

**Oberflächencharakterisierung pharmazeutischer
Glasbehältnisse und Messung verschiedener
Wechselwirkungen zwischen Interferon α -2a und Glas**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Monica S. Schwarzenbach
aus Basel (Schweiz)

Basel, 2001

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag von

Herrn Prof. H.-J. Güntherodt (Fakultätsverantwortlicher)

Herrn Prof. E. Meyer (Korreferent)

Herrn Dr. M. Hegner (Experte)

Herrn Dr. J. Schwob (Experte)

Basel, den 23. Januar 2001

Prof. Dr. Andreas D. Zuberbühler

Dekan der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie	3
2.1.1	Prinzip und Aufbau	3
2.1.2	Abbildungsmodi	4
2.1.3	Scanner	5
2.1.4	Blattfedern	6
2.1.5	Kraftspektroskopie	7
2.1.6	Ermittlung der Federkonstanten	8
2.2	Glas	9
2.2.1	Struktur	10
2.2.2	Physikalische Eigenschaften	10
2.2.3	Chemische Eigenschaften	12
2.2.4	Borsilikatgläser in der Pharmaindustrie	13
2.3	Glimmer	16
2.4	Interferone	17
2.4.1	Interferon α -2a	17
2.5	Immobilisierung	20
2.5.1	Substrate	20
2.5.2	Methoden für kovalente Immobilisierung	21
2.6	Intermolekulare Wechselwirkungskräfte	23
2.7	Röntgen-Photoelektronenspektroskopie	27
2.8	Rasterelektronenmikroskopie	28
2.9	Elektronenstrahlmikrosonde	29
3	Methoden und Materialien	30
3.1	Instrumentierung	30
3.2	Messen in Flüssigkeit	31
3.3	Cantilever und Kalibration der Federkonstanten	31
3.4	Bildaufnahme und Bildverarbeitung	32

3.5	Glaspräparation	33
3.6	Proteinadsorption auf Substrat	34
3.7	Immobilisierung von Protein an die AFM-Spitze	34
3.8	Aufnahme und Auswertung von Kraft-Distanz Kurven	35
4	Charakterisierung von Glasoberflächen	37
4.1	Resultate	37
4.1.1	Rohrglas	37
4.1.2	Vials	38
4.1.3	Fertigspritzen	41
4.1.4	Chemische Zusammensetzung der Innenoberflächen von Vials und Fertigspritzen	42
4.1.5	Zusammenfassung der Resultate	44
4.1.6	Hochauflösung von Silikaglas	45
4.2	Diskussion	45
4.2.1	Rohrglas	45
4.2.2	Vials	46
4.2.3	Fertigspritzen	47
4.2.4	Silikaglas	48
5	Proteinwechselwirkungen	49
5.1	Resultate	49
5.1.1	Abbilden von Interferon α -2a auf Glimmer und Glas	49
5.1.2	Kraftspektroskopie auf FIOLAX und Type 1 plus	50
5.2	Diskussion	53
5.2.1	Abbilden von Interferon α -2a auf Glimmer und Glas	53
5.2.2	Kraftspektroskopie auf FIOLAX und Type 1 plus	56
6	Zusammenfassung und Ausblick	59
	Literaturverzeichnis	61
	Abkürzungen und Glossar	66
	Danksagung	68
	Curriculum vitae	70

1 Einleitung

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen ist ein bekanntes Problem, das nicht zuletzt in biologischen Vorgängen unerlässlich ist. Die Blutgerinnung wird beispielsweise durch den Kontakt von Plasmaproteinen mit einer Gewebeoberfläche oder mit der Wand eines Glasröhrchens ausgelöst. Eher unerwünscht sind die bakterielle Plaquebildung auf Zähnen und die Beeinträchtigung von Kontaktlinsen durch Proteine der Tränenflüssigkeit. Proteine sind aufgrund ihrer Grösse, Flexibilität und amphoteren Verhaltens stark oberflächenaktiv und adsorbieren auf vielen Oberflächen. Es ist in der Tat seltener ein Problem, Proteine zu adsorbieren, als die Adsorption zu verhindern!

Glasbehältnisse spielen in der Verpackung von pharmazeutischen Produkten eine wichtige Rolle. Hohe Qualitätsanforderungen werden durch streng kontrollierte Herstell- und Abfüllprozesse eingehalten. Zur Abfüllung von Injektions- und Infusionslösungen eignen sich höchstens die im Arzneibuch beschriebenen Glasarten I und II. Trotz der verbesserten Resistenz gegenüber wässrigen Lösungen und Temperatureinflüssen gelten diese beiden Glasqualitäten jedoch auch nicht mehr als inert.

Wie sich in jüngster Zeit gezeigt hat, wird sogar die Glasart I aus Borsilikatglas den Anforderungen für niedrig dosierte, neue bio- und gentechnologische Produkte nicht mehr gerecht. In Proteinlösungen mit geringer Konzentration kann ein bedeutender Anteil des Wirkstoffes durch Adsorption an der Glaswand verloren gehen. Die Wechselwirkungen, die für die Proteinadsorption verantwortlich gemacht werden, sind insbesondere von nicht-kovalenter, elektrostatischer und hydrophober Natur [Brash, 1995; Norde, 1995]. Die adsorbierten Moleküle können sich auf der Oberfläche zum Teil entfalten und ihre Ladungen neu ausrichten [Duncan, 1995]. Dabei kann das Protein seine physiologische Funktion behalten, oder es wird inaktiviert. Werden Glasbestandteile, wie Alkaliionen, während der Sterilisation oder Lagerung von wässrigen Lösungen aus der Glaswand herausgelöst, verursachen sie eine pH-Verschiebung und bewirken eine Veränderung der Proteinstruktur.

Deshalb wurde in den letzten Jahren intensiv nach neuen, proteinabweisenden Materialien gesucht. Die Schwierigkeit bei der Entwicklung von bioinerten Oberflächen liegt insbesondere darin, dass jedes Protein aus einer einzigartigen Peptidkette besteht und demnach sein Adsorptionsverhalten auf individuellen biophysikalischen Eigenschaften beruht. Sobald der genaue Mechanismus der Proteinadsorption verstanden ist, können im Prinzip gezielt proteinresistente Oberflächen kreiert werden.

Es sind verschiedene Lösungswege denkbar, die Adsorption von biologischen Molekülen zu unterbinden [Brash, 1995]. Durch Zusatz eines zweiten Proteins konkurrenziert dieses zum Beispiel um die Adsorptionsstellen auf der Oberfläche und verhindert damit die Adsorption des anderen. Weiter können oberflächenaktive Substanzen die Löslichkeit von Proteinen erhöhen und damit die Wechselwirkung mit der Oberfläche reduzieren.

Mit der Entwicklung einer neuen Beschichtungstechnologie ist die Produktion von Glasbehältnissen gelungen, welche mit vielen Proteinen auch bei geringster Konzentration kompatibel sind [Walther, 1998]. Solche Siliziumdioxid-beschichtete Behältnisse sind von der Firma SCHOTT entwickelt und unter dem Namen Type 1 plus eingeführt worden. Sie eignen sich insbesondere für pH-empfindliche oder komplexbildende Wirkstoffe, die durch die Freisetzung von Ionen im Glas beeinträchtigt werden.

Die Möglichkeit, adsorbierte Proteine auf Oberflächen unter physiologischen Bedingungen abzubilden, hat die Rasterkraftmikroskopie zu einem einzigartigen Instrument gemacht, neue Einblicke auf dem Gebiet der Proteinadsorption zu gewähren.

In der vorliegenden Arbeit soll die Methode ausgenutzt werden, um zunächst verschiedene Gläser auf ihre topographischen Unterschiede hin zu untersuchen und anhand gezielter Messungen die Bedeutung der beobachteten Strukturen zu erfahren. Eine interessante Weiterentwicklung des Rasterkraftmikroskopes ist die Verwendung von modifizierten Messspitzen, womit spezifische Wechselwirkungen zwischen adsorbierten Molekülen und Oberflächen gemessen werden können. An einem konkreten Beispiel sollen hier Adhäsionskräfte zwischen Protein und Glas charakterisiert und im Vergleich zur neuen Type 1 plus-Beschichtung dargestellt werden.

2 Grundlagen

2.1 Rasterkraftmikroskopie

2.1.1 Prinzip und Aufbau

Nach der Erfindung des Rastertunnelmikroskopes (englisch: *Scanning Tunneling Microscope*, *STM*) durch Gerd Binnig und Heinrich Rohrer [Binnig, 1982] wurde im Jahre 1986 das Rasterkraftmikroskop (englisch: *Atomic Force Microscope*, *AFM* oder *Scanning Force Microscope*, *SFM*) eingeführt [Binnig, 1986].

Grundsätzlich sammelt die Spitze in der Rastersondenmikroskopie (englisch: *Scanning Probe Microscopy*, *SPM*) lokale Informationen über lang- und kurzreichweitig wirkende Kräfte oder elektrische Informationen einer Oberfläche. Weiter können elastische oder magnetische Eigenschaften einer Probe erfasst werden. Ein Topographiebild entsteht, wenn die Spitze rasterförmig über die Oberfläche geführt wird.

Das Prinzip des Rasterkraftmikroskopes (*Abbildung 2.1*) basiert auf dem des Rastertunnelmikroskopes. Beim STM wird der Tunnelstrom gemessen, der zwischen einer leitenden Probe und einer Metallspitze fließt, wenn diese nahe genug an die Oberfläche angenähert wird. Im Gegensatz dazu werden beim AFM Kräfte gemessen, welche zwischen Probe und Spitze wirken. Die Methode lässt sich deshalb auch auf nichtleitenden Proben anwenden. Die Spitze sitzt am Ende einer weichen Blattfeder (englisch: *cantilever*), welche durch geringste Wechselwirkungskräfte ausgelenkt wird. Die Verbiegung der Feder kann auf verschiedene Arten aufgezeichnet werden. Eine der bequemsten und häufig eingesetzten Methode ist die Detektion eines auf der Rückseite des Cantilever reflektierten Laserstrahls mit einer Photodiode [Meyer, 1988; Drake, 1989]. Die Rasterbewegungen in alle drei Raumrichtungen werden von piezoelektrischen Keramikelementen ausgeführt.

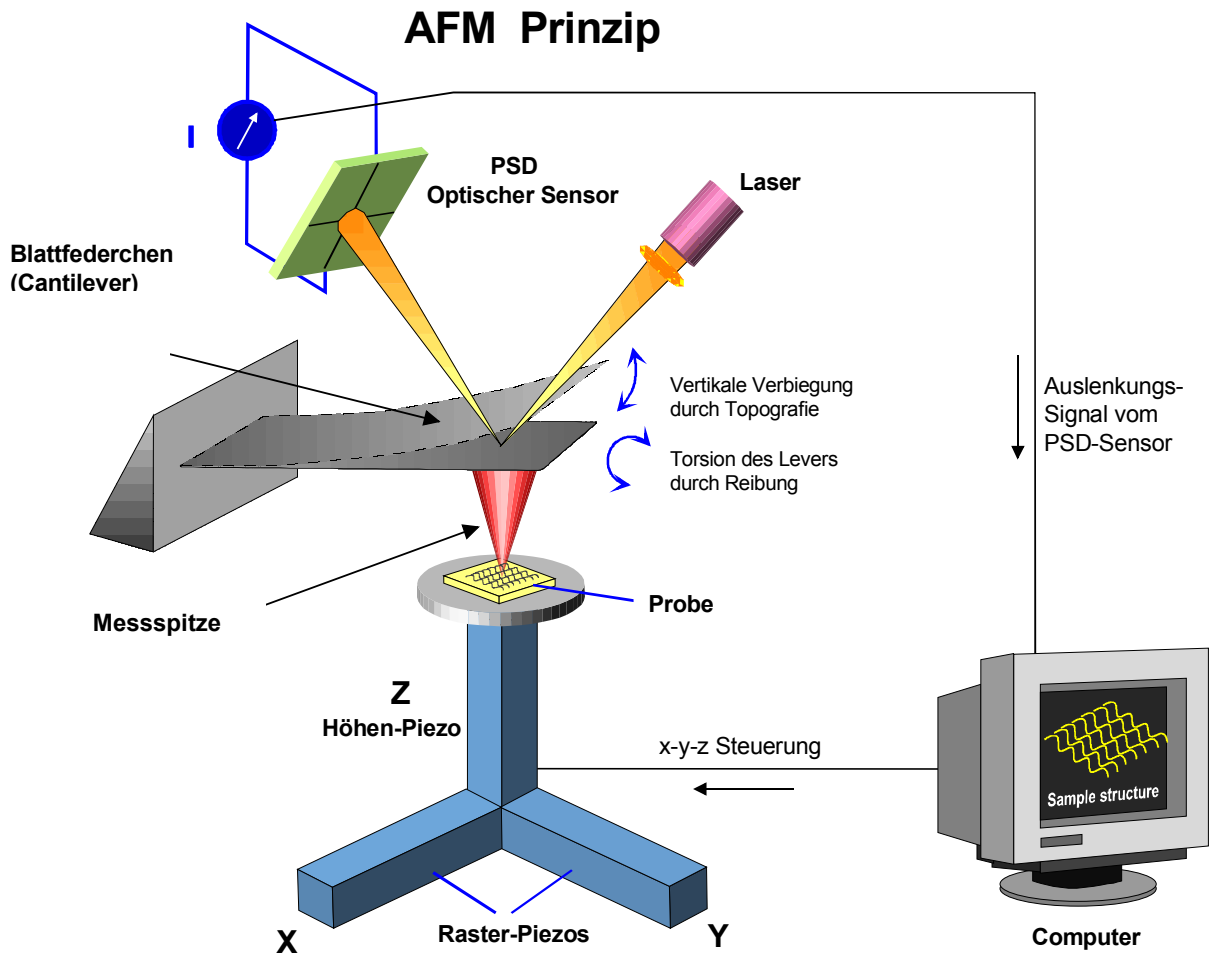


Abbildung 2.1: Das Prinzip des Rasterkraftmikroskopes in schematischer Darstellung. (P. Reimann, Uni Basel)

Das AFM kann unter verschiedenen Bedingungen betrieben werden. Für molekulare Anwendung wird meist an Luft oder in Flüssigkeit gearbeitet, während unter Ultrahochvakuum und bei tiefen Temperaturen atomare Auflösung erreicht werden kann [Giessibl, 1995; Lantz, 2000]. Die Abwesenheit von Kapillarkräften ist nicht nur im Vakuum, sondern auch in Flüssigkeiten gegeben. Um biologische Oberflächen schonend und in physiologischer Umgebung messen zu können, wird das System deshalb bevorzugt in wässrigen Lösungen betrieben [Drake, 1989; Weisenhorn, 1989].

2.1.2 Abbildungsmodi

Kontaktmodus

Im Kontaktmodus oder statischen Modus wird die Spitze mit konstanter Geschwindigkeit und in ständiger Berührung mit der Oberfläche über die Probe geführt. Die Abbildung erfolgt entweder mit konstant gehaltener Auslenkung der Blattfeder (constant deflection oder constant force mode) oder mit fixierter z-Piezoposition (constant height mode). Im ersten Fall wird der Verbiegung der Feder mit dem Höhenpiezo nachgefahren, so dass die auf die Probe wirkende

Normalkraft in jedem Punkt gleich gross bleibt. Die Bewegungen des z-Piezos werden als Höheninformation aufgezeichnet. Im zweiten Fall wird direkt die Auslenkung des Cantilevers auf der Photodiode registriert und als Topographiebild abgespeichert. Dieser Modus eignet sich hauptsächlich für Untersuchungen an harten technischen Proben mit hoher lateraler Auflösung [Rädlein, 1995; Schmitz, 1997].

Nichtkontaktmodus

Der Nichtkontaktmodus wird auch dynamischer Modus genannt, weil die Blattfeder nahe seiner Resonanzfrequenz zu Schwingungen angeregt wird. Das Schwingungsverhalten der Feder ändert sich, wenn nun die Spitze an die Oberfläche angenähert und die Probe abgerastert wird. Da die Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe sowohl eine Veränderung der Schwingungsamplitude als auch der Phase bewirken, können beide Signale detektiert und zur Strukturaufklärung herangezogen werden. Der Nichtkontaktmodus ist schonender und dient insbesondere zur Abbildung von weichen, biologischen Proben [Fritz, 1995; San Paulo, 2000; Wälivaara, 1995].

