion und mangelnden Kenntnis von Verfahrenstechniken im Industriemaßstab, etliche Erschwernisse ab.

Trotz intensiver Forschungstätigkeit konnten bisher vergleichsweise wenige Präparate Marktreife erlangen, nicht zuletzt weil herkömmliche Analysenmethoden zur Charakterisierung und Untersuchung solcher Arzneistoffsysteme in derart kleinen Größenordnungen an ihre Grenzen stoßen.

1.2 Polymere zur Herstellung von Arzneistoff-hältigen Nanopartikeln

Biokompatibilität, die Verträglichkeit des Polymers mit dem menschlichen Organismus, und Bioabbaubarkeit, die vollständige Degradation der Partikelmatrix zu auss-

cheidbaren, ungiftigen Substanzen, stellt eine Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit von Materialien in Form von Nanopartikeln im Menschen dar.

Die am intensivsten untersuchte Matrix zur Herstellung von Depotarzneiformen ist Polymilchsäure (Poly Lactic Acid, PLA), welche auf Grund der hervorragenden Akzeptanz und vollständigem Abbau im menschlichen Organismus bevorzugt zu chirurgischen Zwecken, für Prothesen oder Implantate, aber auch als Arzneistoffträger eingesetzt wird. Diese Polymere zeichnen sich durch eine exzellente Biokompatibilität [1] und eine steuerbare Abbaurate ohne toxische Nebenwirkungen aus [2].

Neben der Milchsäure kommt auch die endogen vorkommende Glykolsäure (Glycolic Acid, GA) als Monomerbaustein für Polymere zur Anwendung. Diese Glykolsäureanteile in der Polymerkette bewirken eine erhöhte Hydrophilie des Polymers und damit eine raschere Freisetzung im wässrigen Milieu infolge unspezifischer Hydrolyse. Durch Co-Polymerisation der beiden Grundbausteine entsteht Poly-[Lactic-co-Glycolic]-Acid (PLGA), sodass je nach Anteil der beiden monomeren Säuren Matrices mit unterschiedlichem Freisetzungsverhalten resultieren.

Die angeführten Resomere® der Firma Boehringer Ingelheim und deren Zusammensetzung (Tabelle 1) stellen einen Auszug kommerziell verfügbarer Polymere dar. Reine Milchsäurepolymere (Resomer® L und LR) sind infolge ihrer hohen Hydrophobizität durch einen stark verzögerten Abbau von bis zu einigen Jahren charakterisiert. Als Arzneistoffträgersysteme und –depots mit rascherer Freisetzungskinetik werden daher Polymere mit Glykolsäureanteil eingesetzt (Resomer® LG und RG).

Neben den Polymeren aus (D,L)-Milchsäure und Glykolsäure sind auch noch eine Vielzahl anderer Polymere und Copolymere verfügbar. Gebräuchlich sind Copolymerisate aus (D,L)-Milchsäure und ϵ -Caprolacton (Resomer® LC) oder Chitosan.

RESOMERBEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG	VERHÄLTNIS
RESOMER® L 202 S	Poly (D,L-Lactide)	
RESOMER® LR 708	Poly(L-Lactide-co-D,L-lactide)	70:30
RESOMER® LG 855 S	Poly(L-Lactide-co-Glycolide)	85:15
RESOMER® RG 858 S	Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide)	85:15
RESOMER® RG 755 S	Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide)	75:25
RESOMER® RG 502 H	Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide)	50:50
RESOMER® RG 503 H	Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide)	50:50
RESOMER® LC 703 S	Poly (L-Lactide-co- ϵ -Caprolactone)	70:30

Tabelle 1: Auswahl kommerziell verfügbarer Polymere (Resomere®) der Firma Boehringer Ingelheim und deren Zusammensetzung

1.2.1 Poly-Lactic-co-Glycolic-Acid (PLGA)

Das Copolymer PLGA wird mittels Ringöffnungspolymerisation aus zyklischen Diestern der Monomere (Glykolid und D- bzw. L-Lactid) hergestellt, wobei als Katalysatoren Metalloxide und verschiedene Salze zum Einsatz kommen.

Das molare Verhältnis der eingesetzten Monomere bestimmt die Zusammensetzung des Polymers und damit die Hydrophobizität, das Löslichkeitsverhalten sowie in Folge auch die Wirkstoffliberation bei Einsatz als Arzneiform.

Bei der Synthese ergibt sich allerdings die Schwierigkeit, dass beide Monomere unterschiedliche Co-Polymerisationsraten besitzen. Demzufolge besitzt eine PLGA Po-

lymerkette zwar ein definiertes Verhältnis von Glykol- zu D,L-Milchsäure, die genaue Abfolge der Monomere bzw. der Monomerblöcke in der Polymerkette kann jedoch nicht beeinflusst werden. Daher entstehen sogenannte Block-Sequenzen aus Milch- bzw. Glykolsäure, wobei Glykolsäureblöcke aufgrund der relativ höheren Hydrophilie rascher hydrolysiert werden als Milchsäureblöcke [3]. Insgesamt stellt PLGA ein eher hydrophobes Polymer dar, sodass zur Verarbeitung der Matrix zu Arzneiformen unpolare organische Lösungsmittel wie Aceton, Acetonitril, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Ethylacetat eingesetzt werden.

Alle PLGA Typen haben amorphe Struktur und besitzen eine Glasübergangstemperatur von 40-50°C sowie einen Schmelzpunkt bei etwa 200°C.

Die Voraussetzung zum Einsatz von PLGA-Arzneiformen im Targeting stellt die Möglichkeit der Oberflächenmodifikation durch spezifische Endgruppen an den Polymerketten dar, die durch die Wahl des Kettenabbruchreagenz während des Polymerisationsvorganges bestimmt werden. Tabelle 2 zeigt eine Auflistung der typischen Endgruppen mit Bezeichnungen der Firma Boehringer Ingelheim.

TYPBEZEICHNUNG	ENDGRUPPE
“H” (z.B.: RG 503 H)	freie Carboxylgruppe
“S” (z.B.: RG 752 S)	Alkylrest
“ “ (z.B.: RG 502)	Alkylrest und freie Carboxylgruppen

Tabelle 2: Liste der üblichen Endgruppen von PLGA-Polymeren mit Bezeichnungen der Firma Boehringer Ingelheim

Während der Zusatz von Milchsäure als Kettenabbruchreagenz zur Bildung freier Carboxylgruppen führt, bewirkt ein Polymerisationsabbruch durch Milchsäureester

die Bildung von endständigen Alkylestern. Dementsprechend zeichnen sich die Polymere der „H“-Reihe durch eine große Anzahl frei zugänglicher, derivatisierbarer Carboxylgruppen aus und dienen als Ankerpunkte für die Immobilisierung an der Oberfläche der PLGA-Partikel.

1.2.2 Bioabbau von PLGA-Partikeln

Ein profundes physikalisch-chemisches Verständnis des Polymerabbaus ist als Schlüssel zur Verbesserung von Löslichkeit, Stabilität, Wirkstofffreisetzung und Oberflächenmodifikation von eminenter Bedeutung. Trotz zahlreicher in-vitro wie auch in-vivo Studien ist der Prozess des Polymerabbaus nicht zur Gänze bekannt, da erhebliche Unterschiede im Abbaumechanismus verschiedener Polymere existieren [3]. Dennoch kann ein allgemein gültiger Grundmechanismus beschrieben werden: Durch den Wassereintritt in das Polymer, begleitet von einer Quellung der Matrix, wird der Abbau eingeleitet, wobei Oligomere wie auch Monomere allmählich freigesetzt werden [4]. Mit fortschreitender Zersetzung ändert sich die Mikrostruktur des Polymers durch zunehmende Porenbildung sowie der pH Wert der Umgebung aufgrund der Freisetzung von löslichen oligo- und monomeren Säuren. Letztere katalysiert den weiteren Abbau bis schließlich alle Monomere gelöst, resorbiert und schließlich metabolisiert werden [5-7].

Die abgebaute Glykolsäure wird im Organismus weiter zu Glycin metabolisiert, während die im Körper ubiquitär vorkommende L-Milchsäure weitgehend über den Citratzyklus eliminiert wird. D-Milchsäure dagegen wird auch unverändert ausgeschieden [4].

Beim Abbaumechanismus selbst wird zwischen Erosion und Degradation unterschieden. Der Überbegriff Polymerzerfall oder Erosion bezeichnet allgemein das Abtragen von größeren Polymerteilen. Andererseits veranschaulicht Degradation den spezifischen Vorgang der Spaltung von Esterbindungen, wodurch zunächst Oligomere und schließlich Monomere entstehen [4, 5].

Erosion

Polymererosion wird durch Faktoren, wie Diffusion von Wasser und Quellung, Temperatur und pH-Milieu, Löslichkeit der Monomere, sowie Größe und Beschaffenheit des Polymers beeinflusst, wobei auch die Degradation eine Rolle spielt [5].

Eine Unterteilung in Bulk- und Oberflächenerosion (Abbildung 1) kann getroffen werden, wobei sich beide Arten auf unterschiedliche Polymere verschiedenartig auswirken. Oberflächenhydrolyse ist charakterisiert durch Erodieren der endständig gebundenen Monomere bzw. Oligomere, wobei Quellungsvorgänge eine untergeordnete Rolle spielen. Polymere, die diesem Zerfallsmechanismus unterliegen, zeichnen sich durch eine genauere Vorhersagbarkeit des Erosionsprozesses aus, da das Molekül lediglich Teile der Oberfläche kontinuierlich verliert, seine ursprüngliche Form aber beibehält. Hingegen wird der Prozess des Abtragens bzw. Ausbrechens größerer Molekülteile durch Wassereintritt in die Matrix und deren Quellung als Bulkerosion bezeichnet [5, 6].

Wie einige neuere Studienergebnisse belegen, erfolgt der Zerfall von PLGA vorwiegend durch Bulk Erosion [5, 7].

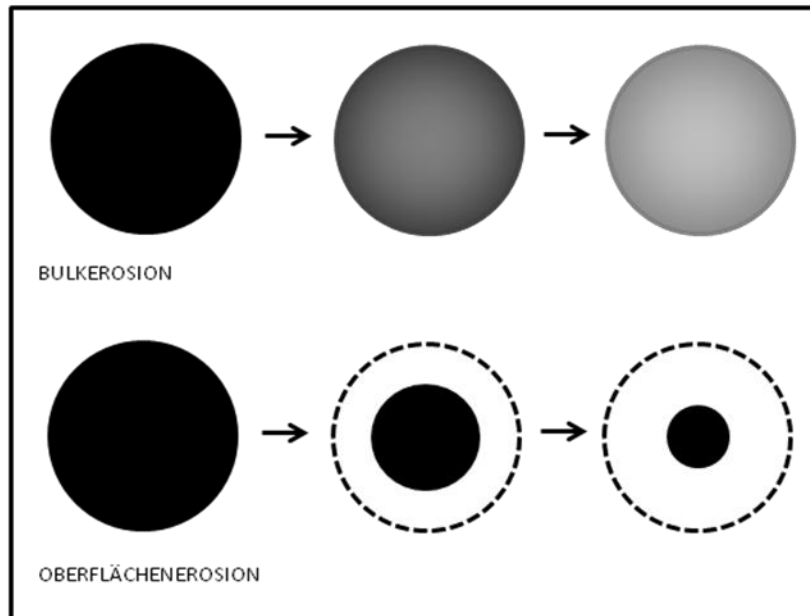


Abbildung 1: Erosionsschemata modifiziert nach Göpferich [5] und Witschke [4].
 Schematische Darstellung des Erosionsprozesses von Polymeren, wobei zwischen Bulkerosion und Oberflächenerosion unterschieden wird.