Reibungsmodus

Dank der Detektion des reflektierten Laserstrahls mit einer Vierquadranten-Photodiode können nicht nur Verbiegungen der Feder in vertikale Richtung, sondern auch in horizontale Richtung erfasst werden. Damit lassen sich im Kontaktmodus gleichzeitig auch Torsions- oder Reibungskräfte messen. Beim Hin- und Zurückrastern einer Oberfläche mit unterschiedlichem Haftverhalten gegenüber der AFM-Spitze entsteht somit ein Kontrast in Abhängigkeit der Scangeschwindigkeit. Für die Aufzeichnung des Reibungskontrastes eignen sich insbesondere weiche, rechtwinklige Cantilever. [Bennewitz, 2000; Gnecco, 1999]

2.1.3 Scanner

Die präzisen Rasterbewegungen und die Nachführung der Detektorsignale im Subnanometer- bis Mikrometerbereich werden durch Piezokeramikelemente bewerkstelligt. Ein piezoelektrischer Kristall ändert seine Geometrie durch Anlegen einer elektrischen Spannung. Für die Ausführung von Bewegungen in alle drei Raumrichtungen gibt es zwei verschiedene Typen von AFM-Scanner. Der Dreibeinscanner besteht aus drei einzelnen Piezokristallen, während sich der Röhrencyber als Einheit in alle drei Richtungen bewegen kann.

Die Scanner werden mit Hilfe von Eichgittern in x-, y- und z-Richtung kalibriert. Die Eichgitter bestehen aus geätzten Vertiefungen oder Erhebungen definierter Periodizität und Höhe.

2.1.4 Blattfedern

Um zerstörungsfrei messen zu können, werden möglichst weiche Cantilever eingesetzt. Die Kräfte zwischen zwei einzelnen Atomen liegen im Bereich von 10^{-13} - 10^{-9} N [Israelachvili, 1991]. Bei einer geschätzten Empfindlichkeit des Detektors von 0.01 nm bedarf es demzufolge nach dem Hook'schen Gesetz (Kraft = Federkonstante x Auslenkung) einer Feder mit einer Kraftkonstante k von 0.01 – 100 N/m. Die Cantilever müssen zudem eine möglichst kleine Masse m haben, damit ihre Resonanzfrequenzen gross werden und Gebäude- und Gerätevibrationen auf die Messung nicht störend wirken. Die Resonanzfrequenz ω_0 ist gegeben durch

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (2.1)$$

Die meisten der heute verwendeten Cantilever mit einer integrierten Spitze werden ätztechnisch aus Silizium und Siliziumnitrid hergestellt. *Abbildung 2.2* zeigt eine pyramidale Einkristall Silizium Spitze mit einem Spitzenradius von ca. 10 nm. Die Spitzenhöhe misst 10-15 μm . Solche rechteckigen Balkenfedern messen typischerweise 100-400 μm in der Länge und sind ca. 2-4 μm dick.

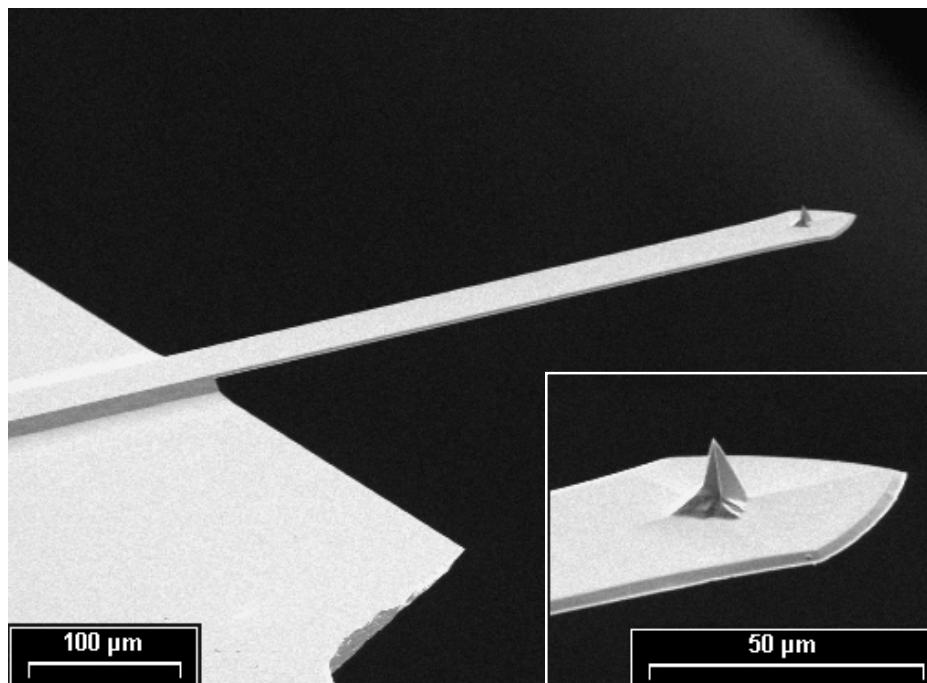


Abbildung 2.2: Rasterelektronenaufnahme der Unterseite einer Kontaktmodus-Balkenfeder aus Silizium mit integrierter, pyramidaler Messspitze (Inset).

Es sind aber auch andere Formen von Blattfedern erhältlich. V-förmige Cantilever mit einer integrierten Messspitze aus Siliziumnitrid erlauben eine Dicke von nur $0.5\ \mu\text{m}$. Die Rückseite der Cantilever wird zur besseren Reflexion des Laserstrahls häufig mit Gold oder Aluminium beschichtet.

2.1.5 Kraftspektroskopie

Die Kraftspektroskopie ist ein Beispiel für die vielseitige Anwendung des Rasterkraftmikroskopes [Baumgartner, 2000; Dammer, 1996; Rief, 1997; Ros, 1998; Strunz, 1999]. Bei dieser Methode wird der Cantilever zur lokalen Kraftmessung zwischen der Spitze und der Probe ausgenutzt. Dazu wird die Messspitze an die Oberfläche angenähert, bis sich der Cantilever beim Kontakt mit der Oberfläche verbiegt, und wieder zurückgezogen. Bei jedem Durchgang wird die Auslenkung des Cantilevers registriert und zur Interpretation der wirkenden Kräfte verwendet. Eine solche Kraft-Distanz Kurve ist schematisch in *Abbildung 2.3* dargestellt.

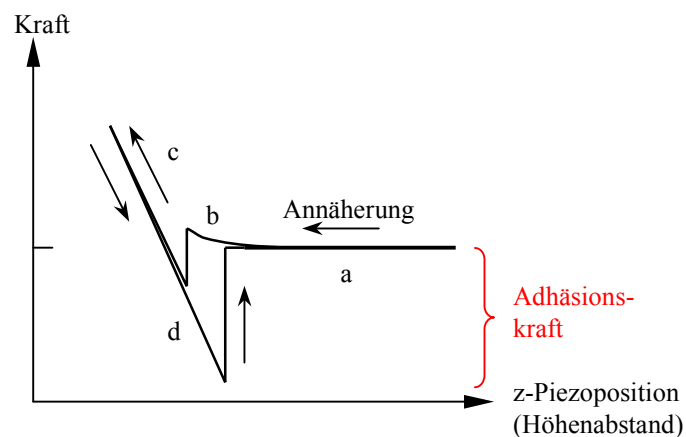


Abbildung 2.3: Kraft-Distanz Diagramm

Wir unterscheiden vier verschiedene Bereiche a - d. Ist die Spitze weit von der Oberfläche entfernt (a) schwingt der Cantilever im thermischen Gleichgewichtszustand. Wird der Abstand verkleinert, können langreichweitige, abstossende Kräfte (z.B. elektrostatische) zu einer vorübergehend repulsiven Auslenkung des Cantilevers führen (b). An einem bestimmten Punkt springt die Spitze plötzlich in Kontakt mit der Oberfläche. An dieser Stelle dominieren anziehende Van der Waals Kräfte, welche grösser als die abstossenden Kräfte und die Kraft der Feder sind. Bei fortgesetzter Bewegung gegen die Probenoberfläche wird die Feder proportional zur z-Piezoposition ausgelenkt (c). Hier ist die Spitze in ständigem Kontakt mit der Oberfläche. Aus der Steigung dieser Kurve lässt sich zusammen mit der Federkonstante des Cantilevers das Signal der Photodiode in effektive Kräfte umrechnen. Beim Zurückziehen

bleibt die Spitze länger in Kontakt mit der Oberfläche, wenn Adhäsionskräfte wirken (d). In diesem Fall erfährt der Cantilever eine attraktive Auslenkung, bis wieder die Federkraft überwiegt und die Bindung abreisst. Die Grösse des Abrissprunges wird als Abriss- oder Adhäsionskraft bezeichnet.

2.1.6 Ermittlung der Federkonstanten

Die Federkonstante des Cantilevers ist eine wichtige Grösse zur Bestimmung der Wechselwirkungskräfte, welche im AFM gemessen werden können. Die Federkonstanten lassen sich rechnerisch oder empirisch bestimmen.

Geometrische Methode

Die rechnerische Methode setzt die Kenntnis über Geometrie und Materialeigenschaften der Feder voraus, andernfalls müssen die Daten mit Hilfe anderer Methoden (z.B. Rasterelektronenmikroskop) zuerst ermittelt werden. Die Federkonstante k eines rechteckigen Balkenlevers lässt sich dann mit der Länge l , der Dicke t , der Breite w und dem Elastizitätsmodul E in Biegerichtung berechnen:

$$k = \frac{Et^3 w}{4l^3} \quad (2.2)$$

Zwei-Feder-Methode

Mit der Zwei-Feder-Methode [Gibson, 1996] lässt sich die Federkonstante einer unbekanntes Feder bestimmen, indem sie auf eine zweite Feder (Eichfeder) mit bekannter Federkonstante gedrückt wird. Die Auslenkung der gesamten Anordnung ergibt dann unter Berücksichtigung der Sensitivität des Detektors die gewünschte Federkonstante.

Methode mit Zusatzgewicht

Von Cleveland [1993] wurde eine weitere Kalibrationsmethode beschrieben. Dabei wird die Verschiebung der Resonanzfrequenz gemessen, welche durch Anbringen einer zusätzlichen Masse auf die Feder verursacht wird. Aus den Frequenzen vor und nach Belastung und der Masse des Zusatzgewichtes lässt sich die Federkonstante bestimmen.

Methode nach dem thermischen Rauschen

Die Bestimmung der Federkonstanten über das thermische Rauschverhalten nach Hutter und Bechhoefer [1993] birgt den Vorteil, dass die Methode direkt vor oder nach einer Messung im AFM durchgeführt werden kann, ohne dass dabei die Güte des Cantilevers beeinträchtigt wird. Dies bedeutet, dass die Methode auch gleichzeitig Hinweise auf Veränderungen der Spitze im Laufe der Messungen liefert.

Ein harmonischer Oszillator schwingt im Gleichgewichtszustand durch die thermische Bewegung seiner Umgebung (sog. thermisches Rauschen). Nach dem Gleichverteilungssatz entspricht die in dieser Schwingung gespeicherte Energie gerade $k_B T/2$:

$$\left\langle \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (2.3)$$

wobei ω_0 die Resonanzfrequenz, q die Auslenkung, k_B die Boltzmannkonstante, m die Masse und T die Temperatur in Kelvin ist. Aus $\omega_0^2 = k/m$ (Gl. 2.1) folgt für die Federkonstante k

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \quad (2.4)$$

Weil die Resonanzfrequenzen der zusätzlichen Geräuschequellen nicht im Bereich der Resonanz des Cantilevers liegen, kann das Hintergrundrauschen vom Spektrum abgezogen werden. Die Fläche P unter der Resonanzkurve ist dann ein Mass für das thermische Rauschverhalten des Cantilevers und entspricht dem mittleren Quadrat der Auslenkung. Es ergibt sich für die Federkonstante k

$$k = \frac{k_B T}{P}. \quad (2.5)$$

2.2 Glas

Glas als technischer Werkstoff ist in vielen Bereichen, wie Optik, Chemie, Pharmazie und Elektronik, häufig verbreitet und in ständiger Entwicklung. Die chemische Zusammensetzung des Glases beeinflusst die Struktur seines Netzwerkes und bestimmt damit wesentlich die verschiedenen Eigenschaften von Glas.

Glas ist als anorganischer Feststoff amorph und schmilzt deshalb nicht bei einer definierten Temperatur, sondern geht in einem breiten Erweichungsintervall vom spröden zum flüssigen Zustand über. Für technische Gläser werden hauptsächlich natürlich vorkommende Rohstoffe verwendet. Reines Kieselglas (Quarzglas) wird durch Schmelzen von reinem Bergkristall erhalten. Kalknatrongläser werden aus Quarzsand, Soda und Kalk hergestellt. Die für die pharmazeutische Industrie bedeutenden Borsilikatgläser (Neutralgläser) weisen einen hohen Gehalt an Kieselsäure (70-80%) und nennenswerte Anteile an Borsäure (>7%) auf.

2.2.1 Struktur

Die Fähigkeit zur Glasbildung besitzen chemische Stoffe, welche unter bestimmten technologischen Bedingungen ganz spezifische Netzwerke bilden. Solche Netzwerkbildner sind hauptsächlich Sauerstoffverbindungen (Oxide) von Silizium, Bor, Germanium, Phosphor und Arsen [Pfaender, 1997]. Während die Netzwerkbildner durch Sauerstoffbrücken räumlich untereinander vernetzt sind, werden Netzwerkwandler, wie Natrium- und Kaliumoxide, ionisch eingebunden und weiten die Struktur auf (*Abbildung 2.4*).

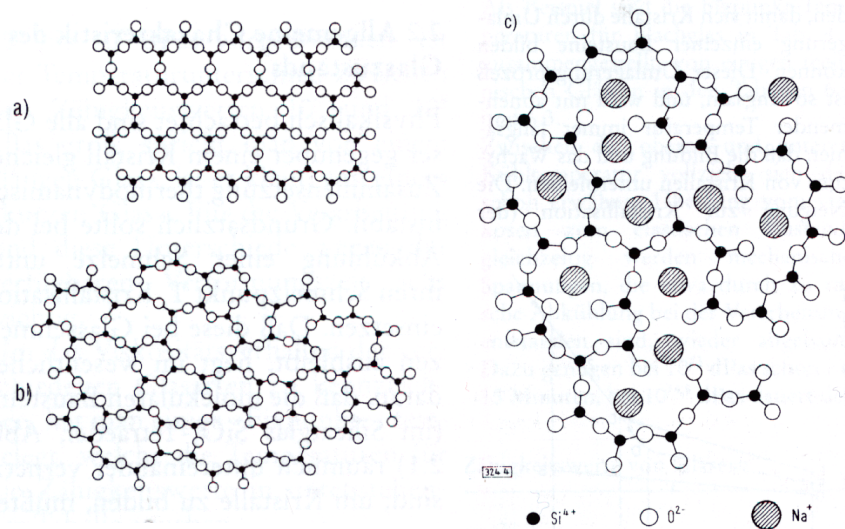


Abbildung 2.4: Zweidimensionale Darstellung des Netzwerks von SiO_4 -Tetraedern. a) im Kristall, b) im reinen Silikaglas und c) im Natriumsilikatglas [nach Pfaender, 1997].

2.2.2 Physikalische Eigenschaften

Im Unterschied zu Schmelzen, welche bei Unterschreitung ihres Schmelzpunktes kristallisieren, erstarren Glasschmelzen beim Abkühlen ohne Kristallisation. Deshalb wird Glas manchmal auch als eingefrorene unterkühlte Flüssigkeit betrachtet, die mit sinkenden Temperaturen eine unendlich hohe Viskosität annimmt [Pfaender, 1997]. Der Grund für das Ausbleiben der Kristallisation liegt im wesentlichen in der Vernetzung der molekularen Bausteine, z.B. der Siliziumoxid-Tetraeder im Silikatglas. Das Aufbrechen von Bindungen und damit die Voraussetzung für eine Kristallbildung geschieht im Glas nur sehr langsam.

In *Abbildung 2.5* ist dieser grundlegende Unterschied schematisch dargestellt:

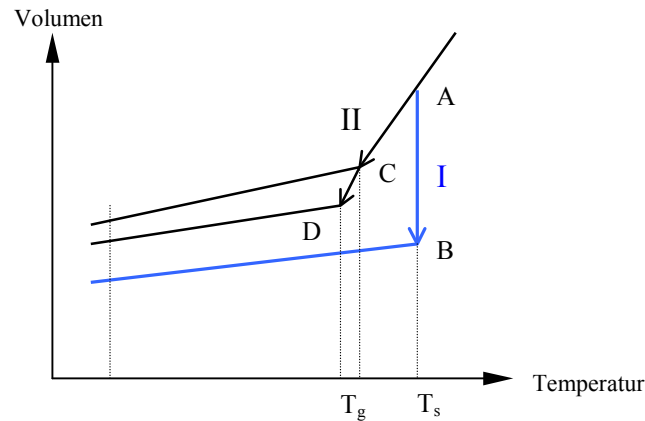


Abbildung 2.5: Volumenänderung einer Schmelze im Verlauf der Abkühlung bei (I) Kristallbildung und (II) Glasbildung. [nach Pfaender, 1997]

Sobald die Temperatur auf den Schmelzpunkt T_s abgesunken ist, kristallisiert die Schmelze in Fall I aus, und das Volumen springt von Punkt A nach B. Im Fall II verdichtet sich die unterkühlte Schmelze kontinuierlich bis zu Punkt C. Erfolgt die Abkühlung genügend langsam, geht die unterkühlte Schmelze vom viskosen in den elastischen Zustand über, Punkt D. Der Temperaturbereich von C bis D wird als Transformationsbereich T_g bezeichnet. Die Kurve flacht bei weiterer Abkühlung an Punkt C resp. D ab und erreicht auch bei Raumtemperatur die Packungsdichte einer auskristallisierten Schmelze nicht.

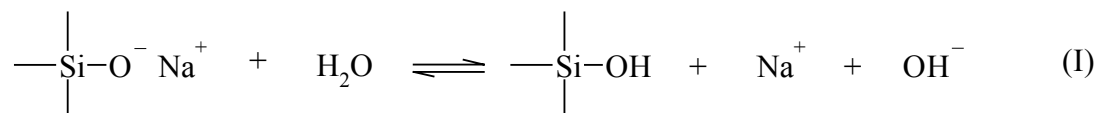
Der Verlauf der Viskosität in Abhängigkeit der Temperatur ist für die Glasverarbeitung von wichtiger Bedeutung und für jede Glassorte charakteristisch. Eine homogene Schmelze wird bei einer Viskosität η von 10^2 dPa·s erreicht. Die Heissverarbeitung erfolgt bei Temperaturen, bei der $\eta = 10^3$ bis 10^8 dPa·s. Der Transformationsbereich wird durch den oberen (10^{13} dPa·s) und den unteren Kühlpunkt ($10^{14.5}$ dPa·s) festgelegt. Hier werden mechanische Spannungen, die durch zu rasche Abkühlung bei der Verarbeitung entstanden sind, im Kühllofen abgebaut.

Dieses allgemeine Verhalten ändert sich auch durch Zumischung anderer Metallverbindungen nicht, sondern hat nur entsprechende Änderungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften zur Folge. Der Einbau von Alkalioxiden als Netzwerk wandler bewirkt beispielsweise eine Erniedrigung der Schmelztemperatur und einen Anstieg des Wärmeausdehnungskoeffizienten α . Dieser ist ein Maß für die Wärmedehnung und beschreibt die konstante Volumenzunahme, resp. die relative Längenänderung ($\Delta l/l$) pro Grad Celsius, im Temperaturbereich von 0-300 °C. Im Bereich, wo diese Längenausdehnung nicht mehr konstant, sondern mit der

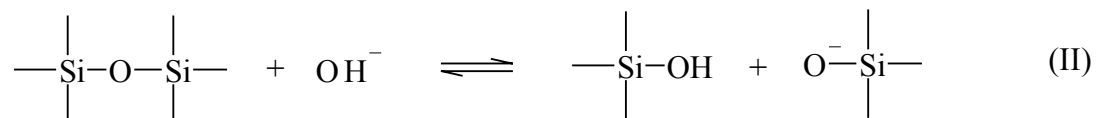
Temperatur exponentiell zunimmt, ist die Transformationstemperatur T_g definiert. Sie liegt für pharmazeutische Gläser zwischen 500 und 600 °C.

2.2.3 Chemische Eigenschaften

Die chemische Beständigkeit definiert die Widerstandsfähigkeit der Glasoberfläche gegenüber chemischer Agenzien. Dabei sind immer Wasser bzw. seine Dissoziationsprodukte, H^+ - und OH^- Ionen, beteiligt. Infolgedessen erfolgt die Einteilung der Gläser aufgrund der unterschiedlichen hydrolytischen (Wasser-), Säure- und Laugenbeständigkeit des Glases. Durch Einwirkung von Wasser und Säure werden geringe Mengen besonders ein- und zweiwertiger Kationen herausgelöst. Es findet ein Austausch zwischen Alkaliionen des Glases und Hydroniumionen des angreifenden Mediums statt:



Die Verarmung von Glasbestandteilen an der Oberfläche führt zur Anreicherung von schwerlöslicher Kieselsäure und somit zur Bildung einer dünnen Kieselgelschicht, die normalerweise den weiteren Angriff hemmt. Laugen vermögen jedoch das Silikatnetzwerk aufzubrechen und tragen die Oberfläche ungehindert gesamthaft ab:



Im Gegensatz zu Säuren und Wasser wächst die Angriffswirkung von Laugen mit steigender Konzentration.

Aus Reaktion (I) geht hervor, dass die Auslaugung in reinem Wasser mit einem Anstieg des pH-Wertes gekoppelt ist und somit gleichzeitig eine Netzwerkauflösung nach (II) zur Folge hat. Während die Netzwerkauflösung in verdünnten Säuren und gepufferten Lösungen vernachlässigbar ist, spielt sie in Wasser und salzhaltigen Lösungen eine bedeutende Rolle [Scholze, 1985]. Der erhöhte Glasangriff durch Neutralsalze, wie Natriumchlorid, wird auf einen katalytischen Einfluss der Chloridionen auf die Si–O–Si-Spaltung zurückgeführt.

Wasserfreie und organische Lösungen treten praktisch nicht in Wechselwirkung mit dem Glas.

Hydrolytische Klassen

Eine mögliche Einteilung der Gläser erfolgt anhand der hydrolytischen Resistenz. Diese wird durch das Griess-Titrations- und Oberflächenverfahren bestimmt. Beim Griessstest wird das Glas bis zu einer bestimmten Korngrösse zerschlagen und mit Wasser bei erhöhter Temperatur ausgelaugt. Das abgegebene Alkali wird dann mit Salzsäure titriert. Der Säureverbrauch bzw. die Alkaliabgabe dient zur Einordnung in die, in *Tabelle 2.1* aufgeführten, hydrolytischen Klassen.

Das Oberflächenverfahren prüft nicht das Gesamtglas, sondern nur die intakte Innenoberfläche eines Behälters und ist damit aus pharmazeutischer Sicht von eigentlichem Interesse. Die Glasbehältnisse werden mit Wasser gefüllt und während 1 Stunde im Autoklaven bei 121°C erhitzt. Die Titration mit Säure der Auslauglösung ergibt Aufschluss auf die hydrolytische Beständigkeit der Glasoberfläche.

Nach dem gültigen Arzneibuch [Pharm. Helv. 8] müssen alle Glasbehältnisse für parenteralen Gebrauch den Anforderungen der hydrolytischen Klasse I entsprechen. Man redet deshalb auch von Typ I Gläsern.

Hydrolytische Klasse	Säureverbrauch (0.01mol/l HCl) je 10.0 g Griess	Säureverbrauch (0.01mol/l HCl) je 100 ml Prüflösung	Bezeichnung der Glasart
I	≤ 2.0 ml	≤ 1.8 ml	Neutralglas mit grosser hydrolytischer Resistenz aufgrund chem. Zusammensetzung
II	≤ 17.0 ml	≤ 1.8 ml	Natronkalksilikatglas mit grosser hydrolytischer Resistenz bedingt durch geeignete Oberflächenbehandlung
III	≤ 17.0 ml	≤ 17.6 ml	Natronkalksilikatglas mit mittlerer hydrolytischer Resistenz
IV	≤ 30.0 ml	-	Natronkalksilikatglas mit geringer hydrolytischer Resistenz

Tabelle 2.1: Grenzwerte für Glasbehältnisse mit einem Füllvolumen von über 1 bis 2 ml [nach Pharm.Helv.8].

2.2.4 Borsilikatgläser in der Pharmaindustrie

Die Verwendung von Borsilikatglas für Glasbehältnisse in der pharmazeutischen Industrie ist auf die Entdeckung von Otto Schott im Jahre 1892 zurückzuführen. Borsilikatgläser zeichnen sich durch ihre hohe chemische Beständigkeit, ihre relativ geringe Wärmeausdehnung und der dadurch hohen Temperaturbelastbarkeit aus.

Der Anteil netzwerkbildender Bestandteile in Borsilikatgläsern liegt für Siliziumdioxid bei 70-80% und für Bortrioxid bei 7-13%. Aluminiumoxide (2-7%) wirken sich stabilisierend auf

das Silikatnetzwerk aus. Ionisch gebundene Natrium- und Kaliumoxide erniedrigen die Schmelztemperatur und sind mit 4-8% vertreten. Erdalkalioxide, wie Calcium-, Magnesium- und Bariumoxide, führen zusammen mit den Alkalioxiden zu einer Erniedrigung des Schmelzbereiches, sowie zu einer Erhöhung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten.

Die Familie der Borsilikatgläser ist sehr umfangreich. Für die vorliegende Arbeit standen insgesamt 7 verschiedene Borsilikatgläser zur Verfügung, die sich durch das Verhältnis und die Kombination der chemischen Bestandteile, sowie ihrer Ausdehnungskoeffizienten wiederum in zwei Gruppen gliedern lassen. Die thermische Ausdehnung der erdalkalihaltigen Borsilikatgläser (Neutralgläser) liegt zwischen $49 - 55 \times 10^{-7} (\text{°C})^{-1}$, die der nicht erdalkalihaltigen Gläser um den Wert $33 \times 10^{-7} (\text{°C})^{-1}$. Ein höherer Ausdehnungskoeffizient bedeutet gleichzeitig ein höherer Anteil an Erdalkali- und Alkalimetallen und somit einen tieferen Schmelzbereich. SCHOTT DURAN[®] und KIMBLE KG-33[®] sind Spezialgläser mit tiefen thermischen Längenausdehnungen; sie werden bei ungefähr 1260 °C verarbeitet. SCHOTT FIOLAX[®] ist ein Beispiel für erdalkalihaltige Neutralgläser, deren Verarbeitungstemperatur energetisch günstiger bei 1145 - 1170 °C liegt [Pfaender, 1997].

Glasrohr

Das gebräuchlichste Verfahren zur maschinellen Herstellung von Glasrohr ist das Dannerverfahren. Ein kontinuierlicher Strang von Glasschmelze läuft auf die langsam rotierende, mit Keramik oder Platin beschichtete Dannerpfeife. Am unteren Ende der schräg gestellten Pfeife wird das Glas abgezogen, wobei durch Zuführung von Luft durch die Dannerpfeife ein Hohlraum entsteht. Das erstarrende Glasrohr wird durch die Ziehvorrichtung in die Horizontale auf ein Rollband geleitet und ausgekühlt. Durch Thermoschock erfolgt anschliessend die Trennung in ca. 1.5 m lange Rohrstücke.

Beim Velloverfahren wird das Glas zunächst in der Vertikalen zu einem Rohr geformt. Das noch weiche Glas wird waagrecht umgeleitet und wie beim Dannerverfahren über eine Rollenbahn abgezogen, gekühlt und zugeschnitten.

Ampullenflaschen und Fertigspritzen

Die Weiterverarbeitung zu pharmazeutischen Behältnissen, wie Ampullenflaschen (englisch: *vials*) oder Fertigspritzen (*Abbildung 2.6*), geschieht wiederum aus vertikaler oder horizontaler Lage. Das Prinzip bleibt sich jedoch für beide Verfahren gleich. Für die Fertigung von Vials und Fertigspritzen wird das Glasrohr an einem Ende in mehreren Schritten mit der Gasflamme erhitzt und mit Hilfe von Werkzeugen in die gewünschte Form gebracht. Auf

entsprechender Höhe oberhalb des so geformten Vialhalses oder Spritzenausguss wird das Rohr dann durch Hitzeschock vom restlichen Glasrohr getrennt und in der Flamme fertiggestellt. Im Gegensatz zur Formung der Fingerauflage einer Fertigspritze muss bei einem Vial bedeutend mehr Energie aufgewendet werden, bis der Boden gleichmässig und vollständig verschlossen ist.

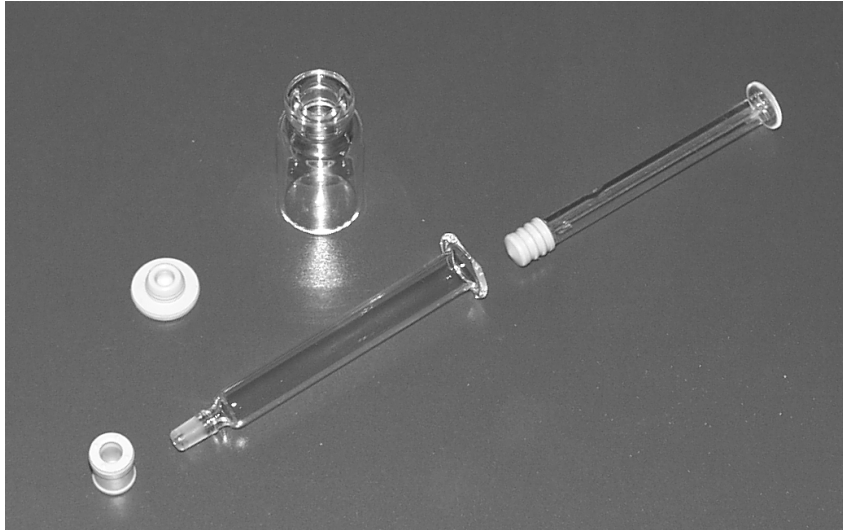


Abbildung 2.6: Ampullenflasche (Vial) und Fertigspritze mit Teflonbeschichteten Gummistopfen und Plastikkolbenstangen.

Zur Beseitigung von jeglichen Spannungen im Glaskörper werden die Behältnisse anschliessend auf Rollbändern durch einen sog. Entspannungs- oder Kühllofen geführt. Dieser muss auf Temperaturen im Transformationsbereich des Glases eingestellt sein.

Die Anreicherung von Alkaliionen an der Oberfläche wird durch die Hitzeeinwirkung begünstigt. Nur durch optimale Einstellung der Temperatur während des gesamten Verformungsprozesses kann somit die hydrolytische Resistenz und die Qualität der Behältnisse gewährleistet werden.

Die Innenoberflächen von Fertigspritzen werden vor dem Abfüllen mit Wirkstofflösung im pharmazeutischen Betrieb mit einer dünnen Silikonschicht ausgekleidet. Die Silikonisierung ist für das Gleiten des Stopfens an der Glaswand erforderlich.

Type 1 plus®

Für hochempfindliche Produkte gegenüber pH-Veränderungen oder Ionenfreisetzung, sowie für Formulierungen mit niedrigdosierten oder komplexbildenden Wirkstoffen wurde von SCHOTT, Deutschland ein spezielles Beschichtungsverfahren für Glas entwickelt, das den Anforderungen dieser Produkte gerecht wird [Walther, 1998].

Ein Gasgemisch, das Silizium und Sauerstoff enthält, wird durch Mikrowellenenergie gezündet. Die Elektronen im Plasma brechen die organische Siliziumverbindung auf. Positiv geladene Siliziummonooxid-Ionen diffundieren an die Glaswand und reagieren dort mit überschüssigem Sauerstoff zu Siliziumdioxid. Eine quarzähnliche Schicht bis zu 200 nm Dicke wird aufgebaut.

Dank dieser äusserst inerten Schutzschicht liegt die Ionenfreisetzung des Glases nunmehr unter der Detektionsgrenze eines Atomabsorptionsspektroskopes und übertrifft somit die Anforderungen der Arzneibücher an ein Glasbehältnis für Parenteralia bei weitem.

2.3 Glimmer

Glimmer ist ein in der Natur vorkommendes, nichtleitendes Schichtenmaterial, das sehr einfach spaltbar ist. Mit Hilfe eines Messers oder Klebebands lassen sich saubere und atomar flache Oberflächen von Glimmer präparieren.

Der strukturelle Aufbau ist chemisch sehr komplex. Es existieren verschiedene Formen von Glimmer. Die Hauptkomponenten sind wie beim Glas Siliziumoxid-Tetraeder [Greenwood, 1990]. Diese sind in Glimmer aber nicht dreidimensional miteinander vernetzt, sondern sie berühren sich nur mit drei Ecken und bilden zweidimensionale Schichten, sog. Phyllosilikate (griechisch: *phyllos*, Blatt), aus. Die chemische Formel der Phyllosilikate lautet $(\text{Si}_2\text{O}_5)_n^{2n-}$. Positiv geladene Metallionen, z.B. Magnesium- oder Aluminiumionen, kompensieren die negativen Ladungen zweier Phyllosilikatschichten. Es sind aber letztendlich starke ionische Bindungen, die den Glimmer zusammenhalten. Deshalb sind einige Siliziumatome des Phyllosilikatgitters durch Aluminiumatome ersetzt. Daraus resultiert wiederum eine insgesamt negative Ladung der einzelnen Doppelschichten, welche durch die Anlagerung von positiv geladenen Metallionen, z.B. Kaliumionen, stabilisiert wird.

Die minimale Höhe einer spaltbaren Glimmerschicht beträgt 1 nm und wird in der Raster-sondenmikroskopie häufig zur Kalibrierung verwendet [Drake, 1989; Fritz, 1995].