Degradation

Polymerdegradation stellt einen chemisch, mechanisch oder thermisch verursachten Prozess dar. Der wichtigste in-vitro, aber auch in-vivo Mechanismus ist der chemische Abbau durch Hydrolyse [6], wobei die hydrolytische Zersetzung durch biologische Einwirkung, wie Wassereintritt und pH-Milieu, im Organismus als Biodegradation bezeichnet wird [5].

Der hydrolytische Abbau von PLGA erfolgt durch Spaltung der Esterbindungen bevorzugt an Glykolsäure-Blöcken [6], was vermutlich auf die hydrophileren Eigenschaften der Glykolsäure zurückzuführen ist. Zusätzlich erschwert die sterische Abschirmung der Alkylgruppe im Milchsäurebereich die Zugänglichkeit für Wasser [6, 8, 9]. Grundsätzlich steigt die Abbaugeschwindigkeit mit sinkendem Molekulargewicht, erhöhtem Glykolsäureanteil, erhöhter Temperatur, pH-Änderungen jenseits des neut-

ralen Bereiches und Verwendung amorpher an Stelle von kristallinen Polymeren [4, 5, 7, 10, 11].

PLGA wird in-vivo je nach Milchsäuregehalt im wässrigen Milieu innerhalb von Tagen bis Monaten hydrolysiert. In-vitro kann die Hydrolyse durch Stressbedingungen wesentlich beschleunigt werden. Relevant sind hier vor allem Verschiebungen des pH-Wertes in den sauren bzw. basischen Bereich sowie eine Temperaturerhöhung [10] über die Glasübergangstemperatur [12]. Bei einer Hydrolyse im Sauren ist, nach erfolgter Spaltung, bedingt durch den Reaktionsmechanismus eine Re-Polymerisation möglich [7], während die alkalische Hydrolyse ausschließlich zur Bildung der Monomeren führt.

Eine Erhöhung der in-vivo Abbaurate des Polymers durch Enzyme wird in der Literatur erwähnt [4]. Im Rahmen dieser Arbeit werden Enzyme auf Grund der zusätzlichen Proteinbelastung der Proben und der zusätzlichen Kosten nicht eingesetzt.

1.3 Problemstellung

Nanopartikel und Mikropartikel aus PLGA besitzen einen hohen Stellenwert in der pharmazeutisch-technologischen Forschung als innovative Arzneiformen. Um diese Arzneistoffträger jedoch genau charakterisieren zu können, ist die Bestimmung des Gehaltes an Polymer eine unabdingbare Voraussetzung. Sowohl zur Optimierung

der unterschiedlichen Herstellungsmethoden der kolloidalen Arzneiformen, aber auch zur Beschreibung und Evaluierung von Techniken zur Oberflächenfunktionalisierung ist die Kenntnis des Polymergehaltes der Partikelsuspensionen notwendig. Zusätzlich ist eine quantitative Beschreibung der Partikel-Zell Interaktion und damit eine Abschätzung des ex-vivo bzw. in-vivo-Verhaltens der funktionalisierten kolloidalen Arzneiformen nur unter Berücksichtigung der eingesetzten Partikelmenge möglich. Darüber hinaus ist eine verlässliche Konzentrationsbestimmung des Polymers zur Untersuchung des Abbauverhaltens von PLGA-Partikeln von grundlegender Bedeutung.

Die Quantifizierung der Partikelmatrix beschränkt sich nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft auf einige wenige Methoden, wie die Bestimmung mittels Dialyse, Lyophilisation und Auswägen von Partikelpräparationen. Trotz Entfernung von Hilfsstoffen zur Partikelherstellung und Stabilisatoren durch Dialyse führt diese Methode bestenfalls zu semiquantitativen und wenig verlässlichen Ergebnissen mit hoher Standardabweichung. Aufwändigere Methoden, wie die Massenspektroskopie (MS) oder die gelegentlich verwendete Magnetresonanzspektroskopie (NMR) sind wiederum im apparativen Aufwand und Probenvorbereitung aufwändig und daher eher nicht für den Routinebetrieb geeignet.

Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit unter Berücksichtigung bereits vorhandener Literaturdaten eine analytische Methode etabliert werden, um Polymere aus Milch- und Glykolsäure sowie daraus hergestellte kolloidale Arzneistoffträger quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Das Ziel ist ein standardisierbares Verfahren mit für die Routineanalytik geeignetem Zeitaufwand, geringen Kosten und einfachem Handling zu entwickeln. Dabei wird besonderes Augenmerk auf eine vollständige und rasche

Hydrolyse sowie eine reproduzierbare und rasche Analysentechnik gelegt, um die zu entwickelnde Methode universell zur Quantifizierung der Monomere einsetzen zu können. Wie die Ergebnisse von vorangegangenen Arbeiten zeigen, ist eine kolorimetrische Bestimmung der monomeren Säuren nach Umsetzung mit Metallsalzen mangelhaft reproduzierbar, die enzymatische Analyse von Milch- und Glykolsäure teuer, zeitaufwändig und für den beabsichtigten Zweck zu ungenau. Daher sollte, basierend auf bereits vorhandener Literatur zu Hydrolyse von PLGA und HPLC-Analyse der Monomeren, eine reproduzierbare Quantifizierungsmethode erarbeitet werden, die zur Quantifizierung sowohl von nicht-modifizierten PLGA-Kolloiden als auch von Oberflächen-funktionalisierten PLGA-Partikeln geeignet ist. Dabei bietet die beabsichtigte Anwendung einer HPLC-Methode den weiteren Vorteil, gleichzeitig eine Aufreinigung bzw. Abtrennung von Liganden und weiteren Störfaktoren zu ermöglichen, sodass sowohl in-vitro, als auch in-vivo Proben in naher Zukunft analysiert werden können.

2. Verfügbare Literaturdaten zu Hydrolyse und Analytik von PLGA

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bietet gute Möglichkeiten zu einer simplen, aber dennoch hochsensitiven Analytik und wurde bereits vielfach zur Untersuchung bioabbaubarer Polymere eingesetzt.

Existierende HPLC-Methoden zur Erfassung niedermolekularer Säuren konzentrieren sich bisher auf die direkte Detektion bei 210nm, einer Wellenlänge an der Grenze zu den Absorptionsmaxima vieler herkömmlich verwendeter Fließmittel. Daraus resultiert eine Erhöhung des Grundrauschens, eine Abnahme der Empfindlichkeit und ein schlechtes Signal-to-Noise-Verhältnis [9]. Bei 210 nm analysierten Marcato *et al.*, [19] Abbauprodukte von Poly(α -hydroxysäuren) nach 12-stündiger Hydrolyse durch Erhitzen in Wasser und anschließender Detektion underivatisierter Säuren.

Zu dem in dieser Arbeit beabsichtigten Veresterungsverfahren zur kolorimetrischen Detektion von Milch- und Glykolsäure nach Hydrolyse des Polymers sind bisher die Bestimmung freier Fettsäuren [13, 14] und Dicarbonsäuren [15 - 18] beschrieben, da diese eine wichtige Rolle im humanen Organismus spielen. Die Analyse von Glykol- und Milchsäure beschränkt sich bisher auf zwei veröffentlichte Studien [9, 19], die nur teilweise Lösungen zu bei standardisierten Verfahren auftretenden Problemen bieten.

Die von Ding und Schwendeman [9] beschriebene analytische Methode zur Charakterisierung wasserlöslicher, di- und oligomerer Säurederivate nach Abbau von PLGA bildete das Fundament zur Derivatisierung der freigesetzten Monomere in dieser Studie. Diese HPLC Analytik beschreibt die Derivatisierung wasserlöslicher

Abbauprodukte aus PLGA-Filmen mit *p*-Bromphenacylbromid (*p*-BPB), wobei Triethanolamin (TEA) als Katalysator Verwendung findet. Die veresterten Spaltprodukte polymerer Filme wurden durch Umkehrphasen Chromatographie aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 254 nm quantifiziert. Der Hydrolyse des Polymerfilms erfolgt jedoch durch eine 6-wöchige Inkubation in Phosphatpuffer pH 7,4 und war damit äußerst zeitaufwendig. Außerdem wurde in dieser Arbeit vorwiegend das Mikroklima in PLGA-Filmen untersucht und kein vollständiger Abbau zu den Monomeren durchgeführt.

Eine von Durst *et al.*, [14] entwickelte Derivatisierung von C₂-C₂₀ Fettsäuren mit Hilfe von Kronenether als Katalysator bildete die Grundlage für weitere, ähnliche Studien [15, 16, 17]. Der Kronenether bietet den Vorteil, dass er im Vergleich zu anderen Katalysatoren nicht im Überschuss eingesetzt werden muss. Weiters stört die Anwesenheit kleiner Mengen von Wasser die Derivatisierung nicht. Bei dieser Methode wird zwar keine Hydrolyse vor der HPLC-Analytik durchgeführt, jedoch im Falle einer Hydrolyse die Neutralisation bis zum Phenolphthalein-Umschlagspunkt vor der Umesterung empfohlen. Infolge der Selektivität der Kronenether für Metallionen, insbesondere für Kalium- und Ammonium-Ionen, wurde bei der Evaluierung dieser Methode eine starke pH-Abhängigkeit festgestellt. Die Derivatisierung erfordert einen pH-Bereich von 7.0 – 9.5, sodass die eine Rückstellung des pH-Wertes vor der HPLC-Analyse unumgänglich ist.

Im einer Arbeit von Grushka *et al.* [18] zur Auftrennung und Detektion biologisch wichtiger Dicarbonsäuren wurde die von Durst *et al.* [14] beschriebene

Alkylierungsmethode mittels Kronenether eingesetzt, jedoch lediglich die Derivatisierung ohne vorhergehende Extraktion der Säuren beschrieben.

Sarkar *et al.* [15] quantifizierten aliphatische und aromatische Dicarbonsäuren nach Hydrolyse aus Kohlenhydratpolymeren durch Erhitzen in Ammoniumhydroxid und nachfolgende Derivatisierung mit *p*-BPB und Triethanolamin. Aufgrund des flüchtigen Ammoniumhydroxyds resultierte ein 1:1 Verhältnis der dissoziierten Säuren zum Ammonium-Kation, womit eine Überladung mit Metallionen bei der Umsetzung verhindert werden sollte.

Zur Optimierung der HPLC-Analyse zur Bestimmung von freien Fettsäuren im Pikomolbereich extrahierte Püttmann *et al.* [13] die Proben mit Dole's Reagenz (Isopropanol, Heptan und Phosphorsäure). Die anschließende Derivatisierung erfolgte mit *p*-BPB und Kronenether.