2.4 Interferone

Interferone sind Proteine, welche die Widerstandskraft von tierischen Zellen gegenüber zahlreichen Viren steigern. Sie sind hochaktive, speziesspezifisch wirkende Proteine mit einem Molekulargewicht von 15000 bis 35000 Dalton [Stryer, 1991]. Sie werden nach einer Virusinfektion, insbesondere durch doppelsträngige RNA-Viren, synthetisiert und abgesondert. Das freigesetzte Interferon bindet dann an spezifische Rezeptoren an der Oberfläche anderer, noch nicht infizierter Zellen, und schützt somit Nachbarzellen vor einem Virusbefall.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen immunologischen, biologischen und chemischen Eigenschaften wurden Interferone in zwei Klassen eingeteilt [Klaus, 1997]. In die erste Klasse gehören die Familien der α - und der β -Interferone. α -Interferone werden von Leukozyten gebildet, β -Interferone von Fibroblasten. Sie besitzen neben einer antiviralen, auch eine wachstums- und zellteilungshemmende Wirkung auf verschiedene menschliche Tumorzellen. γ -Interferone werden ausschliesslich in Lymphozyten produziert und bilden die zweite Klasse der Interferonproteine.

Der antivirale Effekt der Interferone kommt über die Stimulation zweier Enzyme zustande. Beide Enzyme, die Proteinkinase und die Oligoadenylat-Synthetase, werden auch in Anwesenheit doppelsträngiger RNA aktiv. Durch die Aktivierung der Proteinkinase wird der Initiationsfaktor der Translation phosphoryliert, was zum Stillstand der Proteinsynthese führt. Die Oligoadenylat-Synthetase aktiviert die Endoribonuclease RNase L und bewirkt damit den Abbau von mRNA-Matrizen und der rRNA-Komponenten der Syntheseapparates. Beide Mechanismen stören die Virusvermehrung durch Hemmung der Proteinsynthese, z.B. von Virushüllproteinen.

Durch Steigerung der Aktivität von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten wirken Interferone auch immunmodulierend.

2.4.1 Interferon α -2a

Innerhalb aller Subtypen von α -Interferon besteht eine 80-prozentige Homologie der Aminosäuresequenz. Interferon α -2a setzt sich aus 165 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 19000 Dalton [Morant, 1997].

Wegen Schwierigkeiten bei der Kristallisation infolge unspezifischer Proteinaggregation erfolgte die dreidimensionale Strukturaufklärung von Interferon α -2a erst 10 Jahre nach der Einführung des Medikamentes zur Behandlung von Viruserkrankungen [Klaus, 1997].

Interferon α -2a wird zur Behandlung der Haarzell-Leukämie, des Kaposi-Sarkoms bei Aids-Patienten und anderen Krebsformen eingesetzt, sowie vor allem auch für Infektionen mit Hepatitis B und C.

Das Protein wird gentechnisch unter Verwendung genmanipulierter *Escherichia coli* Bakterien hergestellt [Pestka, 1987]. Diese enthalten ein durch rekombinante DNA-Technologie verändertes Genom, das die Information zur Interferonproduktion trägt. Die biologische Aktivität von Interferon α -2a wird in Internationalen Einheiten (IU) ausgedrückt. Eine Internationale Einheit entspricht genau der Menge Wirkstoff, die für den Schutz von 50% der mit einer bestimmten Menge Virus infizierter Zellen nötig ist [De Maeyer, 1983].

Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Primärstruktur von Interferon α -2a (Abbildung 2.7) gibt Aufschluss über das Ladungsverhältnis in wässrigen Lösungen. Anhand der Anzahl Aminosäuren und der pK -Werte ihrer funktionellen Gruppen lässt sich die Nettoladung des Proteins bei jedem pH ermitteln. Der isoelektrische Punkt ist der pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins Null ist. Für Interferon α -2a liegt dieser Wert zwischen pH 5.5 und 6.0. Die maximale Löslichkeit von Interferon α -2a wurde bei einem pH von ca. 3.5 und bei geringer Ionenstärke gefunden [Klaus, 1997]. Generell schien das Protein bei tiefem pH und in der Kälte (4°C) besser löslich zu sein.



Abbildung 2.7: Primärsequenz von Interferon α -2a mit den beiden Disulfidbrücken, welche die charakteristische Faltung des Proteins mitbestimmen.

Die vereinfachte Darstellung in *Abbildung 2.8* der dreidimensionalen Struktur von Interferon α -2a zeigt die charakteristischen fünf α -Helices (A-E), die das Rückgrat des gefalteten Proteins bilden. Die beiden Disulfidbrücken, eingezeichnet als gelbe, kugelförmige Schwefelatome, tragen viel zur Stabilität und Aktivität des Proteins bei. Das Innere der Helices ist räumlich fixiert und weist vorwiegend hydrophobe Gruppen auf, während aussenständige Domänen (in blau gezeichnet) beweglich und hydrophil sind. Dies ermöglicht strukturelle Anpassungen für intermolekulare Kontakte, beispielsweise zum Rezeptormolekül.

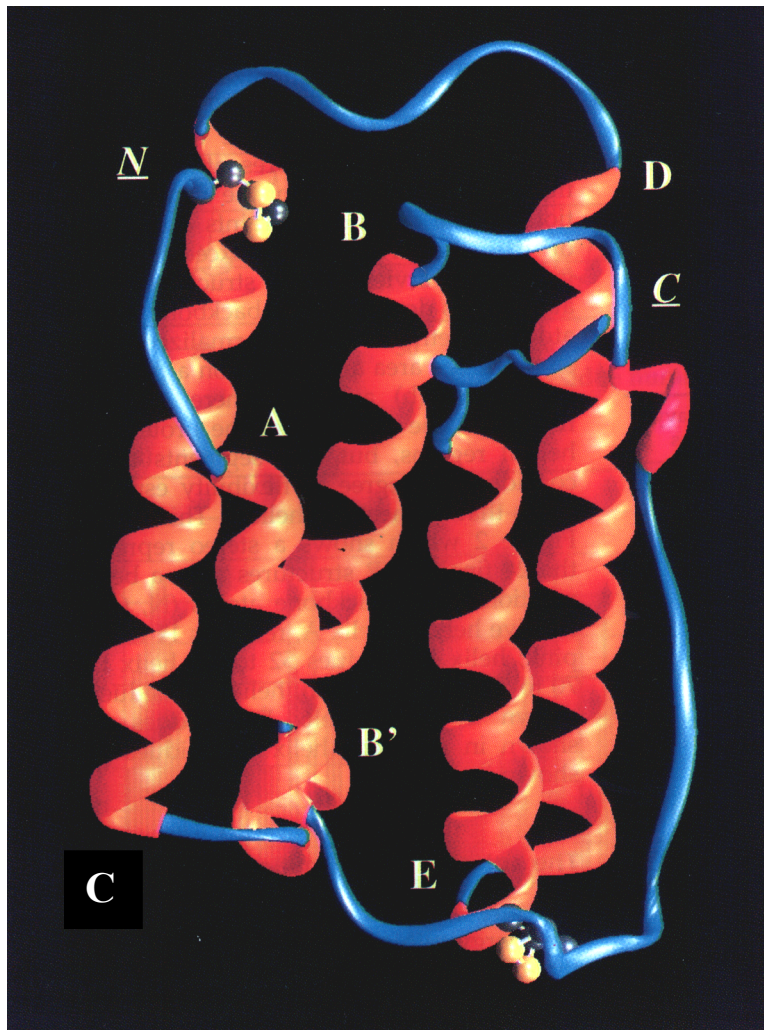


Abbildung 2.8: Dreidimensionale Bänderdarstellung der fünf charakteristischen α -Helices (A-E) in der NMR-Struktur von Interferon α -2a. Die beiden Enden der Aminosäurekette sind mit N und C markiert. [nach Klaus, 1997]

2.5 Immobilisierung

In der Biotechnologie spielen Immobilisierungsmethoden eine wichtige Rolle. Die hohe Affinität vieler Proteine zu chemischen Gruppen wird in der Affinitäts-Säulenchromatographie zur Reinigung und in Immunoassays zur Bestimmung und quantitativen Analyse von Proteinen ausgenutzt. Immunoassays sind Systeme, die auf einem Substrat eine grosse Anzahl hochspezifischer Antikörper oder andere proteinerkennende Elemente tragen. Dank der spezifischen Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor können nun verschiedene Proteine gleichzeitig unter den gleichen Bedingungen gemessen und analysiert werden. Eine weitere Anwendung findet die Immobilisierungstechnologie in der automatisierten Festphasenmethode zur Synthese von Polypeptidketten. Die Aminosäuren werden dabei schrittweise an eine wachsende Peptidkette angefügt, die an eine unlösliche Matrix, beispielsweise Polystyrolkugeln, gebunden ist.

In der Rasterkraftmikroskopie werden biologische Moleküle auf eine Oberfläche oder auf die Messspitze fixiert, um spezifische Wechselwirkungen messbar zu machen. Für jedes Molekül muss die geeignete Immobilisierungsmethode individuell gefunden werden. Eine grosse Herausforderung bleibt dabei die Erhaltung der Funktionalität des Moleküls auf der Oberfläche im Vergleich zur löslichen Form.

2.5.1 Substrate

Die Abbildung von biologischen Materialien erfordert ein möglichst flaches Substrat. Die nötige Oberflächenrauheit hängt von der Grösse der abzubildenden Moleküle ab. Häufig verwendete Substrate für Proteine sind Glimmer [Drake, 1989; Fritz, 1995; Müller, 1997, 1999], Graphit (HOPG, *highly oriented pyrolytic graphite*) [Cullen, 1994] und Gold [Rief, 1997; Ros, 1998; Wagner, 1996]. Glas- und Siliziumoberflächen werden insbesondere wegen der einfach durchführbaren Silanisierung (siehe Abschnitt 2.5.2) verwendet, wenn Oberflächen mit einem bestimmten Hydrophilisierungsgrad erwünscht sind [Ludwig, 1997; Stuart, 1995; Wälivaara, 1995].

Manche Substrate vermögen Biomoleküle ohne zusätzliche Behandlung direkt auf ihrer Oberfläche zu binden. Gold bildet beispielsweise quasi-kovalente Bindungen mit freien Thiolgruppen des Moleküls. Eine andere Möglichkeit bietet die direkte Adsorption von Molekülen auf der Oberfläche durch physikalisch-chemische Wechselwirkung, die sog. Physisorption.

Der Ladungszustand einer Oberfläche und der zu immobilisierenden Moleküle in einer Pufferlösung wird durch den isoelektrischen Punkt beschrieben. Wird der Puffer auf den pH-Wert eingestellt, wo Oberfläche und Molekül ungleichnamige Ladungen besitzen, werden sie

angezogen. Sind Oberfläche und Molekül gleichnamig geladen, können divalente Ionen entgegengesetzter Ladung als Salzbrücken dienen. Aus diesem Grund adsorbiert DNA trotz seiner negativen Ladung auf Glimmer, wenn Kationen wie Mg^{2+} oder Ni^{2+} gegenwärtig sind [Shao, 1996].

Auf einem hydrophoben Substrat lassen sich Proteine und andere Moleküle in wässrigen Lösungen im allgemeinen gut adsorbieren, weil hydrophobe Oberflächen versuchen, die energetisch ungünstige Grenzfläche mit Wasser zu reduzieren. Ferner basiert die physikalische Adsorption auf anziehenden Van der Waals Kräften und Hydratisierungskräften.

2.5.2 Methoden für kovalente Immobilisierung

Insbesondere bei der Kraftspektroskopie muss die Haftung der gekoppelten Moleküle an das Substrat (z.B. Protein an Messspitze) stärker sein, als die im Experiment zu messenden Adhäsions- oder Bindungskräfte zwischen Molekül und Oberfläche.

Eine reproduzierbare und zuverlässige Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen auf ein Substrat erfolgt über die Bildung von sog. selbst-organisierenden Monolagen (englisch: *self-assembled monolayers, SAMs*). Solche homogenen Monolagen bilden u.a. langkettige, unverzweigte Alkanthiole und Silane auf Gold resp. Glas- und Siliziumsubstraten aus.

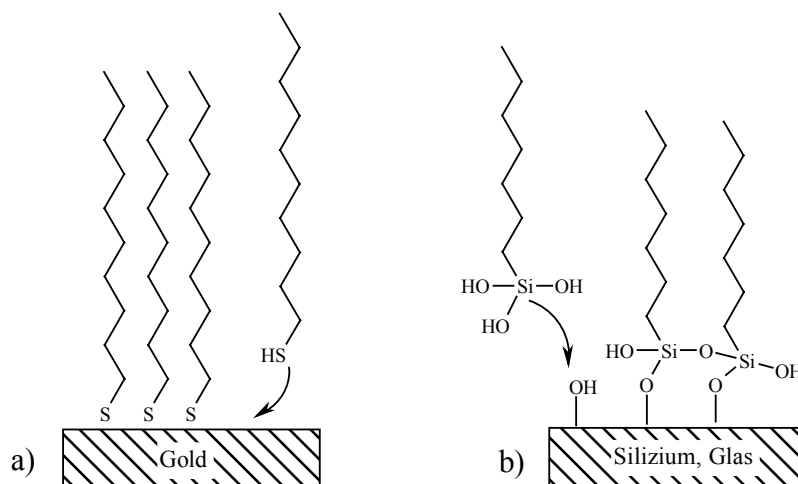


Abbildung 2.9: Immobilisierung von a) Thiolen auf Goldoberflächen und b) Silanolgruppen auf Silizium- und Glasoberflächen.

Alkylketten mit einer Thiolgruppe an einem Ende vermögen Gold über das freie Elektronenpaar ihrer Schwefelatome zu binden (*Abbildung 2.9.a*). Die Ordnung und Stabilität der sich spontan bildenden Monolagen hängen stark von der Wechselwirkung zwischen den einzelnen Alkylresten ab und steigen deshalb mit zunehmender Kettenlänge.

Organosilane tragen am Ende ihrer Alkylkette eine oder mehrere Methoxy- oder Ethoxygruppen, welche zu reaktiven Silanolgruppen hydrolysieren. Diese reagieren unter Abspaltung von Wasser mit den freien Silanolgruppen der Glas- oder Siliziumoberfläche (*Abbildung 2.9.b*).

Die am anderen Ende der Alkylkette sitzenden funktionellen Gruppen bewerkstelligen die kovalente Bindung des biologischen Makromoleküls mit der modifizierten Substratoberfläche. Möglichkeiten, Proteine an silanisierte oder alkylierte Oberflächen zu binden, bieten die primären Aminogruppen der häufig vorkommenden Aminosäuren Lysin oder wiederum die freien Thiolgruppen in Cystein.

Aminogruppen bilden unter milden Bedingungen (pH 7-9) stabile Amidbindungen mit einer aktivierten Carboxylgruppe aus. In *Abbildung 2.10* ist die Reaktion am Beispiel eines N-Hydroxysuccinimidesters dargestellt. Die Immobilisierungsmethode von P. Wagner und M. Hegner [Wagner, 1996] beruht auf diesem Prinzip und verwendet Dithiobis(succinimidylundecanoat) (DSU, *Abbildung 2.11*) als Kopplungsreagenz zwischen einer atomar flachen Goldoberfläche und dem Protein. Durch die Verwendung von längeren Molekülen, z.B. Polyethylenglykole als Verbindungskette, kann der Einfluss von unspezifischen Kräften zwischen der Oberfläche und der AFM-Spitze drastisch reduziert werden.

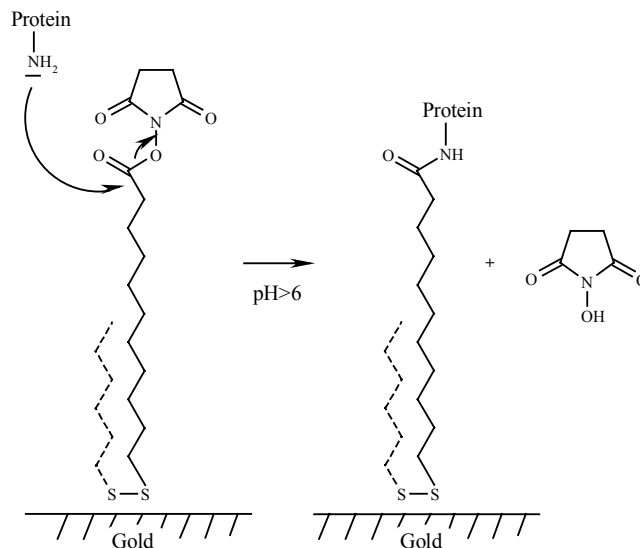


Abbildung 2.10: Immobilisierung von Proteinen an Goldoberflächen via Dithiobis(succinimidylundecanoat).