Bei der quantitativen Bestimmung einiger Säuren des Shikimisäureweges, unter anderen auch Glykolsäure, wurde Kaliumfluorid als Derivatisierungskatalysator eingesetzt, um vor allem den Gehalt an Chinasäure in Pflanzenmaterial zu erfassen [16].

Eine Schwierigkeit bei der Anwendung dieser Erkenntnisse auf die vorliegende Arbeit war die primär notwendige wässrige Hydrolyse des Polymers und die nachfolgende Anpassung an die Derivatisierung im apolaren Milieu. Außerdem wurde bei den bisherigen Derivatisierungsmethoden in einer anderen Größenskala gearbeitet,

sodass die Analysebedingungen an kleinste Maßstäbe angepasst werden mussten. Zudem sind die in der Literatur beschriebenen Studien mit Proben deutlich unterschiedlicher Löslichkeit, vor allem mit lipidlöslichen langkettigen Fettsäuren durchgeführt worden.

3. Publikation

Ich erkläre, dass ich im Rahmen meiner Diplomarbeit massgeblich, insbesondere zur experimentellen Arbeit und der Interpretation der Daten, zu diesem Manuskript beigetragen habe.

A NOVEL METHOD FOR RAPID AND ACCURATE QUANTITATIVE CHARACTERIZATION OF PLGA-/PLA- BASED BIOMATERIALS AND BIOMEDICAL DEVICES

To be submitted to Biomaterials.

Lukas Neutsch, Michaela Zöchling, Michael Wirth, Franz Gabor

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Life
Sciences, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

Corresponding author: Franz Gabor

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics

Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria

Email: franz.gabor@univie.ac.at Phone: (+43)-1-4277-55406

3.1 Abstract

One of the most promising concepts in the upcoming era of nanomedicine is the controlled and site specific delivery of highly potent drugs via small sized colloidal carriers, among which micro- or nanoparticles made of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) take an outstanding role. However, the development of particulate drug delivery formulations is still hampered by a lack of accurate and convenient methods for the quantification of particle matrix in solution, which is essentially required to determine exact yields, evaluate preparation protocols and adjust the concentration of particle solution for subsequent modification or bioassays.

It was thus the aim of the here presented study to develop a sensitive and rapid method for the quantification of PLGA-/PLA-based biomaterials with particular regard to nanoscale delivery systems. The acquisition of absorption-enhanced bromophenacyl-derivatives of monomeric acids via HPLC after complete hydrolysis allowed for determination of particle concentration without the need for tedious sample workup or purification steps. In contrast to established methods, the optimized protocol does not require inclusion of additional marker molecules and is non-interfering with stabilizers commonly applied for particle preparation. With a linear range from 30µg/ml to 6,5mg/ml PLGA it is of adequate sensitivity for analysis of nanoparticulate drug formulations while being sufficiently fast to enable routine screening of multiple samples during phases of development. Moreover, information on the monomer ratio in the matrix is obtained, which is of direct importance for the degradation process. In principle applicable to all biomaterials made of glycolic and/or lactic acid, the novel method will facilitate research and future development of targeted drug delivery systems and other biomedical devices.

4. Introduction

Today's rapid progress in materials science, nanotechnology and biomedical engineering is about to enable the establishment of striking innovative concepts in medical care, many of which depend on the availability of thoroughly characterized biomaterials with tailored properties. Targeted drug delivery, tissue engineering and several other applications take advantage of matrices that not only serve as an inert mechanic support or carrier but exhibit bioactive functional behavior with respect to their structure and surface configuration. Next to basic issues of safety and biocompatibility, such matrices need to offer possibility for fine adjustment of physicochemical properties, covalent surface immobilization of biomolecules and – in case of drug carrier devices – a tunable rate of degradation.

Among the most important classes of biomaterials meeting these demands are polyesters of lactic or glycolic acid and their copolymer poly (lactide-co-glycolic acid) (PLGA), which is approved by the US Federal Drug Administration and already used in several marketed therapeutic devices. Combining the advantages of a tunable degradation rate and the possibility for facile covalent attachment of surface ligands, PLGA is especially suited for the design of targeted drug delivery systems or carriers of imaging markers [1]. In addition, the good processability and versatility in terms of physicochemical modification make it an ideal candidate for use in biotechnological engineering [1, 2]. Various multifunctional PLGA-based copolymers, polymer blends and composites have meanwhile been synthesized to further adjust the material properties to specific demands and to take advantage of biomimetically inspired designs for enhanced *in vivo* performance [3, 4, 5].

The development of nanoparticulate drug delivery systems with PLGA-based carriers is currently subject of intense research and was shown to be highly advantageous over conventional treatment concepts [6]. The protection of labile compounds as well as selective targeting of diseased tissue with lower dosage and higher patient compliance are among the alluring prospects [7]. However, while nanoparticle-aided drug delivery clearly proved its potential in numerous conceptual studies, the manufacturing of respective formulations usually involves complex protocols for particle preparation, purification and surface modification which severely hamper industrial scale-up and automation [1, 8]. Apart from open biological and pharmacokinetic questions it can be attributed to this technological complexity that a major part of the newly developed strategies has not yet advanced beyond the proof-of-concept stage.

An essential prerequisite to promote the future development of biomedically applied nanoparticles is thus given in the need to provide standardized and well characterized protocols throughout the production process, which includes the precise description of reaction parameters, intermediate and end products. Especially for optimizing reaction steps but equally to determine drug loading and ensure final quality control, it is crucial to have knowledge on the exact amount of particle matrix present in the suspension. In research on PLGA-based delivery systems this means being able to (1) quantify the exact yield of the particle preparation protocol, (2) evaluate the efficacy of the washing procedure, (3) adjust the ratio of matrix to ligand molecules when performing covalent surface modifications and (4) set the concentration of particle suspension at a desired value for subsequent *in vitro* or *in vivo* assays. At this it is a problem intrinsically linked to the demand of working in the nanoscale that any analytical description is far more complicated than in larger dimension. The difficulties in this context arise from the fact that low concentrations of polymer particles

in heterogeneous media have to be quantified, often with only a very limited amount of sample solution being available for analysis. Highly sophisticated analysis methods that may be applicable mostly require tedious sample workup and stand in contrast to the need of performing multiple sample runs within reasonable time for routine purposes.

Up to now, quantification of PLGA nanoparticles in suspensions is mostly done either by gravimetric measurement of the dry residue after evaporation or lyophilization or by assessing the concentration of a secondary marker enclosed in the matrix, e.g. a fluorescent dye. However, gravimetric determinations are limited in sensitivity and may be biased by contributions of surfactants or other additives that frequently are included in significant amounts for stabilization. The use of entrapped marker molecules to conclude on polymer concentration requires precise knowledge on the encapsulation efficiency and stability of entrapment. Care has to be taken about possible leaching or quenching effects that are known to occur especially in organic matrices such as PLGA. Furthermore, study design often does not allow for the inclusion of additional marker molecules as this might influence other objects of investigation. With the constantly increasing relevance of PLGA-based formulations for drug delivery and imaging, there is thus a pressing need to find new ways for sensitive and selective determination of particle concentration with reasonable effort.

In this study we present a novel method for the sensitive quantitative assessment of PLGA containing biomaterials, optimized for the investigation of nanoparticulate suspensions. Importantly, the method is based on direct quantification of the chemical matrix components and is neither affected by the presence of stabilizers nor dependent on entrapment of marker molecules. Using HPLC for purification and detection of monomer derivatives with enhanced UV absorption, a protocol sufficiently fast for

routine analysis of multiple samples without tedious preparation work could be established. The versatile analytical approach is applicable for basically all biomedical devices made of lactic acid, glycolic acid or their copolymers and can be carried out without the need for elaborate equipment.

5. Materials and methods

5.1 Materials

Poly (D,L-lactide-co-glycolic) acid 50:50 was purchased from Boehringer Ingelheim (Resomer® RG 503 H), PLGA 75:25 (Resomer® RG 755 S) and 85:15 (Resomer® RG 858 S) were generously provided as a free sample. All polymers were dissolved in acetonitrile before analysis. Glycolic and lactic acid standards, all derivatization agents, such as *p*-bromophenacyl bromide (*p*-BPB), triethanolamine (TEA) and 18-Crown-6, as well as solvents of analytical grade for HPLC analysis were purchased from Sigma Aldrich. Other types of lactic acid, such as DL-lactic acid lithium salt, L(+)-lactic acid pharm. 90% solution PF 90 and Purasorb D,L-lactide, were a gift of Purac Biochem (Gorinchem, Netherlands).

5.2 Sample preparation

5.2.1 Preparation of standard solutions

The standard solutions of bromophenacyl esters of glycolic and lactic acids were prepared by dissolving an adequate amount of the free acids in acetonitrile, adding triethanolamine and *p*-BPB and incubation as described below.

For preparation of the lactic acid standard its lithium salt, sodium salt, a lactic acid solution (90%) and free acid derived from hydrolysis of the linear dimer (D,L-lactide) were examined for compatibility with the derivatization procedure.

5.2.2 Lyophilization

For the removal of water the samples were d after hydrolysis (Christ Loc Alpha 1-4 lyophilizator, Osterode, Germany). After freezing at -80 °C for 30 min, the samples were freeze-dried by reducing the surrounding pressure to < 0,037 mbar (-30 °C) for at least 12 h and subsequent postdrying at -55 °C for about 2 h. The lyophilized samples were diluted with acetonitrile and further treated as described below.

5.2.3 Hydrolysis of PLGA Polymers

A sample aliquot of PLGA Polymer was dissolved in 200 µl acetonitrile in a WHEATON® vial 2.0 mL and filled up to 1mL with 0.1 N aqueous potassium hydroxide solution. The sample was sonicated in an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex Super DK102P, Berlin, Germany) at 50% intensity for 30 min at 30 °C with subsequent heating at 100 °C for 90 min under rigorous stirring. The sample was allowed to cool to room temperature before further processing. The solution was then adjusted with 1 N hydrobromic acid to pH of 4.5 - 5.0 using bromthymol blue.

5.2.4 Derivatization of lactic- and glycolic acid

For derivatization with *p*-BPB in alkaline milieu an aliquot (200 μ L) of the hydrolyzed polymer solution or a solution of the monomeric acids of PLGA was diluted with 800 μ L acetonitrile and 500 μ L of a freshly prepared solution of each, 10 μ M/mL triethylamine and 10 μ M/mL *p*-BPB in acetonitrile. The vial was tightly capped and heated at 80°C for 90 min under stirring. After cooling to room temperature or storage at 4 °C the samples were subjected to HPLC-analysis..

For derivatisation in presence of 18-crown-6 ether, 200 μ L of the sample containing hydrolyzed PLGA or its monomeric acids were diluted with 800 μ L acetonitrile followed by addition of 1mL solution containing 10 μ M/mL *p*-BPB and 1 μ M/mL 18-Crown-6 ether. Since this catalytic agent does not require equimolar concentrations, the derivatization solution with crown-ether was set at a molar ratio of 20:1 with respect to the chromophore. When acid concentration was lower than 0.5 mM, a ratio of 10:1 (*p*BPB:18-Crown-6) proved to be sufficient for quantitative reaction [12]. The derivatization process was done as described above. For the detailed reaction scheme see figure 8 (chapter 7.2).

5.2.5 HPLC Analysis

Lyophilized samples containing insoluble potassium bromide were centrifuged at 5000 rpm for 5 min prior to injection.

The HPLC system (Agilent Technologies 1200 Series) was equipped with an auto-sampler 1100 (20 μ L injection volume), a quaternary HPLC pump and a UV-Diode-Array detector. The column used was a LiChrosphere® 100 RP-18e cartridge packed with 5 μ m material. Agilent Technologies chromatography software was used for data analysis.

The mobile phase consisted of filtered and degassed acetonitrile / water (70/30, v/v) for 4min followed by a linear gradient to 100% acetonitrile up to 10 min. The flow rate was 1.5 mL/min and the absorbance of the eluent was detected at 254 nm. Identification of the analytes in diverse samples was performed by comparing the retention time of the related peaks with those of the corresponding standards that were injected separately. The retention times of derivatized glycolic acid was 1.9 min, that of the lactic acid derivative 2.1 min. Quantification was carried out by integration of the peak areas using an external standard method.

6. Results

The specific processing parameters applied are listed to give an overview and facilitate comparison of the different methods under investigation (Table I).

HYDROLYSIS	DERIVATIZATION
1. Derivatization using <i>p</i>-BPB and triethanolamine as catalyst (ph 3.0 – 5.0)	
a. Sonication > 15min or	
b. Sonication and incubation at 80°C (60-90min) or	
c. Sonication and incubation at 100°C (60-90min)	
	A. Dilution with acetonitrile 1:10 (v/v)
	B. Lyophilization
	C. Rotary evaporation
2. Derivatization using 18-CROWN-6 as catalyst (ph 7.5 - 9.0)	
a. Sonication > 15min or	
b. Sonication and incubation at 80°C (60-90 min) or	
c. Sonication and incubation at 100°C (60-90 min)	
	A. Dilution with acetonitrile 1:10 (v/v)
	B. Lyophilization
	C. Rotary evaporation
Final analytical procedure	
Sonication for 30min and incubation at 100°C for 90min	
	Dilution with acetonitrile 1:10 (v/v) and derivatization with <i>p</i> -BPB/TEA at ph 4.0-5.0 using bromphenol blue

Table 1: Overview of the variation of processing parameters for optimization procedure
Part one gives a review of different steps in the operating procedure.

6.1 Hydrolysis of non-grafted PLGA Polymer and nanoparticles

According to the literature sodium hydroxide represents a suitable agent for hydrolyzing polymers in-vitro [9]. Interestingly, 0.1 N sodium hydroxide revealed a yield being about 65% lower for lactic acid and 80% lower for glycolic acid (figure 1, columns 01-02) as compared to 0.1 N potassium hydroxide mediated hydrolysis.

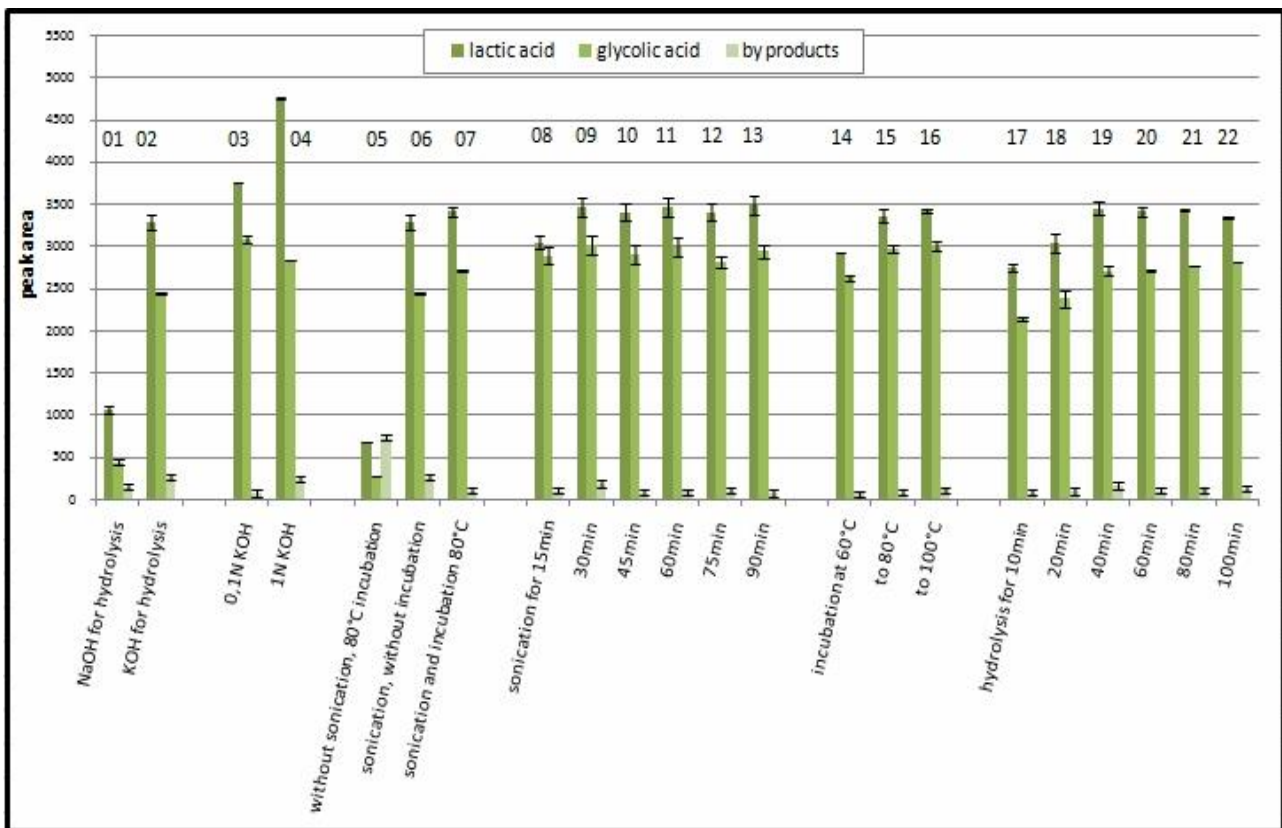


Figure 1: Variation of different parameters during hydrolysis.

Exact procedure according to table I:

1aC (columns 01-02), 2aB (columns 03-04), 1bC (column 05),

1aC (column 06), 1bC (column 07), 1aC (columns 08-22).

Concurrent with increasing the concentration of potassium hydroxide from 0.1 N to 1 N, the detected amount of glycolic acid remained rather constant but that of lactic acid increased by 35% (figure 1, columns 03-04).

Hydrolysis provoked by 1 N hydrobromide solution was not as effective as alkaline hydrolysis. Similarly, ammonium hydroxide [10] was not found to be sufficient, since only a marginal amount of 5-8% of the monomers were detectable.

Experiments comprising dissolution of PLGA in ethyl acetate, addition of an excess of aqueous potassium hydroxide and liquid-liquid extraction to concentrate monomers in the aqueous phase did not reveal a higher yield. Nevertheless, acetonitrile turned out to be the best option to dilute samples of PLGA prior to addition of the hydrolyzing agent.

Apart from choice of the hydrolyzing agents and solvents sonication of the mixture of PLGA solution in acetonitrile and aqueous potassium hydroxide affected the degradation rate considerably. This is indicated by a clear increase of about 80% (lactic acid) and 90% (glycolic acid) for samples sonicated without heating. Furthermore, formation of by-products was reduced by using sonication (figure 1, columns 05-07).

As exceeding the glass transition temperature of PLGA of about 40 °C resulted in precipitation of the polymer and inhibited hydrolysis, the intensity of ultrasound was set to 50% maximum intensity while keeping the temperature below 30 °C by cooling the sample with ice-water. As illustrated by a rather constant amount of detected glycolic and lactic acid (figure 1, columns 8-13), sonication time only marginally influences the hydrolysis rate.

When the samples were heated after sonication, a considerable decrease in detected lactic acid but a minor decrease in glycolic acid was observed yielding a comparable amount of by-products as compared to processing without heating (figure 1, columns 14-16). Nevertheless, increasing the temperature to 100 °C revealed the maximum yield of lactic acid. A further increase in the temperature level only augmented forma-

tion of by-products and did not lead to a significant improvement of the hydrolysis rate.

Although maximum hydrolysis rate of PLGA containing equal amounts of lactic acid and glycolic acid was observed after incubation for 40min (figure 1, columns 17-22), a higher content of lactic acid slowed down the degradation rate. In terms of optimizing the process for PLGA types containing lactic acid in higher ratios, interestingly, the most advantageous effects were observed at 80 °C and the yields of hydrolysis products even remained constant upon setting the temperature to 100 °C.

In attempt to improve the required sample volume, a minimum of 1 mL was found to be necessary to carry out complete hydrolysis. The concentration of acetonitrile in aqueous potassium hydroxide during hydrolysis should be significantly less than 40% to obtain complete polymer hydrolysis.

As described below (chapter 6.4), the abovementioned parameters can also be applied for analyzing nanoparticle suspensions.

6.2 Derivatization of the monomeric acids

As hydrolytic cleavage of PLGA requires aqueous milieu but the derivatization reaction of the acids requires organic solvents, the challenge of this work was to strike a balance without introducing too much water into the aprotic solvent. Therefore, several methods for water removal and evaporation were examined.

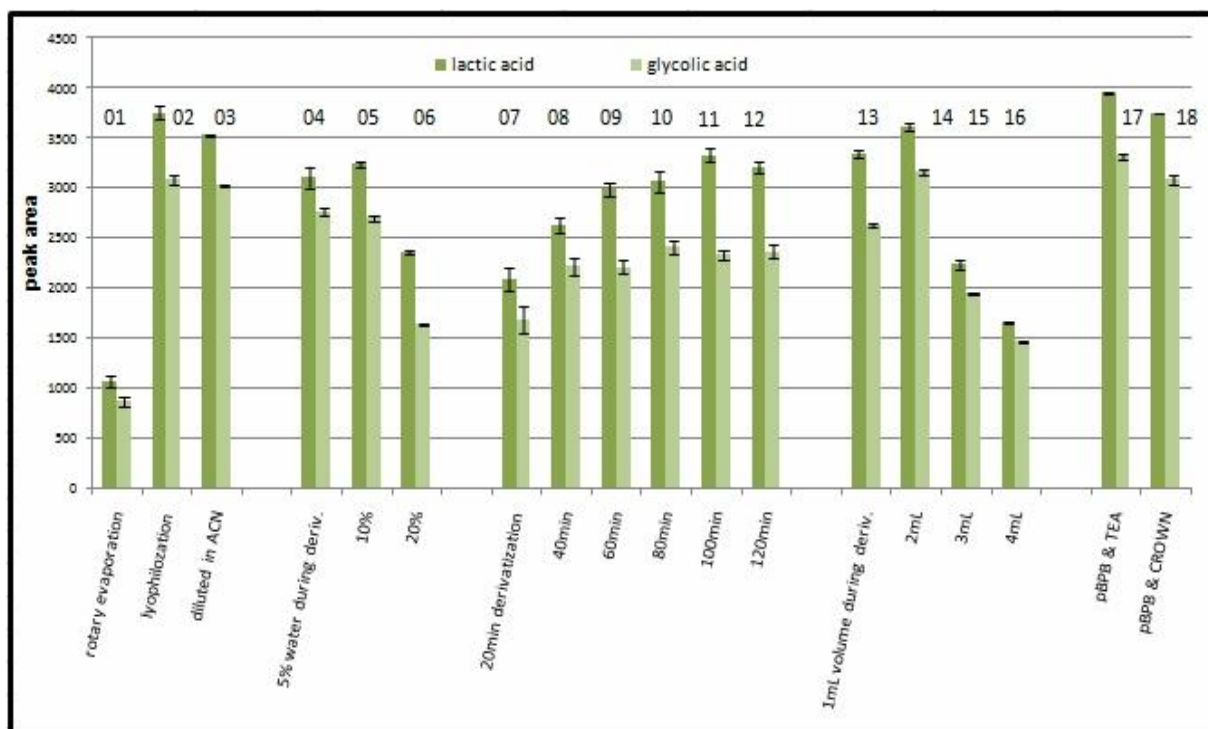


Figure 2: Effect of different parameters on the derivatization process.