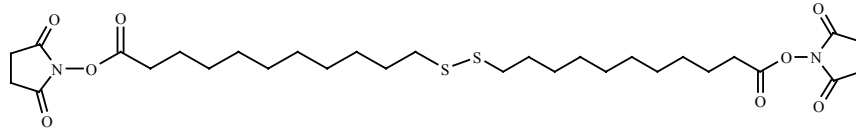


Abbildung 2.11: Dithiobis(succinimidylundecanoat), DSU

2.6 Intermolekulare Wechselwirkungskräfte

Wechselwirkungen zwischen der AFM-Spitze und der Oberfläche resp. zwischen Protein und Oberfläche entstehen aus einem komplexen Zusammenspiel von intermolekularen Kräften. Man unterscheidet zwischen langreichweitigen Van der Waals und elektrostatischen Kräften und kurzreichweitigen Kapillar- und sterischen Kräften. Ausserdem sind Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen zu erwähnen. Sie sind stärker als Van der Waals Kräfte aber viel schwächer als kovalente Bindungen und spielen beispielsweise bei der Faltung von Proteinen und für die Bindung von Substrat an Enzyme eine wichtige Rolle.

Im folgenden soll auf die einzelnen Wechselwirkungen näher eingegangen werden.

Van der Waals Kräfte

Die Stärke einer einzelnen Van der Waals Bindung zwischen Atomen liegt nur geringfügig über der mittleren thermischen Energie von Molekülen bei Raumtemperatur und nimmt mit zunehmendem Abstand exponentiell ab. In einem Molekülverband, hingegen, wo ein momentaner Dipol auch die ihn umgebenden Atome polarisieren kann, wirken Kräfte auch noch über eine Distanz von 100 nm. Für eine AFM-Spitze mit einem Radius R von 10-100 nm und einer glatten Oberfläche ist die Van der Waals Kraft F durch

$$F = -\frac{AR}{6D^2} \quad (2.6)$$

gegeben [Israelachvili, 1991]. A ist die Hamaker Konstante und D der Abstand zwischen der Oberfläche und der Spitze. Die Hamaker Konstante hängt von der Polarisierbarkeit der Atome, den Dielektrizitätskonstanten der Materialien und dem Medium ab. Die Van der Waals Kraft kann anziehend oder abstossend sein.

Elektrostatische Kräfte

Die elektrostatische Kraft zwischen zwei geladenen Teilchen ist eine der wichtigsten langreichweitigen Kräfte bei biologischen Wechselwirkungen. In wässrigen Lösungen werden die Ladungen der Oberflächen durch Ionen der Elektrolytlösung kompensiert und bilden eine Doppelschicht von Ionen aus. Wenn die Oberflächen einander angenähert werden, beginnen sich diese elektrischen Doppelschichten zu überlappen. Dabei steigt die elektrostatische Kraft

(englisch: *electrostatic double-layer force*) zwischen den Oberflächen an. Je nach Oberflächenladung resultiert eine abstossende oder anziehende Kraft. Die elektrostatische Kraft einer Oberfläche auf eine Spitze in einem wässrigen Medium wird von Butt [1991] beschrieben. Dabei hängt die Kraft von den Oberflächenladungen, dem Spitzenradius und der Dielektrizitätskonstanten von Vakuum und Wasser ab und nimmt mit e^{-D/λ_D} ab, wobei λ_D die Debye Länge und D der Abstand zwischen Spitze und Probe ist. Die Debye Länge bei Raumtemperatur ist ein Mass für die Dicke der elektrostatischen Doppelschicht und ändert mit der Valenz und der molaren Konzentration c_M des Elektrolyten [Israelachvili, 1991]. Für eine 0.1 mM monovalente NaCl-Lösung beträgt die Debye Länge

$$\lambda_D = \frac{0.304}{\sqrt{c_M}} \approx 30.4 \text{ nm.} \quad (2.7)$$

Dadurch, dass biologische Moleküle wie auch Substratoberflächen in Wasser je nach pH-Wert eine Nettoladung tragen, kann die Adsorption mittels Elektrolytkonzentration gesteuert werden. Verschiedene Studien haben die theoretischen Überlegungen durch experimentelle Versuche bestätigt gefunden, dass anziehende Van der Waals Kräfte dominieren, sobald abstossende, elektrostatische Kräfte mit zunehmender Elektrolytkonzentration verschwinden [Butt, 1991; Müller, 1997].

Kapillarkräfte

Unter normalen Umgebungsbedingungen sind praktisch alle Oberflächen mit einem dünnen Wasserfilm bedeckt. Die Wasserkondensation hängt hauptsächlich von der relativen Luftfeuchtigkeit ab. Insbesondere AFM Messungen im Kontaktmodus an Luft werden dadurch stark beeinflusst. Die Spitze bildet bei Berührung des Kondensationsfilms auf der Oberfläche einen Meniskus aus und erfährt eine stark anziehende Kraft, welche proportional mit der Oberflächenspannung und dem Spitzenradius wächst [Israelachvili, 1991]. Diese Kräfte liegen im Nanonewtonbereich und wirken sich nicht nur beim Abbilden sondern auch bei Kraftdistanzmessungen störend aus. Es gibt verschiedenen Möglichkeiten diesen unerwünschten Effekten zu begegnen. Unter Ausschluss von Feuchtigkeit kann im Ultrahochvakuum oder in einer Stickstoffkammer gemessen werden, oder aber das ganze System wird in Flüssigkeit getaucht, um die kapillären Wechselwirkungen zu umgehen [Drake, 1989].

Sterische Kräfte

Die bisher besprochenen Kräfte wirken mehr oder weniger langreichweitig, d.h. die Spitze ist nicht in Kontakt mit der Oberfläche. Die Kapillarkräfte sind demnach zwischen den langreichweitigen und den kurzreichweitigen einzuordnen. Wird die Spitze dem Substrat angenähert, bewirken anziehende Kapillarkräfte an Luft oder Van der Waals Kräfte in Flüssigkeit den sprunghaften Kontakt mit der Oberfläche. Die maximale Annäherung zwischen zwei Atomen wird aber schlussendlich durch die Grösse ihrer Elektronenwolken und die Abstossung ihrer Atomkerne bestimmt. Diese Kraft nennen wir sterische Kraft oder Bornsche Abstossung. Die kurze Reichweite dieser Kräfte ist durch die Abstandsabhängigkeit $1/D^{12}$ gegeben [Israelachvili, 1991].

Wasserstoffbrücken

Wasser zeigt in allen drei Aggregatzuständen interessante Eigenschaften und Anomalien. Für die meisten sind Wasserstoffbrücken verantwortlich. O··H Wasserstoffbrücken in Wasser haben eine Bindungslänge von 0.176 nm [Israelachvili, 1991]. Sie ist länger als eine kovalente O–H Bindung (0.1 nm), aber kürzer als die Van der Waals Bindung (0.26 nm), was zur ursprünglichen Annahme einer quasi-kovalenten Bindung führte. Wasserstoffbrücken existieren aber nicht ausschliesslich in Wasser, sondern bilden sich mit anderen elektronegativen Atomen, wie O, N, F und Cl, aus, wenn das Wasserstoffatom seinerseits an elektronegative Atome kovalent gebunden ist. Die Bindung ist also vorwiegend elektrostatischer Natur. Die Wasserstoffbindung ist gerichtet und kann schwache dreidimensionale Netzwerke ausbilden. Ein gutes Beispiel für die Bedeutung dieser Brücken ist die DNA-Doppelhelix, die von Wasserstoffbrücken zusammengehalten wird.

Hydrophobe Kräfte

Unpolare Verbindungen, wie Alkane und Kohlenwasserstoffe, sind ausserordentlich schlecht wasserlöslich, weil sie keine Wasserstoffbrücken ausbilden können. Der hydrophobe Effekt kommt zustande, wenn solche unpolare Moleküle in Wasser dispergiert werden. Für jedes unpolare Molekül werden einige Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen aufgebrochen, die sich dann neu orientieren, um eine maximale Anzahl neuer Wasserstoffbrücken aufzubauen. Die Anordnung von Wassermolekülen um getrennte unpolare Moleküle ist aber weitaus stärker geordnet als sonstwo in der Lösung und deshalb entropisch ungünstig. Experimentell kennen wir dieses Phänomen als Zusammenschluss der unpolaren Moleküle zu grösseren Aggregaten, z.B. Öl in Wasser. Hydrophobe Wechselwirkungen entstehen also

nicht primär deshalb, weil unpolare Moleküle eine grosse Affinität zueinander haben, sondern weil Wassermoleküle starke Bindungen untereinander eingehen.

Hydrophobe Kräfte spielen in vielen Oberflächenphänomenen eine wichtige Rolle. Sie sind beispielsweise verantwortlich für die Stabilität von selbst-organisierenden Monolagen (vgl. Abschnitt 2.5.2) und bestimmen die Struktur von biologischen Membranen, sowie die Konformation von Proteinen.

Jede Wechselwirkung zwischen zwei Oberflächen beruht auf einer Vielzahl von verschiedenen Kräften. Das globale Profil oder Energiepotential einer Wechselwirkung stellt eine komplizierte Funktion mit mehreren Minima und Maxima dar (*Abbildung 2.12*). Die quantitative Beschreibung dieser Abläufe basiert auf der nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek benannten DLVO-Theorie [Israelachvili, 1991; Stricker, 1987]. Nach dieser Theorie resultieren die Wechselwirkungskräfte zwischen kolloiden Teilchen in einer Dispersion aus der Summe der elektrostatischen Abstossungskräfte und der Van der Waalschen Massenanziehungskräfte.

Für die Stabilität von pharmazeutischen Dispersionen spielen diese Gesetzmässigkeiten eine grosse Rolle. Zwei kolloide Partikel koagulieren im primären Minimum, wenn z.B. das Oberflächenpotential stark reduziert werden kann. Bleibt die Oberflächenladung dennoch hoch, können die Partikel noch in einem sekundären Minimum bei einem grösseren Molekülabstand verbleiben, wo die Adhäsion entsprechend schwächer und reversibel ist.



Abbildung 2.12: Abhängigkeit der Potentialenergie vom Teilchenabstand nach der DLVO-Theorie.

W_{pot} : zu überwindende Energieschwelle bei der Teilchen- oder Oberflächenkoagulation.

2.7 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie

Die Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (englisch: *XPS*, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) beruht auf dem Prinzip des photoelektrischen Effektes [Lüth, 1997]. Die Oberfläche wird mit elektromagnetischer Strahlung (z.B. Röntgenstrahlung oder UV-Strahlung) beleuchtet und die emittierten Elektronen, sog. Photoelektronen, analysiert. Die Energie der Röntgenstrahlung beträgt bei Magnesium-Anoden 1253.6 eV und bei Aluminium-Anoden 1486.6 eV [Wagner, 1979]. Durch diese Photonen werden Elektronen aus den besetzten Atomorbitalen der Probe herausgeschlagen, wobei die emittierten Elektronen vereinfacht dargestellt eine kinetische Energie E_{kin} von

$$E_{kin} \approx h \cdot \nu - E_b \quad (2.8)$$

besitzen [Lüth, 1993]. Mit der Planckschen Wirkungskonstante h und der Photonenfrequenz ν ist $h\nu$ gerade die Energie des Photons und E_b die Bindungsenergie des Atomorbitals, aus welchem das Elektron stammt. Für jedes chemische Element sind die Bindungsenergien bekannt. Verschiebungen im Energiespektrum sind auf die chemischen Bindungsverhältnisse im Atomverband zurückzuführen und geben Aufschluss auf die exakte Zusammensetzung des Probenmaterials. Mit XPS können alle Elemente ausser Wasserstoff und Helium in Konzentrationen über 0.1 Atomprozent detektiert werden. Deshalb wird die Technik oft auch mit ESCA (englisch: *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) abgekürzt.

Viele der angeregten Elektronen in der Probe büssen einen Teil ihrer Energie durch inelastische Stösse mit anderen Elektronen ein. Diese gestreuten Elektronen haben die Information über ihre Herkunft verloren und tragen zum Hintergrund im Photoemissionsspektrum bei. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Elektron die Oberfläche ohne Kollision erreichen kann, ist durch die mittlere freie Weglänge gegeben, welche insbesondere von der kinetischen Energie der Teilchen abhängt. Weil die mittlere Weglänge nur gerade zwischen 5 und 20 Å liegt, bleibt der Informationsgehalt auf die obersten Atomlagen einer Probe beschränkt und macht die Technik äusserst oberflächenempfindlich.

Die kinetischen Energien der Elektronen werden elektrostatisch in einem Halbkugelanalysator aufgetrennt. Dazu wird zunächst das Signal jedes detektierten Elektrons in einem Elektronenvervielfacher verstärkt. Durch kontinuierliche Erhöhung der Spannung im Analysator kann die Anzahl der Elektronen als Funktion ihrer kinetischen Energie erfasst und im Spektrum dargestellt werden. Die Fläche unter dem Peak ist ein Mass für den relativen Gehalt eines Elementes auf der Messfläche, während die Form und Position des Peaks die chemische Umgebung eines Elementes widerspiegelt.

Abbildung 2.13 zeigt das XPS-Spektrum einer Glasoberfläche. Auf der Abszisse sind die umgerechneten Bindungsenergien aufgetragen, auf der Ordinate die Intensität des Signals. Bei isolierenden Materialien wie Glas kann die Elektronenemission nicht ausreichend kompensiert werden. Die Oberfläche lädt sich auf. Die positive Ladung verlangsamt austretende Elektronen und führt zu einer Verschiebung der Peaks zu höheren Bindungsenergien. Dieser Effekt kann durch einen zusätzlichen Ionen- oder Neutralisierungsstrahl (z.B. Argon) weitgehend behoben werden.

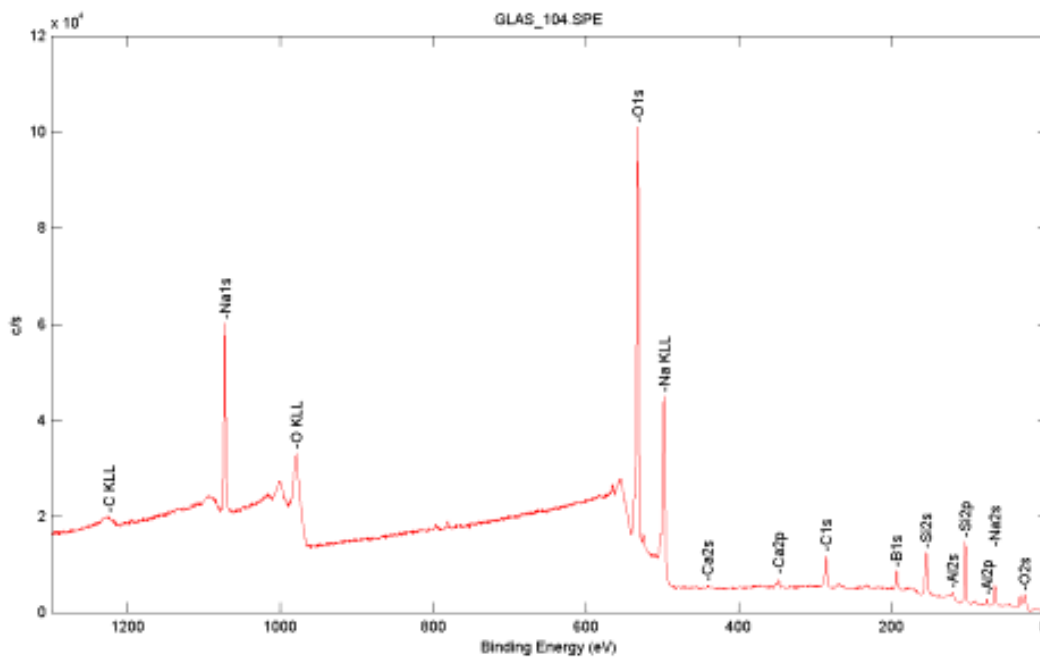


Abbildung 2.13: XPS Spektrum der Innenoberfläche eines FIOLAX Vials im Anlieferungszustand. Die mit KLL bezeichneten Peaks stellen Augerlinien des entsprechenden Elementes dar.

2.8 Rasterelektronenmikroskopie

Beim Rasterelektronenmikroskop (REM) entsteht das Bild durch einen rasterförmig abtastenden Elektronenstrahl. Die Elektronen werden durch Glühemission im Vakuum erzeugt und treten stark gebündelt und beschleunigt auf die Probe auf. Die Primärelektronen werden einerseits durch Beugung und Streuung abgelenkt und als Rückstreuerelektronen detektiert, andererseits schlagen sie Sekundärelektronen aus den besetzten inneren Elektronenschalen des Atoms heraus, deren Intensität je nach Eigenschaft der Oberfläche verschieden ist. Der Vergleich dieser beiden bildgebenden Verfahren kann eine erste Beurteilung über Materialbeschaffenheit der Probenoberfläche liefern.