Exact procedure according to table I:

2aC (column 01), 2aB (column 02), 1cA (column 03), 1cA (columns 04-16), 1aB (column 17), 2aB (column 18)

Reproducible and constant yields could not be obtained by rotary evaporation, even by sensitive evaporation at a low temperature of 25 °C. (figure 2, column 01). Although the yields of the monomeric acids maximized upon lyophilization (figure 2, column 02) as illustrated by a clear increase in the percentage of detected lactic acid by approximately 70% and of detected glycolic acid of about 75% in comparison to rotary evaporation, repeated tests proved lack of reproducibility, especially when organic solvents were added. Evaporation in nitrogen atmosphere and rotary evaporation yielded comparable results.

As derivatization could be even carried out in presence of a minimal and limited amount of water, the hydrolyzed sample was simply diluted with excessive acetonitrile instead of evaporation (figure 2, column 03), as described in detail before in chapter 5.2. In this case, highly reproducible yields were obtained performing the assays over a period of some months. For analysis of highly diluted samples, evapora-

tion may be useful to concentrate the specimen prior hydrolysis. The comparison of diverse vaporization techniques prior analysis revealed that lyophilization is the method of choice.

As mentioned before, the presence of a limited amount of water during derivatization does not inflict the reaction, but a concentration of more than 10% water in acetonitrile should be avoided, as illustrated in figure 2 (column 04-06). While the solubility of monomers could be improved by the supplementary addition of other solvents, such as acetone or dimethylformamide [10], interestingly, the peak areas of both acids dropped extremely. In fact, supplementary acetone provoked formation of an additional peak in the HPLC chromatogram at 2.9 min.

Derivatization time and temperature were initially adopted from literature [11, 12], and further optimized. It could be shown that at higher temperature of 80 °C derivatization proceeds fastest and quantitatively. Under these conditions a steadily increasing yield was observed, reaching a constant level after 100min, as depicted from figure 2 (column 07-12). Further prolonged alkylation time did not result in significantly increased yield. Additionally the volume of derivatization solution was optimized, so that a total reaction volume of 2 mL is recommended (confer figure 2, columns 13-16).

6.2.1 Catalysts for derivatization

Ongoing from the literature the molar ratios of reactants were chosen as follows [11, 12]: for *p*-BPB 4:1 (pBPB:PLGA), triethanolamine 4:1 (TEA/PLGA) and crown-ether

2:1 (18-crown-6/PLGA). It was shown that excess amounts of both, triethanolamine and crown-ether, did not affect derivatization and yield.

Both catalysts mediated quantitative yields in the derivatization process [11, 12] and only a slight increase in yield was observed when using triethanolamine (figure 2, columns 17-18). Nevertheless, both catalysts appeared to be strongly dependent on the pH value of the reaction solution. Whereas catalysis by triethanolamine seemed to be independent from pH in a range from 1.5 to 9.0, products from crown ether-assisted alkylation were only quantitatively obtained between pH 7.5 and pH 10. The charts in figure 3 (curves 1 and 2) summarize the pH dependence of each catalyst and indicate the decrease of integrated peak areas out of the optimum pH-range of the respective catalyst. Various indicators were tested to assist titration such as phenolphthalein, bromthymol blue, bromphenol blue or neutral red. They could be added without obstructing derivatization or further analysis. However, addition of buffer solu-

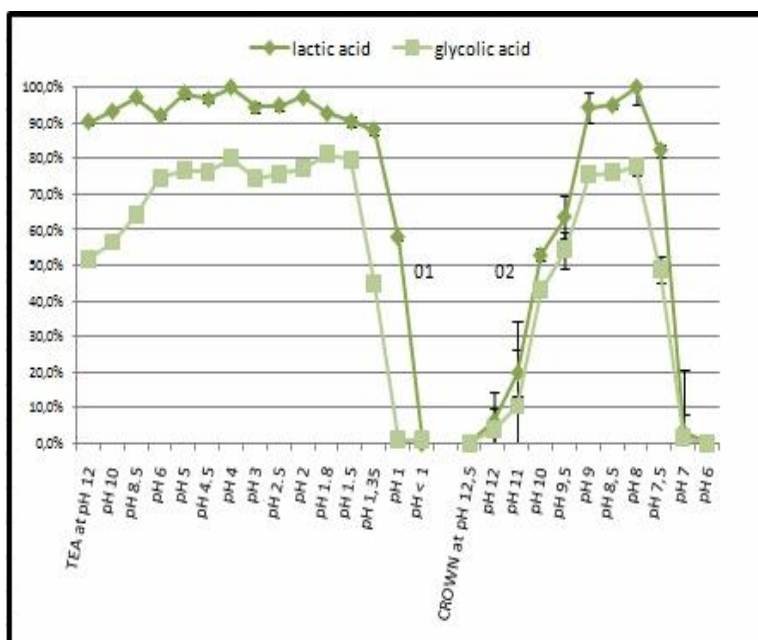


Figure 3: Effect of the pH-value on the derivatization process.
Exact procedure according to table I:
1cA (curve 19), 2aC (curve 20).

tions to reach a defined pH value affected derivatization as well as subsequent elution of the samples, since the catalysts were antagonized by metal cations.

For pH-adjustment after hydrolysis exclusively hydrobromic acid was utilizable, as a reaction by-product was obtained upon use of hydrochlor-

ic acid. To scrutinize the origin of this unknown compound, aqueous samples with acid standards, reacted parallel in different pH-values, were combined with either potassium chloride or potassium bromide. The unknown product appeared in all chromatograms at 3.5 min when potassium chloride was present, but it did not co-elute with any analyte or reaction reagent. Although the definite origin of the additional peak could not be clarified, it was shown to be most probably an analogue of the phenacyl reactant which does not interfere with the reaction process [19]. Additional experiments revealed that an excess of potassium chloride complicates titration insofar as yields of both acids decreased about 30%.

In contrast, any amounts of hydrobromic acid as well as insoluble potassium bromide, which was removed by centrifugation prior to injection, did not affect the subsequent alkylation.

6.3 HPLC analysis and reproducibility

The basic parameters for HPLC separation were adopted from Ding *et al.* [11] and Durst *et al.* [12] which include a reverse phase system where the mobile phase starts at 70:30% acetonitrile/water with a linear gradient to 100% acetonitrile at 25 °C.

The HPLC chromatogram illustrates the effective baseline separation of both acids (GA – glycolic acid and LA – lactic acid, see figure 4) without any overlap between the peaks of the esters and the derivatization reagent. The retention times of glycolic and lactic acid derivatives were 1.9 and 2.1 min, respectively. A discrimination between D- and L-lactic acid is not possible by this method.

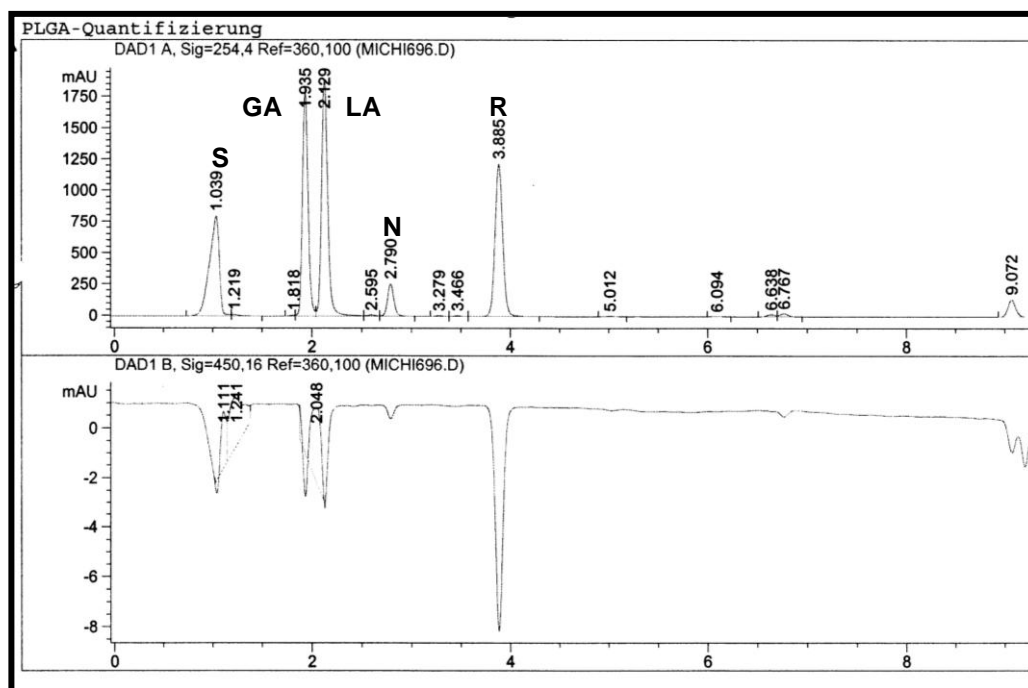


Figure 4: HPLC-chromatogram of Resomer 503H.

The solvent peak (S) appears at 1.0 min. The peak areas of the monomers glycolic acid (GA) and lactic acid (LA) at a retention time of 1.9 min (GA) and 2.1 min (LA), respectively, show a well-resolved baseline separation. The additional peak (A) at 2.7 min, which is supposed to be an analogue of the derivatization reagent, does not co-elute with the peaks of the monomers. Peak R represents the excess of the reagent, which elutes at 3.8 min. The peaks were detected at 254 nm (upper chromatogram) and 450 nm (lower chromatogram), respectively.

An additional peak at 2.7 min that appeared only in presence of water during derivatization even in absence of PLGA and did not interfere with the ester peaks. However, the peak volume increased concurrent with an increase in temperature level and derivatization time. Thus it is supposed that this peak originates from an analogue of the derivatization reagent, probably with slightly shifted hydrophilic/lipophilic properties in response to water.

A greater injection volume of more than 20 μl is not advisable as baseline noise and peak tailing increased. The limit of detection of the overall protocol was around 30 $\mu\text{g/mL}$ PLGA, although the detection limit of HPLC-analysis alone was shown to

be at a much lower level of 3 µg/mL, but the extraction step and the hydrolysis step required higher concentrations of PLGA.

The reproducibility of the analytical method was evaluated by means of five independent runs that brought an average value of 3.27 mg/mL for lactic acid and 3.20 mg/mL for glycolic acid. The standard deviation was 3.20% for lactic acid and 3.60% for glycolic acid, as well as a repeatability value of 0,943 for lactic acid and 0,989 for glycolic acid (n=5).

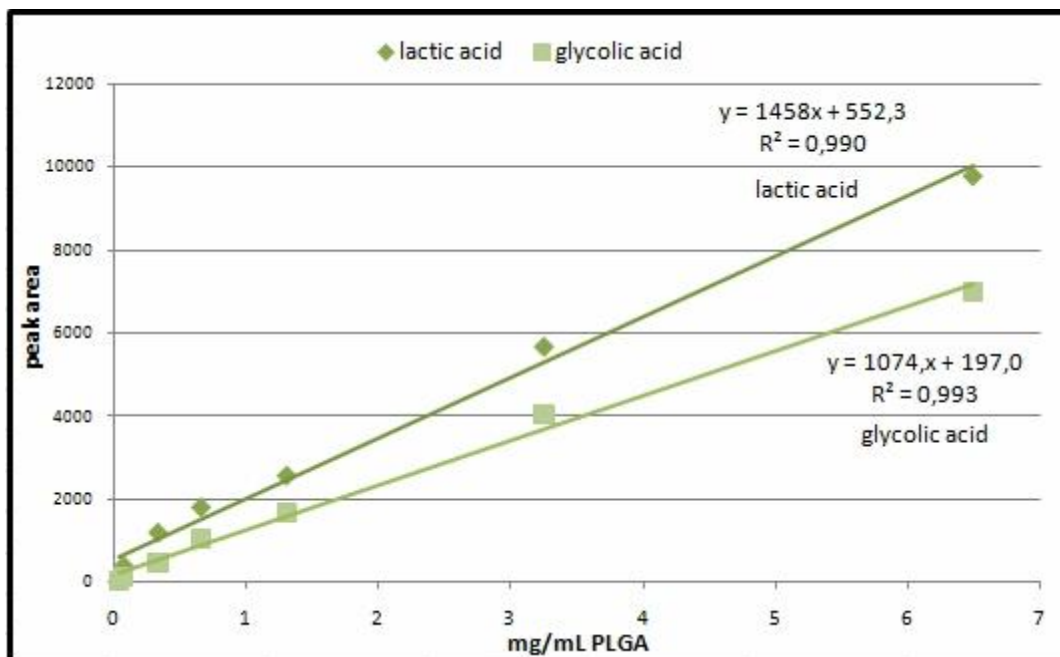


Figure 5: Calibration curve in a range from 30 µg/mL and 6.5 mg/mL PLGA.
The calibration curve can be used for quantification of PLGA-based preparations.

According to the optimized protocol (Table I) for calculation of the PLGA content of samples a calibration curve was established in the range of 30 µg/mL to 6.5 mg/mL PLGA (confer figure 5).

6.4 Analytical application

Applying the optimized protocol for detailed analysis of various PLGA types with different acid ratios revealed that the monomer ratios of PLGA-Resomers 755 S and 858 S fully agreed with the product properties specified by the manufacturer, as illustrated in figure 6.

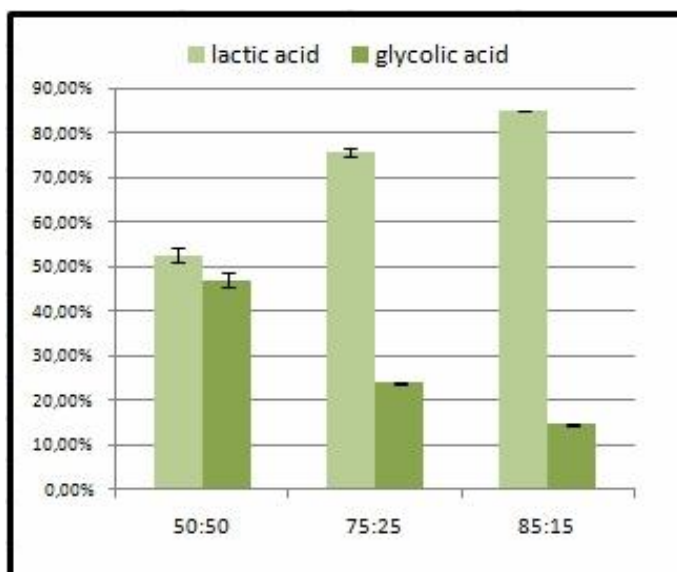


Figure 7:
Analysis of three PLGA types with different GA/LA ratio.
(Resomer® 503 H – 50:50 LA/GA, Resomer® 755 S – 75:25
LA/GA and Resomer® 858 S – 85:15 LA/GA).

Another exemplified application of this HPLC-method is in the field of nanoparticle processing. The purification of freshly prepared PLGA nanoparticles usually results in high loss of particles which could not be reliably assessed until now. At this, a PLGA-nanoparticle suspension was prepared according to a well established lab protocol. The mean particle size was 135 nm with a

polydispersity index of 0,140. For removal of aggregates, insoluble PLGA and stabilizers necessary for particle formation, several cleaning steps are required. To estimate the influence of consecutive purification steps on nanoparticle yield, the freshly prepared nanoparticle suspension was subjected to tangential flow filtration (Vivaflow 50; 100,000 MWCO PES, Sartorius Vivascience GmbH, Goettingen, Germany) using 20 mM HEPES/NaOH buffer pH 7.4 as a diafiltration medium. Application of the presented analytical method for PLGA revealed that the concentration of PLGA de-

creased by 29% within the first filtration run and ranged subsequently at a constant level of 60-70%, as depicted in figure 7.

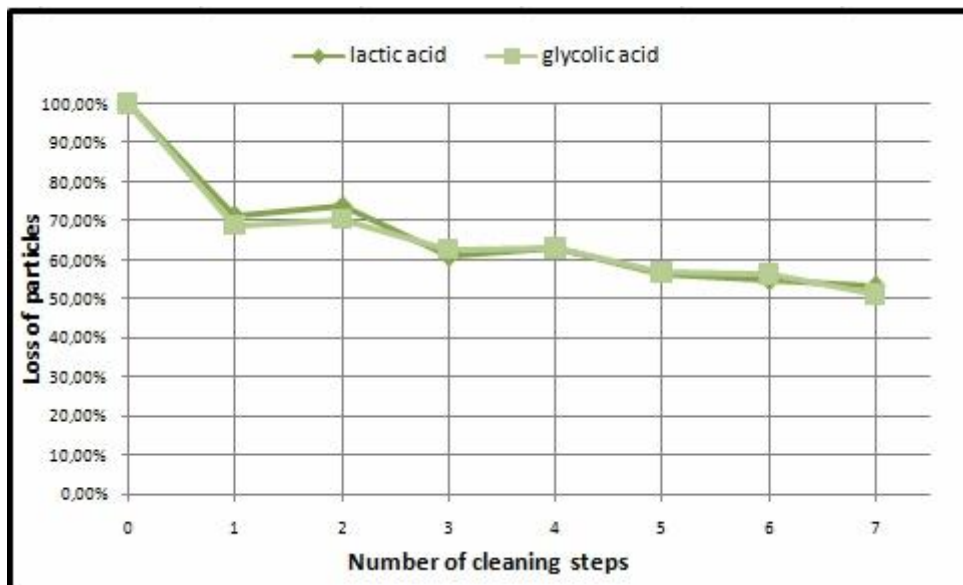


Figure 7:
Loss of nanoparticles during seven cleaning steps.

It was also observed that Pluronic®, added during preparation of PLGA-nanoparticles, did not affect the derivatization and the analysis up to a concentration of 10%.

7. DISCUSSION

7.1 Hydrolysis of PLGA and PLGA-based nanoparticles

To achieve the ambitious goal of establishing a rapid and accurate method for determination of the PLGA content as well as the degradation properties of biomedically applied PLGA matrices, an HPLC based analysis of the monomeric acids was supposed to be advantageous over comparable methods as it provides both, highly sensitive quantification and a simple separation of interfering by-products. However, this requires a reproducible and complete hydrolysis of polymeric PLGA to the corresponding monomers prior to analysis, which should be fast and non-interfering with the subsequent derivatization process. The degradation mechanism of PLGA polymers is still not fully clarified and has in literature mainly been discussed in the context of applications that involve partial degradation over extended periods of time, as is the case in physiological environment [11, 13, 14], while information on how to achieve complete hydrolytic degradation is rare. Agreement exists on the role of pH-value, temperature and acid or basic environmental conditions as promoters of the degradation process, whereby nucleophilic attack to the hydroxide ion on the carbonyl carbon via basic reagents is known to be irreversible and therefore should be preferred to acidic catalysis [9].

The optimization of hydrolysis conditions for quantitative degradation of PLGA thus focused on developing a protocol with addition of a basic reagent at elevated tem-

peratures. A series of basic reagents were tested for applicability to the workup process, comprising ammonium hydroxide, sodium hydroxide and potassium hydroxide. Ammonium hydroxide was included as it would allow for easy removal of excess reagent by evaporation, which prevents the catalyst of the subsequent derivatization reaction from being antagonized by excess metal ions [10]. However, even the use of concentrated ammonium hydroxide did not result in reaction conditions sufficiently harsh to degrade PLGA within an acceptable time range, and was therefore excluded from further investigations (data not shown). Sodium and potassium hydroxide both proved to be suitable agents for quantitative degradation of PLGA, but as the potassium salts of the monomeric acids turned out to be more versatile and effective with regard to the subsequent derivatization process (see figure 1, column 01-02) potassium hydroxide –mediated hydrolysis was finally chosen. As the yield of lactic acid only slightly increased at higher concentrations of base, whereas more by-products were formed, 0.1 N potassium hydroxide was determined the agent of choice (figure 1, columns 03-04).

Further support of the degradation process by physical means, such as rising the temperature and sonication, resulted in a remarkable increase in yield with suppressed formation of byproducts. While a significant difference upon sample workup with or without sonication could be observed probably by influencing wettability of the polymer (figure 1, columns 05-06), the duration of sonication seemed to be of negligible influence and was thus set at a standard value of 30 min at 50% intensity (figure 1, columns 08-13). Heating above the glass transition temperature of PLGA (40 °C) during sonication resulted in poorer yields than subsequent heating after the sonication process. This might be attributed to aggregation of melted PLGA matrix that may

occur during sonication and impede accessibility for the hydrolytic reagent. As shown in figure 1 (columns 14-22), optimum results were observed upon heating to 100 °C for at least 60 min. The PLGA polymers Resomer 755 S and 858 S, however, required a prolonged hydrolysis time, probably due to the higher content of more hydrophobic lactic acid. The final parameters for hydrolysis in 0,1 N potassium hydroxide were thus set at a sonication time of 30 min with subsequent heating to 100 °C for 90 min, which enable quantitative degradation of PLGA to yield the corresponding monoacids in a manner sufficiently fast for routine analysis of multiple nanoparticle samples within one day.