Um eine negative Aufladung der Oberfläche zu verhindern, werden dünne Metallschichten auf isolierende Probematerialien aufgedampft. Im hochauflösenden Feldemissions-Raster-

elektronenmikroskop wird zusätzlich das Prinzip der Feldemission von elektronenemittierenden Metalloberflächen ausgenutzt.

2.9 Elektronenstrahlmikrosonde

Die Elektronenstrahlmikrosonde (EMS) beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie das Rasterelektronenmikroskop, dient aber zusätzlich zur chemischen Analyse einer Probe. Nebst der Einzelpunktanalyse bietet die Mikrosonde auch die Möglichkeit, eine Elementverteilung über eine bestimmte Fläche zu ermitteln. Dazu wird wie beim REM der Elektronenstrahl im Raster über die Probe bewegt.

Der stark fokussierte Elektronenstrahl entfernt Elektronen aus den inneren K-Schalen des Atoms. Die entstandene Lücke wird durch ein anderes Elektron aus einem energetisch höher liegenden Niveau besetzt. Die Energiedifferenz wird nun in Form von Röntgenstrahlung emittiert und analysiert. Sowohl die Wellenlänge als auch die Energie der Emissionsstrahlung kann zur Identifizierung des chemischen Elements verwendet werden. Dazu sind spezielle Spektrometer notwendig, welche für jedes Element mit einem Standard geeicht werden müssen.

Die Oberflächenempfindlichkeit der Methode ist im Vergleich zur Röntgen-Photoelektronenspektroskopie viel geringer. Die Informationstiefe bei der Mikrosonde hängt vom Eindringvermögen der Elektronen ins Material ab und beträgt zwischen 0.5 und 10 μm . Die laterale Auflösung der chemischen Elementverteilung wird vom Durchmesser des Elektronenstrahls bestimmt und liegt bei einem μm .

3 Methoden und Materialien

3.1 Instrumentierung

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Experimente das kommerzielle Rastersondenmikroskop von Thermomicroscope (Topometrix Explorer, USA) eingesetzt. Dank der speziellen Bauweise, wo sämtliche Messelemente im Kopf des Gerätes eingebaut sind, können flache Proben beliebiger Grösse untersucht werden. Ein im Hause gebauter Probentisch mit Mikrometerschrauben hat die Positionseinstellung zusätzlich erleichtert. Ausserdem hat sich die Aufhängung des Gerätes an einem Federsystem zur Dämpfung von Bodenvibrationen bewährt (*Abbildung 3.1*). Die Resonanzfrequenz dieses Systems liegt bei 0.8 Hz.

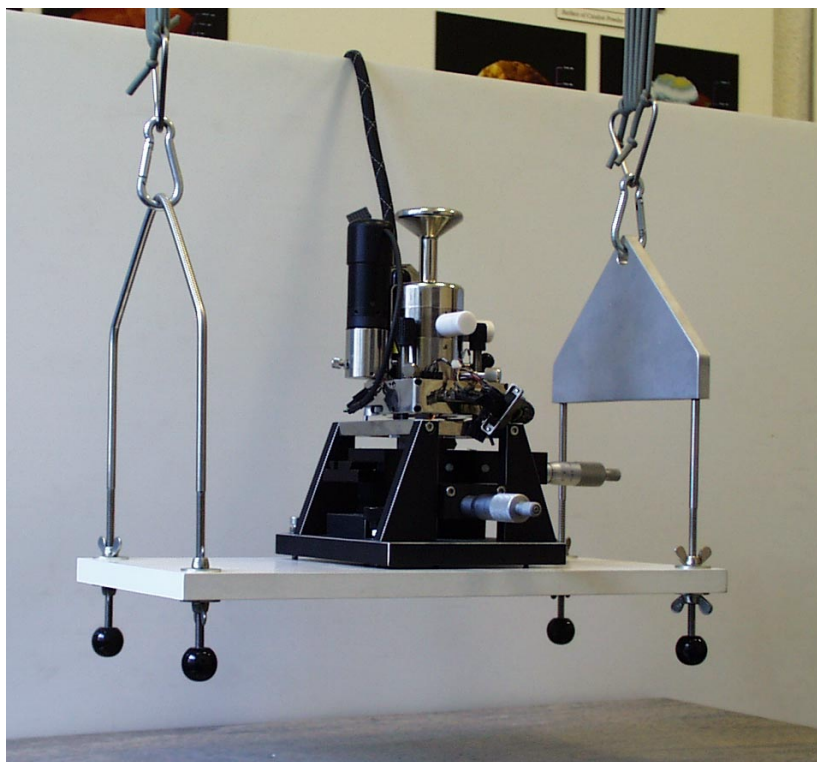


Abbildung 3.1: Topometrix Explorer-Messkopf mit Probentisch und Aufhängevorrichtung.

Zur AFM-Messung mit dem Explorer stehen insgesamt vier Scanner zur Verfügung. Die beiden Dreibeinscanner, wo die x- und y-Piezos fest im Gerät eingebaut sind, dienen zur Messung von Bildbereichen bis zu $100 \times 100 \mu\text{m}$ und einer maximalen Höhenausdehnung des z-Piezo von $11.1 \mu\text{m}$ (Luft) resp. $5.6 \mu\text{m}$ (Flüssigkeit). Die kleinen Röhrenscanner zeichnen Bilder von maximal $2.3 \times 2.3 \mu\text{m}$ in x- und y-Richtung und maximal 870 nm in z-Richtung auf. Die Scanner zur Messung in Flüssigkeit besitzen zum Schutz vor Wasser einen Teflonmantel. Für diese Arbeit wurde der kleine Flüssigkeits-Röhrenscanner aus Gründen der Eichung sowohl für Messungen an Luft, als auch für Messungen in Flüssigkeit verwendet.

3.2 Messen in Flüssigkeit

Zur Messung in Wasser oder Pufferlösungen wurden Aluminiumschalen gefertigt. In diese Behälter wurden die Proben mit Araldit™ (Ciba-Geigy, Basel, Schweiz) geklebt und mit soviel Medium bedeckt, dass das Fenster des Scanners ausreichend benetzt wurde. Der Vorteil dieser Anordnung war, dass auch Proben mit gekrümmten Oberflächen in Flüssigkeit gemessen werden konnten, und dass das Medium dank des grossen Volumens in der Schale nicht zu rasch verdampfte.

3.3 Cantilever und Kalibration der Federkonstanten

Für die Abbildung von Oberflächen im Kontaktmodus und die Kraftmessungen wurden weiche Cantilever aus Silizium (Pointprobe, 0.2 N/m , Nanosensors, Deutschland) verwendet. Härtere Silizium-Cantilever (Pointprobe, 42 N/m , Nanosensors, Deutschland) wurden für Abbildungen im Nichtkontaktmodus gebraucht. Die Messspitzen sitzen jeweils am Ende eines rechteckigen Balkenlevers senkrecht zur Blattfederebene (vgl. *Abbildung 2.2*, Kapitel 2). Sie sind pyramidenförmig und haben einen Spitzenradius kleiner als 10 nm . Die Spezifikationen gemäss Hersteller sind in *Tabelle 3.1* zusammengefasst.

Typ	Kontaktmodus	Nichtkontaktmodus
Dicke (μm)	1.5 - 2.5	3.5 - 4.5
Breite (μm)	45 - 55	25 - 35
Länge (μm)	445 - 455	120 - 130
Federkonstante (N/m)	0.07 - 0.4	21 - 78
Resonanzfrequenz (kHz)	10 - 17	260 - 410

Tabelle 3.1: Herstellerangaben der verwendeten Kontakt- und Nichtkontaktmodus Balkenfedern von Nanosensors.

Die Kontaktmessungen auf Silikaglas wurden mit geschärften Siliziumnitrid Spitzen (Nanoprobe, oxide-sharpened, 0.06 N/m, Digital Instruments, USA) aufgenommen. Die Balkenfeder ist nur gerade 0.6 μm dick und besitzt die Form eines gleichschenkligen Dreiecks. Der Spitzenradius wird mit 5-40 nm angegeben.

Die experimentelle Ermittlung der Federkonstanten von Cantilevern für Kraftdistanz-Messungen ist direkt mit der Software von Topometrix möglich. Das Messprinzip anhand des thermischen Rauschverhaltens wurde bereits in Abschnitt 2.1.6 beschrieben. Die Werte der so bestimmten Federkonstanten lagen immer im Bereich der vom Hersteller angegebenen Daten. Die Federkonstante und die Auslenkung proportional zur Piezoposition liefert dann den Wert für die Kraftumrechnung. Es wurden jeweils 5 Kalibrationsmessungen vor einer Serie von 150 Kraftdistanzkurven aufgenommen und gemittelt. Zur Kontrolle wurden nach Beenden einer Messserie nochmals 5 Kalibrationen durchgeführt.

3.4 Bildaufnahme und Bildverarbeitung

Alle in dieser Arbeit gezeigten AFM-Messungen sind repräsentativ für eine Vielzahl von Bildern, welche jeweils unter den gleichen Bedingungen und im angegebenen Messbereich wiederholt worden sind. Wenn nicht anders vermerkt, sind die Aufnahmen im Nichtkontaktmodus, an Luft und bei Raumtemperatur gemacht worden. Alle Abbildungen wurden mit einer Auflösung von 500 Pixel pro Linie aufgenommen. Die Scangeschwindigkeit lag durchschnittlich bei 2-3 Linien pro Sekunde. Im Nichtkontakt- und im Kontaktmodus wurde die normale Krafteinwirkung der Feder auf die Probe minimal gehalten, d.h. der Setpoint so weit reduziert, dass der z-Piezo die Bewegungen gerade noch stabil im Feedback nachführen konnte.

Die Abbildungen entsprechen den Rohmessdaten, welche lediglich einer horizontalen und eventuell einer vertikalen Nivellierung unterworfen wurden. Durch die Software-Nivellierung kann bei verhältnismässig hohen Strukturen gegenüber ihrer Umgebung ein horizontaler oder vertikaler Schatten entstehen. Das Topographiebild ist jeweils im Farbstufenkontrast mit dazugehöriger Höhenskala dargestellt.

3.5 Glaspräparation

Zur Untersuchung der Innenoberflächen von Rohren (Schott FIOLAX[®], Deutschland und Kimble KG-33[®], USA) und der daraus geformten zylindrischen Glasbehältnissen (Ampullenflaschen und Fertigspritzen) wurden die Proben mit Klebstreifen umwickelt und im Schraubstock sorgfältig zerbrochen. Dank des haftenden Klebebandes konnten die einzelnen Bruchstücke mit einer Pinzette gezielt entnommen werden. Die Bruchstücke wurden anschliessend mit Stickstoff (Reinheit: 99.9997%) zur Entfernung von Glassplittern abgeblasen und je nach Untersuchungsziel und Analysenmethode folgendermassen präpariert:

Für Messungen im **AFM** (Abbilden und Kraftexperimente) wurden die gekrümmten Glasproben so auf den Probenhalter resp. in die Aluminiumschale geklebt, dass eine Kante des Bruchstückes flach auf den Untergrund zu liegen kam (*Abbildung 3.2*).

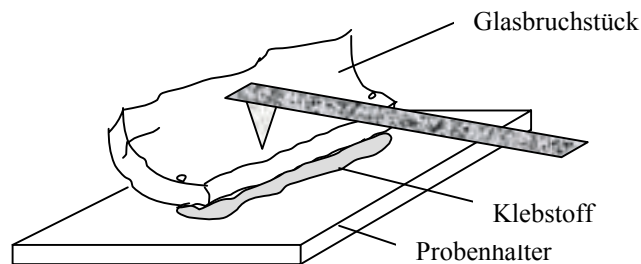


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Glasprobenfixierung

Die Innenfläche wurde damit entlang der Bruchkante für die AFM-Spitze zugänglich. Bei Messungen in Flüssigkeit musste darauf geachtet werden, dass das Glasstück nicht zu gross war und die gegenüberliegende Kante das Teflongehäuse des Scanners nicht berührt.

Für die Glasanalysen mittels **Röntgen-Photoelektronenspektroskopie** (PHI 5400, ESCALab, Perkin Elmer Corporation, USA) an der EMPA in Dübendorf mussten die Proben mit Schrauben und Metallklammern flach mit der Innenfläche nach oben auf den Probenhalter fixiert werden. Die Glasproben durften auch hier nicht zu gross gewählt werden, damit der Analysenstrahl mit einem Einfallswinkel von 45° nicht durch die Krümmung der Probe behindert wurde.

Zur Vermeidung von elektrostatischen Aufladungen mussten die Glasproben für Untersuchungen im **Rasterelektronenmikroskop** (JEOL 6300 F, USA, 1992) mit leitenden Materialien bedampft werden. Die Glasbruchstücke wurden dazu mit Leitsilber flach auf den Probenhalter geklebt, trocknen gelassen und anschliessend mit 5-10 nm Titan bedampft. Die

Messungen wurden im Labor für Rasterelektronenmikroskopie der Universität Basel durchgeführt.

Für Messungen an der **Mikrosonde** (JEOL 8600 Superprobe, USA, 1987) am Mineralogischen Institut in Basel wurden die Glasrohrquerschnitte mit einem Zweikomponentenkleber (Scandiplex, BASF, Deutschland) vollständig eingebettet und plan geschliffen. Durch die Bedampfung mit Graphit wurde die Probenoberfläche leitfähig gemacht.

3.6 Proteinadsorption auf Substrat

Wie bereits in Abschnitt 2.3 erwähnt, lässt sich Glimmer mit Hilfe von Klebstreifen einfach und sauber spalten. Für die Abbildung von Protein mit dem Rasterkraftmikroskop wurden auf den frisch gespaltenen Glimmer (Plano W. Planet, Deutschland) 10 µl einer Pufferlösung, welche die entsprechende Konzentration an Protein enthielt, bei Raumtemperatur 2 Minuten lang inkubiert. Als Pufferlösungen dienten 0.1 mM Phosphatpuffer, pH 7 (Merck, Schweiz) und 0.1 mM Citratpuffer, pH 5 (Merck, Schweiz). Nicht-adsorbierte Proteine wurden anschliessend mit reinstem Wasser ($\leq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$, sterilfiltriert 0.2 µm) abgewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Proben wurden jeweils kurz vor der Messung frisch präpariert.

Glasproben als Substrat für die Proteinadsorption wurden kurz mit reinem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Inkubation von Proteinlösung erfolgte in gleicher Weise, wie oben für Glimmer beschrieben.

3.7 Immobilisierung von Protein an die AFM-Spitze

Die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen an goldbeschichteten AFM-Spitzen wurde nach der bereits in Abschnitt 2.5.2 erwähnten Methode von Wagner und Hegner [Wagner, 1996] durchgeführt.

Dazu werden die Cantilever zunächst mit einem speziellen vakuum- und temperaturresistenten Zweikomponenten Kleber (EPO-TEK 377, Epoxy Technology, USA) auf die Cantileverhalter aufgeklebt. Die Unterseite der so montierten Cantilever wird dann in der Aufdampfanlage (Balzers Union, Balzers, Fürstentum Liechtenstein) im Vakuum bei einem Druck von 1×10^{-6} - 1×10^{-5} mbar mit 1 nm Titan und 15 - 20 nm Gold bedampft. Die Cantilever werden in 1 mM 11,11'-Dithio-bis(succinimidylundecanoat) (DSU, *Abbildung 2.11*) in frischem 1,4-Dioxan während 15 Minuten eingelegt und mit zweimal 5 ml Dioxan und dreimal 15 ml Phosphatpuffer (0.1 mM, pH 7, Merck, Schweiz) gewaschen. Durch die sofortige Inkubation von Proteinlösung in aminofreiem Puffer (pH 6.5 - 8.5) werden die

Moleküle an die Monolage von DSU kovalent gebunden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Lösung von 0.95 mg/ml Interferon α -2a in Phosphatpuffer (0.1 mM, pH 7) verwendet und während 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die so präparierten Cantilever, schematisch dargestellt in *Abbildung 3.3*, wurden kühl (4 °C) und in Puffer aufbewahrt innert drei Tagen für die Messung verwendet.

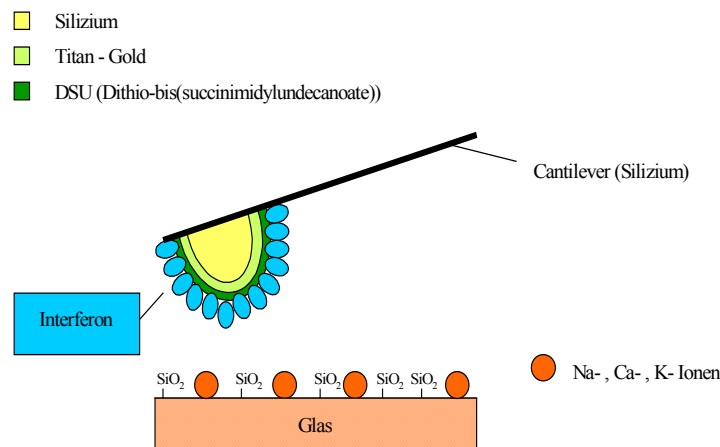


Abbildung 3.3: Kovalente Immobilisierung von Interferon α -2a an die AFM-Spitze via DSU.