That way the hydrolytic degradation of PLGA polymers, which normally is a process that takes several weeks to months, could thus be carried out within 90 min, sufficiently fast to enable.

7.2 Derivatization of monomeric acids

Both, lactic acid and glycolic acid, the monomer components of PLGA, exhibit a UV-absorption pattern typical for alpha hydroxy-acids with relatively weak absorption maxima at around 210 nm which is quite close to the cut-off range of most eluents suitable for HPLC. Thus they were reacted with a chromophor prior to analysis in order to shift the absorption to higher wavelengths and intensity which increases the sensitivity of detection. *P*-BPB was chosen at this due to its versatility and well documented applicability for similar analytical problems [10, 15, 16, 17, 18, 19]. The reaction scheme for the derivatization procedure is shown in figure 8.

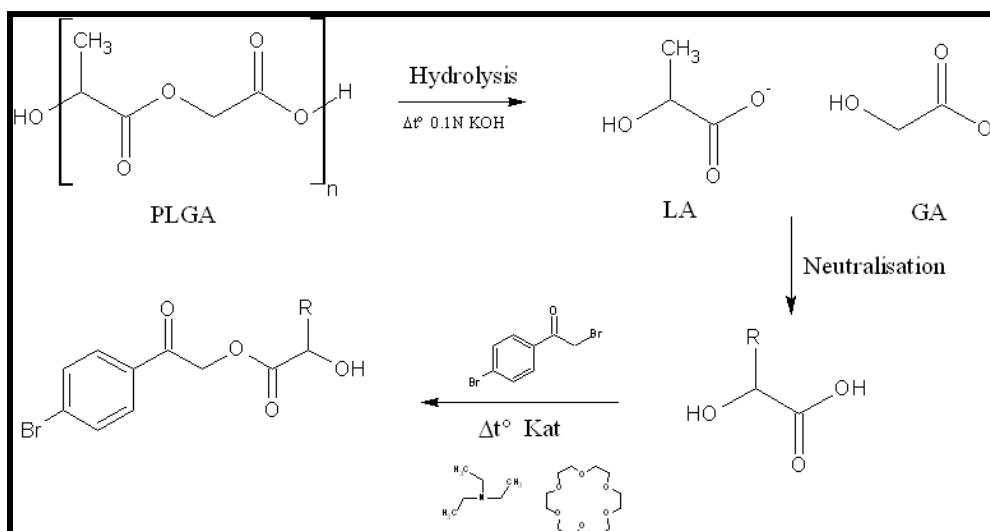


Figure 8: Reaction scheme for hydrolysis and derivatisation of PLGA.

The procedure comprises hydrolysis using 0.1 N KOH, neutralization and derivatization with *p*-BPB using either triethanolamine or 18-crown-6 as a catalyst.

Several methods were tested for sample concentration and the required shift from aqueous medium during hydrolysis to the apolar conditions needed for derivatization, including lyophilization, rotary evaporation and removal of solvent under nitrogen flow. For the small quantities processed for the analysis of nanoparticle suspensions, a simple dilution step into 1.8 mL acetonitrile was found to be the best option, as lyophilization of the small acid components was associated with lower reproducibility together with a negligible increase in sensitivity (figure 2, columns 02-03). The mixture of acetonitrile/water proved to be ideally suited for the derivatization procedure as long as the water content is kept below 10% (v/v) (figure 2, columns 04-06) [19, 20], and mediates excellent solubility for the compounds under investigation. However, for larger sample quantities or for analysis of larger devices made of PLGA such as scaffolds, freeze drying may preferentially be used for initial sample preparation.

With regard to the derivatization process, either crown-ether [12] or triethylamine [11] can be used to generate carboxylate anions that then reacted with *p*-BPB. The

advantage of using 18-crown-6 is that in addition to complexing cations of defined radius in the crown cavity, the amphiphilic character of the molecule makes it a potent phase transfer catalyst. In contrast to triethanolamine, crown ethers do not require stoichiometric amounts. A comparative analysis of the catalysts revealed that both convert the compounds of interest quantitatively, however, require neutralization of excess base prior to derivatization. 1 N hydrobromic acid was thus used to adjust the pH to 8.0 - 8.5 for 18-crown-6 and pH 4.5 - 5.0 for triethanolamine, respectively. Application of various buffer solutions for a more convenient adjustment of pH was also investigated but was shown to interfere with the subsequent reaction. Since triethanolamine displayed a remarkably larger working range with respect to pH (figure 3, curves 01-02) and provoked a slightly higher signal intensity (figure 2, columns 17-18) it was finally chosen for further optimization.

The time course of the derivatization procedure required longer reaction times for lactic acid than for glycolic acid, and the endpoint was determined to be at around 90 min at 80 °C (figure 2, columns 07-12). While conversion of glycolic acid was relatively independent from the reaction volume, the reaction of chromatophor and lactic acid was promoted in slightly diluted solution (figure 2, columns 13-16).

7.3 HPLC analysis and reproducibility

With regard to the analysis of specific compounds in more complex sample solutions, one of the most important benefits of liquid chromatography is the high quality purifi-

cation and separation of interfering compounds simultaneously to the process of detection. A reverse phase HPLC system with gradient elution was applied for the acquisition of the derivatised hydrolysis products [11], which was evaluated by comparison with the corresponding standard solutions. As shown in figure 4, good resolution was achieved within a total analysis time of less than 10 min.

Glycolic and lactic acid were well separated, and could be accurately determined in parallel within one sample run. The peaks were assigned by matching the retention times of each peak with those of the individual standards, prepared similarly to the degraded PLGA samples, acquired in independent runs. Quantification was done via comparison with a calibration curve that was shown to be linear in the range between 30 µg/mL and 6.5 mg/mL. The inclusion of 2-hydroxybutyric acid as an internal standard did not result in further improvement and was not necessary as reproducibility between individual runs already was excellent.

One ubiquitous additional peak at 2.7 min was found to be a reaction by-product of the esterification, probably resulting from *p*-bromophenacyl alcohol as a reaction product of *p*-BPB with water [16]. However, it did not affect derivatization or subsequent HPLC analysis.

Some tiny peaks emerged in the chromatogram outside the range of interest which were attributed to esters of other components present in solution. Yet, the overall areas of these peaks were negligibly small and comparative analysis confirmed that these compounds were not attributed to the presence of PLGA. The possible occurrence of smaller oligomers, especially dimers, was constantly monitored, but could not be detected in any sample that was subjected to the hydrolysis procedure. How-

ever, injection of lactide and glycolide standard solutions without hydrolysis revealed that also the content of dimers can be determined with the described method which might be useful for detailed analysis of PLGA degradation processes.

7.4 Analytical application

The versatile principle of measurement featured by the proposed method can be applied to various questions that occur during development and optimization of PLGA-containing biomedical devices. It was here used to better characterize the manufacturing protocol of PLGA nanoparticle suspensions via solvent evaporation, which is one of the most promising strategies for future use in large scale industrial production [8]. A major drawback of this comparative convenient preparation technique is that it requires tedious sample purification after emulsification, always associated with the risk of inducing particle agglomeration or losing large fractions of the product. We thus determined the PLGA concentration during individual steps of a washing protocol via diafiltration that in other studies proved to yield monodisperse and well purified particle suspensions [21]. An initial decrease of PLGA concentration by 30% indicated that major amounts of unbound polymer were present in the solution, which were effectively eliminated by the membrane filtration. In comparison, PLGA loss during subsequent steps remained relatively constant at a level of < 10% for each stage which indicates that smaller amounts of PLGA are washed out that may either be freely flowing in solution or be bound to the surface of larger particles. Almost 50% of PLGA mass were lost throughout the process of seven purification steps with a pla-

teau being reached after the first three steps (confer figure 7). The fact that still PLGA is lost from step to step may be due to dilution processes and inevitable certain membrane fouling with particles.

Moreover, the method was used to determine particle concentration in a novel study on the development of PLGA-based imaging carriers for MRI [22], where it was shown that accurate setting of the ratio from particle matrix to modifying ligand is imperative for a successful preparation.

8. Conclusion

The herein presented method for hydrolysis, derivatization and HPLC determination allows for quantitative analysis of lactic acid and glycolic acid from PLGA and nanoparticles made thereof. As shown by studies on PLGA polymers with different monomer ratios, the method is also suited for quality control of polymer batches or new polymer derivatives. PLGA is a widely applied polymer for development of micro- and nanoparticulate drug delivery systems as well as for scaffolds in tissue engineering, and the newly developed analysis protocol will thus foster research in several branches of modern healthcare.

For the first time, a method that is applicable for routine analysis of multiple samples with sufficient sensitivity for nanoparticle solutions could be established. A further improvement of some processing parameters by incorporation of additional concentration steps may shift the detection limit to lower values for examination of extremely diluted samples.

With regard to future applications, the HPLC protocol may be adapted for simultaneous determination of particle matrix with encapsulated drug or marker molecule within a single run. Likewise, the routine quality monitoring of marketed particulate formulations made of PLGA will be feasible in a fully automated fashion by the proposed method.

9. References

- [1] Wagner V, Dullaart A, Bock A-, Zweck A.; *The emerging nanomedicine landscape*; Nat Biotechnol 2006, 24(10): 1211-1217.
- [2] Lü J, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, Chen C.; *Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology*; Expert Review of Molecular Diagnostics 2009, 9(4): 325-41
- [3] Feng SS, Mei L, Anitha P, Gan CW, Zhou W.; *Poly(lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of Docetaxel*; Biomaterials 2009, 30(19): 3297-3306
- [4] Chung HJ, Park TG.; *Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering*; Adv Drug Del Rev 2007, 59: 249-262
- [5] Ng CP, Goodman TT, Park I-, Pun SH.; *Bio-mimetic surface engineering of plasmid-loaded nanoparticles for active intracellular trafficking by actin comet-tail motility*; Biomaterials. 2009, 30(5): 951-8
- [6] Vasir JK, Labhasetwar V.; *Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics*; Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(8): 718-28
- [7] Farokhzad OC, Langer R.; *Impact of nanotechnology on drug delivery*; ACS Nano 2009, 3(1): 16-20
- [8] Vauthier C, Bouchemal K.; *Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles*; Pharm. Res. 2009; 26 (5): 1025-58
- [9] Croll T., Conor A., Cooper-White J.; *Controllable surface modification of Poly(Lactic-co-Glycolic-acid) by hydrolysis or aminolysis 1: physical, chemical and theoretical Aspects*; Bioacromolecules, 2004; 5 (2): 463-473.
- [10] Sarkar A., Kochak G.; *HPLC analysis of aliphatic and aromatic dicarboxylic acids cross-linker hydrolyzed rom carbohydrate polyesters for estimation of the molar degree of substitution*; Carbohydrate Polymers, 2004; 59, 305-312.
- [11] Ding A., Schwendeman S.; *Determination of Water-Soluble Acid Distribution in Poly(lactide-co-glycolide)*; Journal of pharmaceutical sciences, 2003; 93, (2), 322-31.