3.8 Aufnahme und Auswertung von Kraft-Distanz Kurven

Das Ziel der Kraftspektroskopie war es, jeden proteinbeschichteten Cantilever sowohl auf einem Glas mit hohen Proteinadsorptionseigenschaften als auch auf einem Glas mit geringem Adsorptionsverhalten auszuwerten. Die Glassubstrate wurden nach demselben Vorgehen, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, präpariert. Es handelte sich hierbei um Glasproben von Ampullenflaschen aus Schott FIOLAX[®] und Schott TYPE 1 PLUS[®] (vgl. Abschnitt 2.2.4).

Alle Kraftexperimente wurden bei Raumtemperatur in Citratpuffer (pH 5, 0.1 mM, Merck, Schweiz) oder Phosphatpuffer (pH 7, 0.1 mM, Merck, Schweiz) durchgeführt.

Für eine repräsentative Aufzeichnung von Kraft-Distanz Kurven wurde mit demselben Cantilever eine Messserie von insgesamt 150 Messungen untersucht. An drei verschiedenen Stellen wurden je 50 Messkurven mit einer Annäherungs- und Rückziehggeschwindigkeit von 1 μ m/s aufgenommen. Die maximale Andruckkraft des Cantilevers auf die Probenunterlage lag jeweils unter 500 pN. Die Auslenkung des Cantilevers wurde mit einer Auflösung von 600 Pixel pro Annäherungs- bzw. Rückzugsweg detektiert. Alle 150 Abrisskräfte wurden in einem

Histogramm zusammengetragen und der wahrscheinlichste Häufigkeitswert dieser Verteilung anhand der Gaussgleichung ermittelt.

Zur Ausmessung jedes einzelnen Sprunges einer Kraftkurve diente ein für Rastersondenmikroskope an der Universität Basel entwickeltes Auswerteprogramm (SXM-Shell, 1993). Dank Mausclick liess sich der Mittelwert von Auge trotz grossem Signal-zu-Rausch Verhältnis mit relativ guter Reproduzierbarkeit bestimmen.

4 Charakterisierung von Glasoberflächen

4.1 Resultate

4.1.1 Rohrglas

Ausgangsmaterial für die Fertigung von zylindrischen Glasbehältnissen sind Glasrohre, welche nach dem in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Danner- oder Velloverfahren aus der gewünschten Glassorte hergestellt worden waren. Die Topographie der Innenoberflächen zwei solcher Glasrohre aus FIOLAX und KG-33 wurden im Rasterkraftmikroskop analysiert. Somit konnte ein Vergleich der Innenoberflächen von Vials und Fertigspritzen vor und nach ihrer Produktion angestellt werden.

In *Abbildung 4.1.A* und *4.1.B* sind 5 μm grosse Bildbereiche der Innenseite eines FIOLAX- und eines KG-33-Rohres (Aussendurchmesser 16.25mm) im Anlieferungszustand, d.h. ohne zusätzliche Behandlung, dargestellt. Der Unterschied beider Glassorten ist deutlich zu erkennen. Während auf FIOLAX bis zu 25 nm grosse Strukturen auf der Oberfläche regelmässig verteilt liegen, sind auf KG-33 keine Strukturen gemessen worden.

Werden aber beide Oberflächen vor der Messung kurz mit Wasser abgewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet (*Abbildungen 4.1.C* und *4.1.D*), sind auch die zuvor gemessenen Partikel auf FIOLAX nicht mehr detektierbar. Die Innenoberfläche eines FIOLAX-Rohres wird also durch Abspülen mit Wasser bezüglich Topographie und Rauheit der eines abgespülten KG-33-Rohres ähnlich.

Interessanterweise können die gewegewaschenen Partikel auf FIOLAX im Reibungsbild wieder sichtbar gemacht werden (*Abbildung 4.2.C*), während auf dem abgewaschenen KG-33 Glasrohr praktisch kein Reibungscontrast zu verzeichnen ist (*Abbildung 4.2.D*). Die zugehörigen Topographiebilder der beiden Glasqualitäten im abgewaschenen Zustand weisen keine messbaren Partikel auf (*Abbildung 4.2.A* und *B*).

4.1.2 Vials

Nach der Verformung der Glasrohre zu Vials erhalten die Innenoberflächen von FIOLAX und KG-33 im Anlieferungszustand, als auch im abgewaschenen Zustand, eine ganz andere Gestalt. Zur Analyse standen Glasvials (Füllvolumen 2 ml) aus FIOLAX und KG-33 zur Verfügung.

Die Oberflächen der Vials sind jetzt übersät mit kreisförmigen Strukturen unterschiedlicher Grössen (*Abbildung 4.3.A* und *4.3.B*). Im Falle von KG-33 unterscheiden wir im abgewaschenen Anlieferungszustand von den kreisförmigen noch zusätzlich ringliartige Strukturen. Letztere erscheinen in Grösse und Verteilung auf der Oberfläche viel homogener und sitzen zumal auch auf den kreisförmigen Strukturen.

Wiederum sind, wie im Rohrglas, gleichmässig verteilte Partikel auf FIOLAX im Anlieferungszustand gemessen worden, welche nach der Behandlung mit Wasser fehlen.

Die kreisförmigen Erhebungen auf der Oberfläche sind mit einer durchschnittlichen Höhe von 30 nm oder weniger und einem Durchmesser von bis zu 1 μm eher flach und linsenartig. Sie wurden in hoher Dichte im unteren Bereich eines Vial gefunden, also nahe des Bodens, und in abnehmender Zahl Richtung Hals. Im Bodenbereich wurden vermehrt grössere Linsen beobachtet, als in weiter oben gelegenen Bereichen einer Ampullenflasche. Diese Verteilung zeigte sich sowohl auf FIOLAX Glas als auch auf KG-33 Glas.

Die homogene Verteilung der ringliförmigen Strukturen auf KG-33 erstreckt sich im Gegensatz zu den Linsen über die Gesamtinnenoberfläche eines Vial. Die durchschnittliche Grösse eines Ringli liegt bei 100 nm im Durchmesser und einer Randhöhe von 3 nm. Auffällig sind auch die Vertiefungen in der Mitte eines Ringli.

Veränderung der Linsen nach Wasch- und Sterilisierprozess

Werden nun diese Ampullenflaschen im pharmazeutischen Betrieb vor der Abfüllung mit Wirkstofflösung einem Wasch- und Sterilisierprozess unterzogen, verändert sich die Topographie der Innenoberflächen, wie in *Abbildung 4.3.C* und *4.3.D* dargestellt. Nach zweimaligem Waschen mit ca. 60 °C warmen Wasser unter erhöhtem Druck wird die Struktur der Linsen von der Mitte her angegriffen und ausgehöhlt. Nach der Passage eines 300 °C heissen Tunnels während maximal 15 Minuten wird dieser Auswascheffekt noch deutlicher.

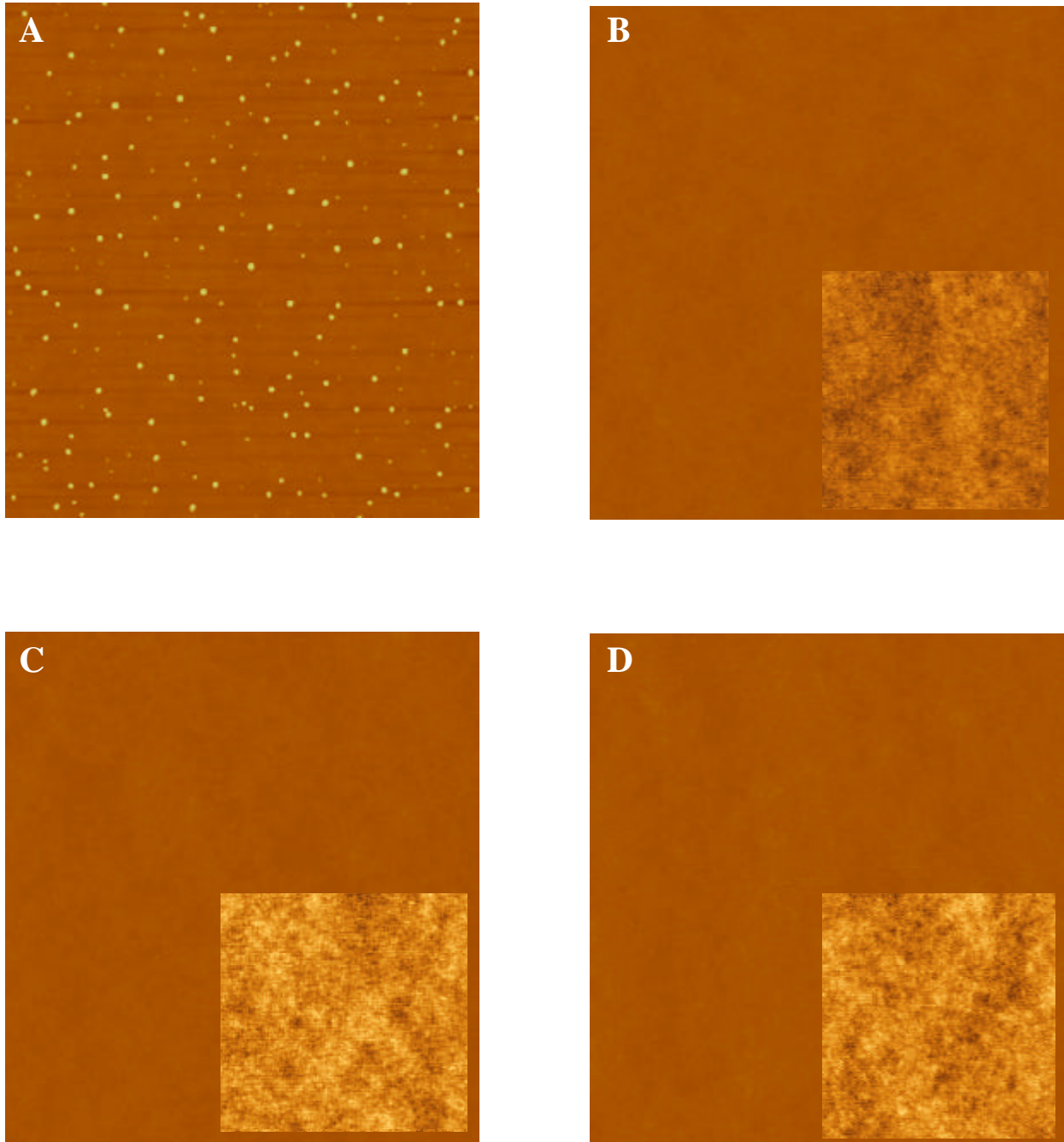


Abbildung 4.1: Topographiebilder der Innenoberfläche eines Glasrohres aus (A) FIOLAX und (B) KG-33 im Anlieferungszustand. Nach Abwaschen mit Wasser sind weder auf (C) FIOLAX noch (D) KG-33 Strukturen zu erkennen ($5 \times 5 \mu\text{m}$, Kontraststufenhöhe: 25 nm). Die Insets in (B), (C) und (D) zeigen den entsprechenden Ausschnitt mit einer Kontraststufenhöhe von 3 nm.

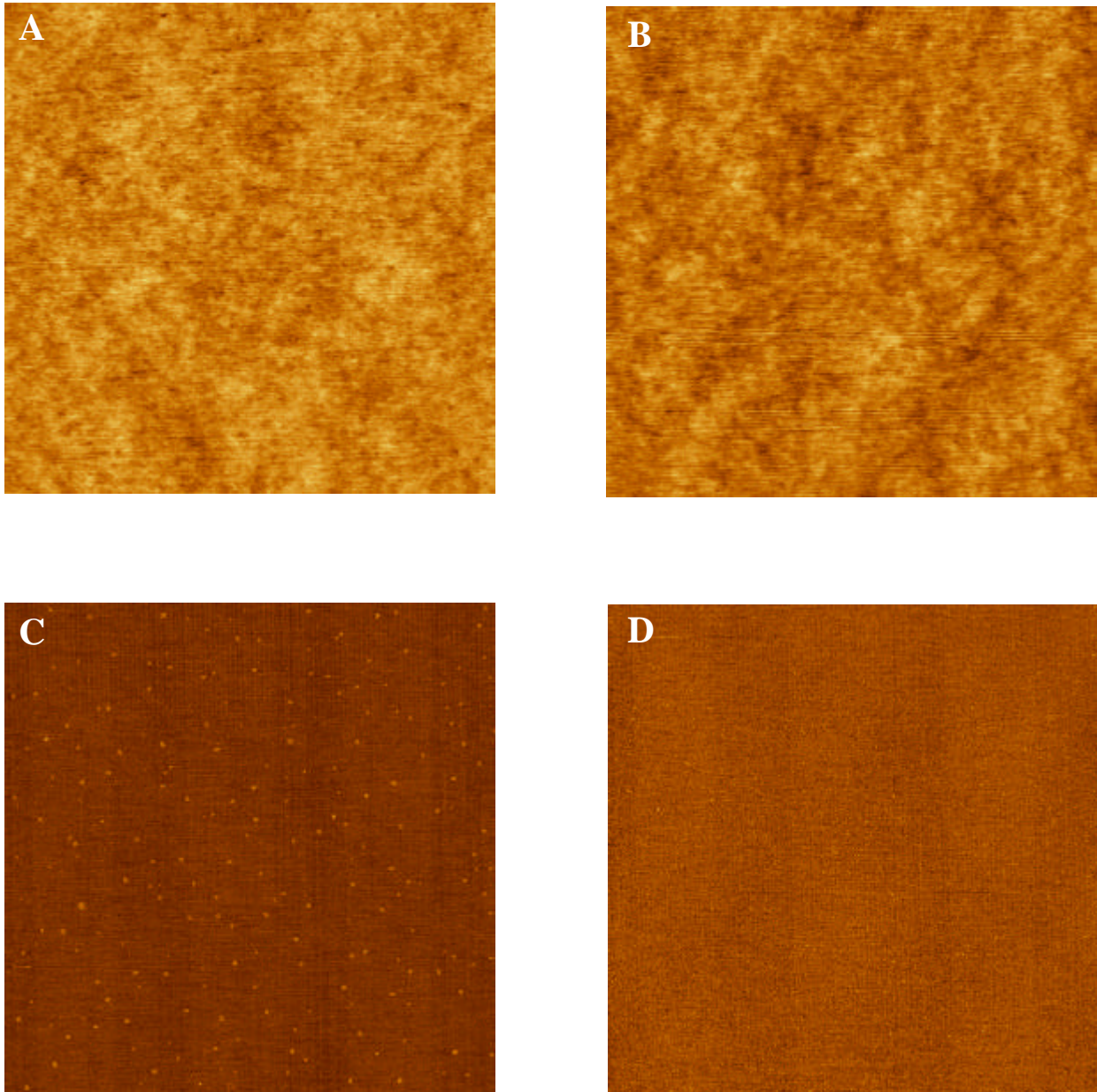


Abbildung 4.2: Topographiebilder der Innenoberfläche eines Glasrohres aus (A) FIOLAX und (B) KG-33 im abgewaschenen Zustand ($5 \times 5 \mu\text{m}$, Kontraststufenhöhe: 2.24 nm). Reibungsbilder der gleichen Glasoberfläche von (C) FIOLAX und (D) KG-33.