- [12] Durst H. D., Milano M, Grushka E.; *Phenacyl Esters of Fatty Acids via Crown Ether Catalysts for Enhanced Ultraviolet Detection in Liquid Chromatography*; Analytical chemistry, 1975.- 47 (11), 1797-1801.
- [13] Zolnik B., Burgess D.; *Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release*; Journal of Controlled Release, 2007; 122, 338-344.
- [14] Grizzi I., Garreau H., Vert M.; *Hydrolytic degradation of devices based on poly(D,L-lactic acid) size-dependence*; Biomaterials, 1995; 16, 305-311.
- [15] Grushka E., Durst H.D., Kikta Jr. E.J.; *Liquid chromatographic separation and detection of nanogram quantities of biologically important dicarboxylic acids*; Journal of Chromatography, 1975; 112, 673-679.
- [16] Nagels L., Debeuf C., Esmans E.; *Quantitative determination of Quinic acid and derivatives by HPLC*; Journal of Chromatography, 1980; 190, 152-169.
- [17] Capristo E.; *A new HPLC Method for the Direct analysis of Triglycerides of Dicarboxylic Acids in Biological Samples*; Clinica Chimica Acta, 1999; 289 (1), 11-21.
- [18] Partha S.; *Ultraviolet and Fluorescence Derivatization Reagents for Carboxylic Acids Suitable for HPLC: a REVIEW*; Biomedical Chromatography, 1996; 10 (5), 193-204.
- [19] Patience R.L., Thomas J.D.; *Rapid concentration and analysis of short chain carboxylic acids: variation on a theme*; Journal of Chromatography, 1981; 234, 225-230.
- [20] Nishimura N.; *Application of Capillary Electrophoresis to the Simultaneous Determination of Betaines in Plants*; Analytical sciences, 2001; 17 (1), 103-106.
- [21] Fillafer C., Friedl D.S., Wirth M., Gabor F.; *Fluorescent bionanoprobes to characterize cytoadhesion and cytoinvasion*. Small 2008; 4 (5): 627-33
- [22] Ratzinger G., Länger U., Neutsch L., Pittner F., Wirth M., Gabor F.; *Surface modification of PLGA particles: The interplay between stabilizer, ligand size and hydrophobicity*. Accepted by Langmuir for publication September 2009.

Zusammenfassung

Die Nanotechnologie steht vermehrt auch im Fokus der pharmazeutischen-technologischen Forschung, zumal der Einbau von Arzneistoffen in Mikro- und Nanopartikel eine vielversprechende Möglichkeit für die Darreichung von stabilitätslimitierten, aber hochwirksamen Wirkstoffen wie Peptiden, Proteinen und DNA bietet. Neben Schutz vor äußeren Einflüssen ermöglicht die Anwendung von partikulären Systemen auch eine Anwendung mit zielgerichteter (Drug-Targeting) und gesteuerter (Controlled Drug-Delivery) Wirkstofffreisetzung. Für den Einsatz als Arzneistoffträger kommen nur biokompatible und bioabbaubare Polymere in Betracht, häufig werden hierbei die Homo- und Copolymere (Poly-D,L-lactic –coglycolic) acid, PLGA) aus Milch- und Glykolsäure eingesetzt. Trotz intensiver Forschungstätigkeit fehlen derzeit jedoch noch quantitative Analysemethoden für solche Nano- und Mikropartikel aus PLGA, welche auch zur Qualitätskontrolle, Optimierung von Reinigungsmethoden und Oberflächenmodifikationen benötigt werden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine einfache, rasche und zugleich sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung von PLGA-Polymeren sowie nanopartikulären Formulierungen daraus entwickelt. Unter Berücksichtigung der verfügbaren Literatur wurde ein Analysenverfahren für PLGA entwickelt, das auf Hydrolyse, Derivatisierung und HPLC-Analytik beruht. Sowohl die Erfassung einzelner Monomere aus dem Polymerabbau, als auch die Quantifizierung der Gesamt-Polymermasse ist nach vorangehender Hydrolyse möglich. Ein exaktes Verhältnis der Monomere Glykol- und Milchsäure kann so innerhalb weniger Stunden erfasst werden, einsetzbar auch in der Qualitätskontrolle bei der Herstellung PLGA-haltiger polymerer Systeme. Gleich-

zeitig bietet dieses Konzept den Vorteil der bisher nur schwer durchführbaren parallelen Quantifizierung von Glykol- und Milchsäure.

Damit steht erstmals ein verlässliches und sensitives Analysenverfahren für PLGA zur Verfügung, das einerseits die Basis für die Weiterentwicklung von PLGA Mikro- und Nanopartikeln im Biopharmazeutischen Bereich wie die Erfassung und Adaptierung des Abbauverhaltens, die Optimierung der Oberflächenmodifikationsstrategien, Untersuchung der Zell-Partikel Wechselwirkung, andererseits für die Entwicklung funktioneller Copolymere auf PLGA-Basis darstellt.

Literaturverzeichnis

- [1] Gourlay S.J. et al.; *Biocompatibility testing of polymers: in vivo implantation studies*; Journal of Biomedical Materials Research; 1978; 12, 219 -232.
- [2] Kobayashi H., Shiraki K. und Ikada Y. *Toxicity test of biodegradable polymers by implantation in rabbit cornea*; Journal of Biomedical Materials Research, 1992; 26, 1463-1476.
- [3] Bendix D.; *Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications*; Polymer degradation and stability, 1997; 59, 129-135.
- [4] Wischke C.; *Oberflächenmodifizierte Proteinbeladene Mikropartikel für das Targeting dendritischer Zellen*; diss.fu-berlin, 2006.
- [5] Göpferich A.; *Mechanisms of polymer degradation and erosion*; Biomaterials, 1994; 17, 103-114.
- [6] Li S.; *Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from Lactic and Glycolic Acids*; Journal of Biomedical Material Res., 1998; 48, 342-353.
- [7] Croll T.; *Conor Andrea und Cooper-White Justin Controllable surface modification of Poly(Lactic-co-Glycolic-acid) by hydrolysis or aminolysis 1: physical, chemical and theoretical aspects*. Bioacromolecules 2003; 5, 463-473.
- [8] Chung S, Waldron N., Zentner G.; *Quantitative analysis of ester linkages in poly(DL-Lactide) and Poly(DL-Lactide-co-Glycolide)*; Journal of Controlled Release, 1995; 38 (1), 69-73.
- [9] Ding A., Schwendenman S.; *Determination of Water-Soluble Acid Distribution in Poly(lactide-co-glycolide)*; Journal of pharmaceutical sciences, 2003; 93 (2), 22-31.
- [10] Wallis K., Müller R.; *Comparative measurements of nanoparticle degradation velocity using an accelerated hydrolysis test*; Pharm. Ind., 1993; 55, 168-172.
- [11] Zolnik B., Burgess D.; *Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release*; Journal of Controlled Release, 2007; 122, 338-344.
- [12] Park T.; *Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight*; Journal of Controlled Release, 1994; 30, 161-173.

- [13] Püttmann M, Krug H., Kattermann R.; *Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range*; *Clinical Chemistry*, 1993; 39, 825-832.
- [14] Durst H. D., Milano M., Grushka E.; *Phenacyl Esters of Fatty Acids via Crown Ether Catalysts for Enhanced Ultraviolet Detection in Liquid Chromatography*; *Analytical chemistry*, 1975; 47 (11), 1797-1801.
- [15] Sarkar A., Kochak G.; *HPLC analysis of aliphatic and aromatic dicarboxylic acids cross-linker hydrolyzed from carbohydrate polyesters for estimation of the molar degree of substitution*; *Carbohydrate Polymers*, 2004; 59, 305-312.
- [16] Nagels L., Debeuf C., Esmans E.; *Quantitative determination of Quinic acid and derivatives by HPLC*; *Journal of Chromatography*, 1980; 190, 152-169.
- [17] Patience R.L., Thomas J.D.; *Rapid concentration and analysis of short chain carboxylic acids: variation on a theme*; *Journal of Chromatography*, 1981; 199 (3), 243-260.
- [18] Grushka E., Durst H.D., Kikta Jr. E.J.; *Liquid chromatographic separation and detection of nanogram quantities of biologically important dicarboxylic acids*; *Journal of Chromatography*, 1975; 112, 673-679.
- [19] Marcato B., Paganetto G., Cecchin G.; *High-performance liquid chromatographic determination of some of the hydrolytic decomposition products of Poly(alpha-hydroxyacid)s*; *Journal of Chromatography*, 1996; 682, 147-156.

CURRICULUM VITAE

ZÖCHLING MICHAELA

ANGABEN ZUR PERSON

Name	ZÖCHLING Michaela
Geburtsdatum und -ort	24.Dezember 1983 in St.Pölten
Staatsangehörigkeit	Österreich
Eltern	Mag.pharm. Erich Zöchling Mag.pharm. Ulrike Zöchling
Geschwister	Elisabeth Zöchling (*1987)



SCHULBILDUNG

1990 - 1994	Volksschule, St.Pölten
1994 - 1998	Bundesrealgymnasium, St.Pölten
1998 - 2002	Bundesoberstufenrealgymnasium mit musikalischem Schwerpunkt (St.Pölten)
18.Juni 2002	Matura

STUDIUM

seit Oktober 2002	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
18.Dezember 2003	Abschluss der 1.Diplomprüfung
WS 2006 / SS 2007	Tätigkeit als Tutor in den Übungen „Magistrale Arzneimittelherstellung“
Wintersemester 2007	Tätigkeit als Tutor in den Übungen „Grundpraktikum aus pharmazeutischer Technologie“
November 2007 – Juli 2008	Durchführung der praktischen Arbeiten zur Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
20.April 2009	Abschluss der 2.Diplomprüfung

ARBEITSERFAHRUNG UND FERIALTÄTIGKEITEN

Juli – September 2002	Geringfügige Beschäftigung in der Apotheke Traisenpark (Magistralita, Warenübernahme, Organisation, Inventur, Verkauf)
Juli 2002 – Juli 2006	Ferialpraxis in der Apotheke Traisenpark (St.Pölten)
2005 – 2007	Standbetreuung bei diversen Veranstaltungen der Fa. Herba Chemosan und Fa.Sandoz
Februar 2005/2006	Standbetreuung der Fa. Herba Chemosan im Zuge des <i>Apothekerkongresses</i> in Saalfelden
Oktober 2007	Messestandbetreuung der Fa. Sanova beim <i>Internationalen Logopädie Fachkongress</i>
April 2008	Messebetreuung der Fa. Herba Chemosan bei der <i>AustroPharm</i>
November 2007	Standbetreuung der Österreichischen Apothekerkammer bei der <i>Gesundheitsmesse für Männer und Frauen</i> (St.Pölten)
Februar 2008	Messebetreuung bei der <i>Seniorenmesse</i> (St.Pölten)
März 2008	Standbetreuung bei der <i>Berufs- und Studienmesse</i> (BeSt)

BESONDERE PERSÖNLICHE FÄHIGKEITEN

Muttersprache	Deutsch
Weitere Sprachkenntnisse	Englisch (fließend in Wort und Schrift) Spanisch (Maturaniveau) Französisch (Schulkenntnisse) Hebräisch (Grundkenntnisse)
Technische Fähigkeiten	EDV-Kenntnisse (Microsoft Office)
Kompetenzen	Zuverlässig Teamfähig Lösungsorientiert Organisationsfähig
Interessen	Fotographie Sport Musik

St.Pölten, im Oktober 2009