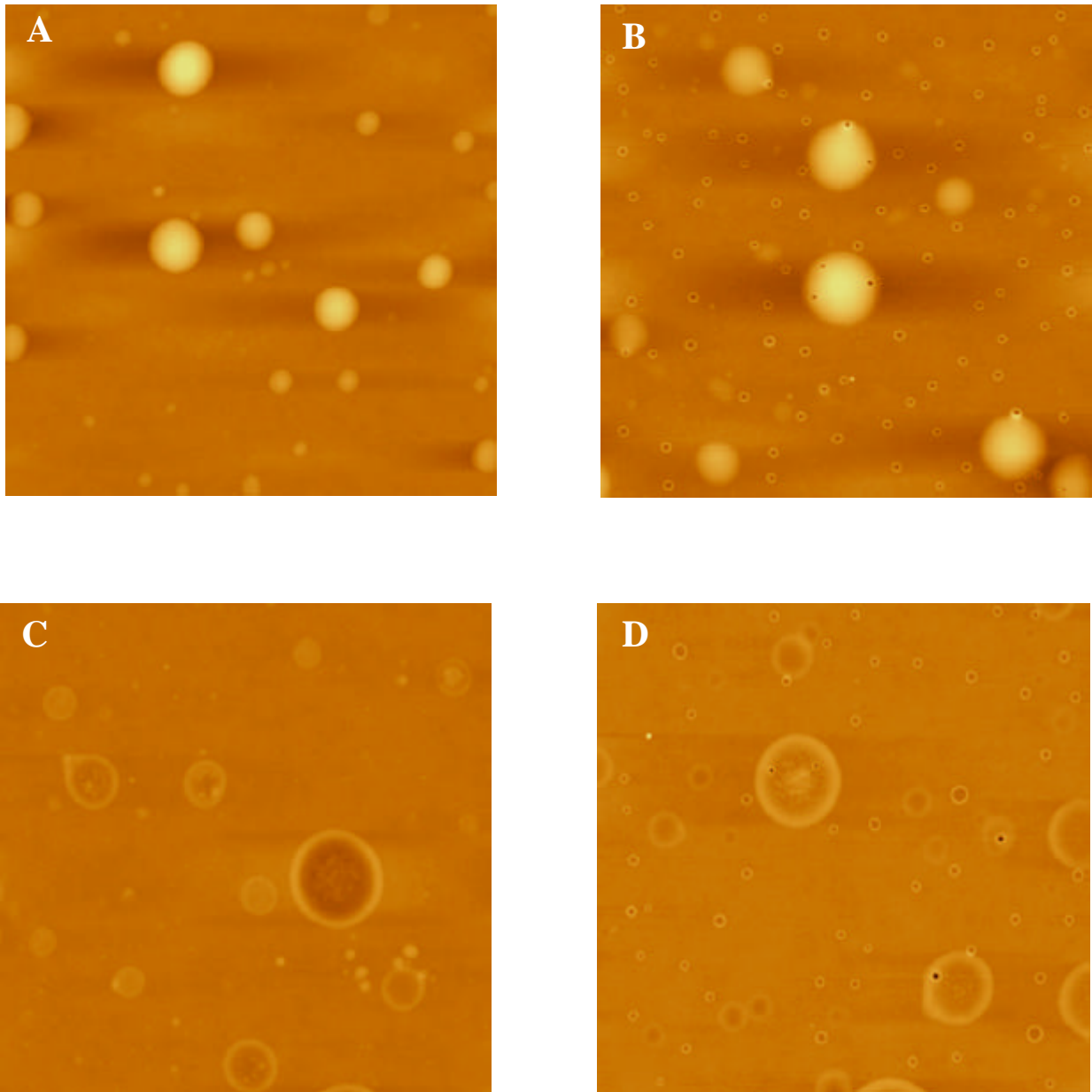


Abbildung 4.3: Topographiebilder der Innenoberflächen eines (A) FIOLAX Vials und (B) KG-33 Vials im abgewaschenen Anlieferungszustand und nach Passage des Sterilisiertunnels (C, FIOLAX) und (D, KG-33). Die Aufnahmen stammen aus der unteren Hälfte der Vials (5 x 5 μm , Kontraststufenhöhe: 38 nm).

Veränderung der Linsen in wässrigen Lösungen

Um das Verhalten der Linsen in wässrigen Lösungen zu prüfen, wurden die Oberflächen in saure und basische Umgebungen gebracht und nach einer definierten Behandlungszeit im AFM gemessen.

Dazu wurde je ein neues, unpräpariertes Vial (Füllvolumen 2ml) aus FIOLAX und KG-33 Glas mit einer Lösung von pH 3, 5, 7 und 10 gefüllt und während 3 Tagen bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde jedes Vial sorgfältig entleert, mit 5 ml Wasser ausgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Glasproben wurden anschliessend nach der in Abschnitt 3.5 beschriebenen Methode präpariert und im AFM analysiert. Die hier gezeigten Bilder stammen jeweils aus der unteren, bodennahen Hälfte eines Vial (FIOLAX: *Abbildung 4.4.A - D*; KG-33: *Abbildung 4.5.A - D*).

Nach drei Tagen in pH 3 stellen die meisten Linsen auf FIOLAX nur noch Vertiefungen mit einem zurückgebliebenen Rand dar (*Abbildung 4.4.A*). Manche der kreisförmigen Strukturen zeigen erst den Anfang einer derartigen Veränderung.

In reinem Wasser von pH 5 (ohne HCl- oder NaOH-Zusatz) gelagert, erscheinen die Strukturen noch weitgehend intakt (*Abbildung 4.4.B*). An der grossen Linse im linken oberen Teil des Bildes erkennt man aber bereits den Anfang des schrittweisen Angriffes.

Sobald die Testlösung einen geringen basischen Anteil enthält, pH 7 (*Abbildung 4.4.C*), verläuft die Auflösung typischerweise ohne Randbildung.

Besonders deutlich ist die gleichförmige Abtragung des Glassubstrates unter basischen Bedingungen bei pH 10 in *Abbildung 4.4.D* zu sehen. Hier sind von den Linsen nur noch tiefe Löcher übrig.

Das Verhalten der Linsen auf KG-33 Glas präsentiert sich etwas anders. Im Gegensatz zu FIOLAX scheint bei KG-33 die Auflösung der Linsen in pH 3 (*Abbildung 4.5.A*) erst begonnen zu haben. Es ist nur gerade eine zentrale Eindellung der Linsen zu erkennen.

Dieser äusserst langsame Angriff unter sauren Bedingungen wird auch in *Abbildung 4.5.B* deutlich. Die Aufnahme der Oberfläche nach 3-tägiger Lagerung in Wasser mit pH 5 scheint sich kaum von der im Anlieferungszustand zu unterscheiden. Die Linsen und Ringli liegen praktisch unverändert vor.

Im basischen Medium, hingegen, ist die Lochbildung viel weiter fortgeschritten, als unter den entsprechenden Bedingungen auf FIOLAX. Bereits in pH 7 (*Abbildung 4.5.C*) sind keine Rückstände in den Vertiefungen mehr enthalten, sondern sie zeichnen sich durch eine ausgeprägte Aushöhlung wie bei pH 10 in *Abbildung 4.5.D* aus.

Eine Vergleichsmessung an den gleichen Glasproben mit einem hochauflösenden Rasterelektronenmikroskop bestätigt die Beobachtungen von oben und hat vor allem für grosse, zerklüftete Strukturen gute Detailinformationen geliefert. *Abbildung 4.6.A* zeigt eine grosse Linse nach Lagerung in pH 5 während 3 Tagen. Die Aufnahme entspricht der AFM-Messung in *Abbildung 4.4.B*.

Verhalten der Linsen vor dem Entspannungsöfen

Damit innere Spannungen im Glas nach der Herstellung von Ampullenflaschen weitgehend vermieden werden können, wird das fertige Behältnis in einem Ofen bei maximal 600°C langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Einfluss dieses Entspannungsöfens auf die Struktur der Linsen konnte im folgenden Experiment aufgezeigt werden.

Ein frisch gefertigtes Vial (Füllvolumen 1 ml) aus FIOLAX Glas wurde an der Produktionsanlage unmittelbar vor dem Eintreten in den Entspannungsöfen entnommen. Diese Glasprobe wurde ohne weitere Behandlung gemäss Abschnitt 3.5 präpariert und die Innenoberfläche der unteren, linsenreichen Hälfte des Vial mittels AFM abgebildet.

Wie erwartet, waren grosse, kreisrunde Linsen von unterschiedlicher Grösse und Dichte messbar (*Abbildung 4.7.A*). Wurde jetzt eine dieser Proben für einige Minuten in Wasser gewaschen oder in Wasser gemessen, so entstand ein ganz ähnliches Bild wie unter sauren Bedingungen, wo die Linsen im Medium ausgehöhlt wurden. Auch hier blieb der Rand der ursprünglichen Linsen bestehen (*Abbildung 4.7.B*).

Ringlistrukturen

Im Rasterelektronenmikroskop (*Abbildung 4.6.B*) und im Rasterkraftmikroskop (*Abbildung 4.8.A*) konnten die Ringlistrukturen auf KG-33 mit hoher Auflösung erfasst werden. Es fällt auf, dass praktisch die gesamte Oberfläche von dicht aneinanderliegenden Ringli besetzt ist.

Vergleichbare Strukturen sind auch auf Deckgläsern für die Lichtmikroskopie, sowie auf der Aussenseite von Glasvials beobachtet worden. Die *Abbildungen 4.8.A* und *B*, sowie *4.9.A* und *B* zeigen eine Auswahl solcher Messungen.

Wie bereits darauf hingewiesen wurde, sind Ringli nur als solche erkennbar, wenn die Glasoberflächen von 33-er Vials zuvor mit Wasser oder Säure abgewaschen wurden. Im Anlieferungszustand, hingegen, wird jedes einzelne Ringli von einem kristallinen Partikel überdeckt. Zwei AFM-Aufnahmen der gleichen Stelle vor und nach der Wasserbehandlung sind in den *Abbildungen 4.10.A* und *4.10.B* dargestellt. Die Partikel waren nicht nur mit Wasser und Säure, sondern auch mechanisch mit einem Wattestab oder Tuch wegwischtbar.

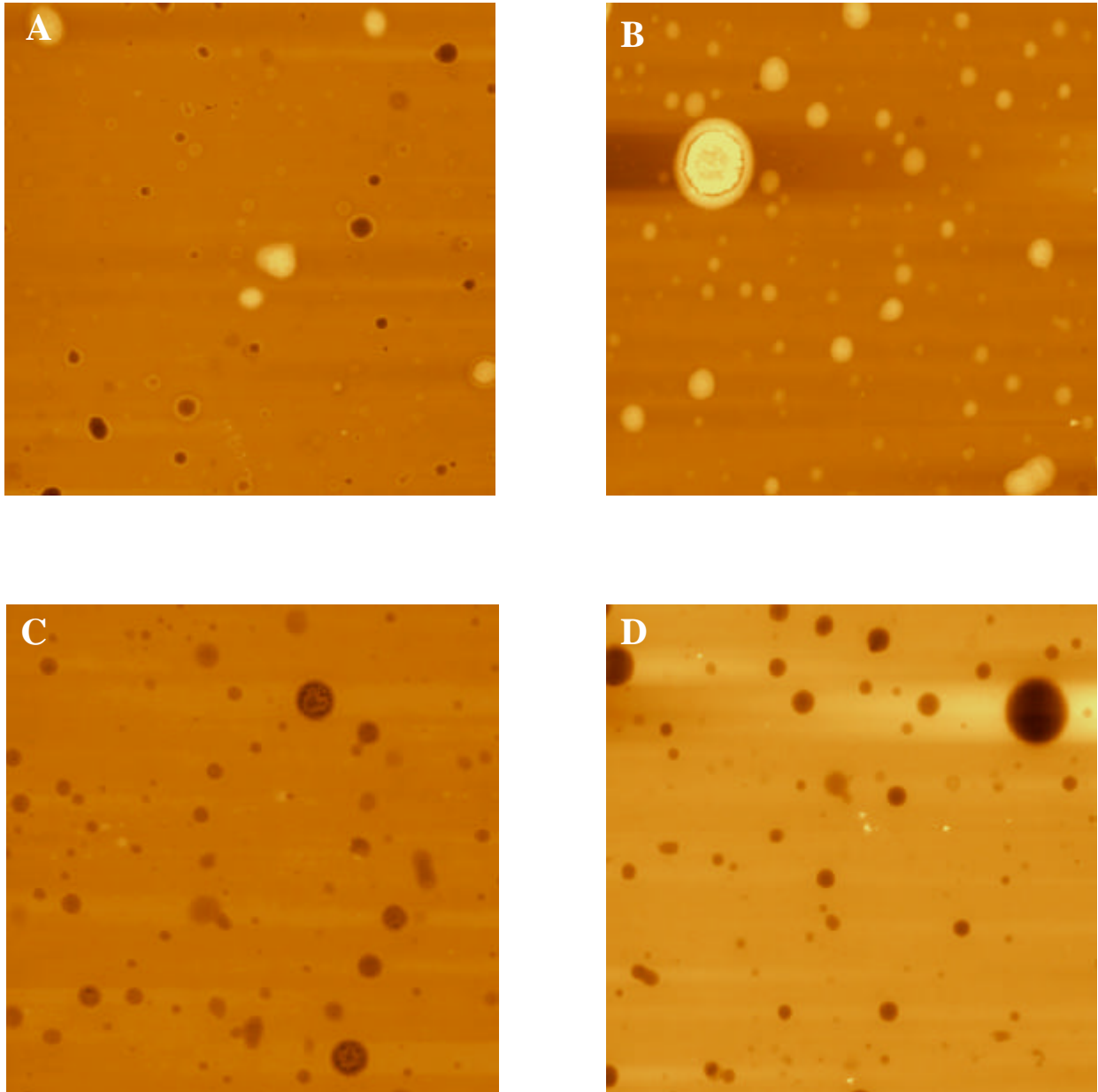


Abbildung 4.4: Topographiebilder der Innenoberflächen von FIOLAX-Vials nach 3-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur in wässrigen Lösungen von (A) pH 3, (B) pH 5, (C) pH 7 und (D) pH 10. Alle Bilder stammen aus der unteren Hälfte der Vials (10 x 10 μm , Kontraststufenhöhe: 54 nm).

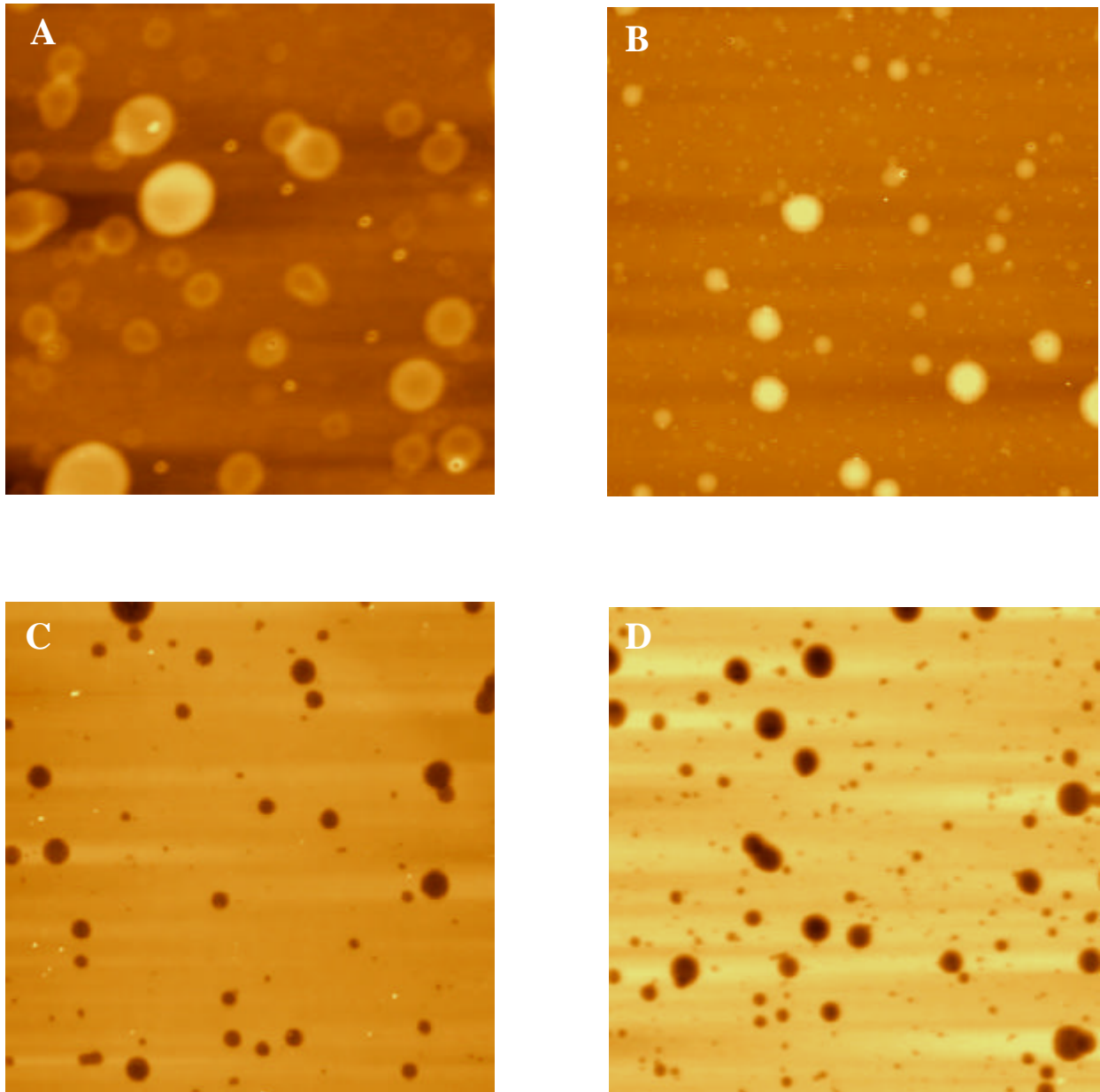


Abbildung 4.5: Topographiebilder der Innenoberflächen von KG-33-Vials nach 3-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur in wässrigen Lösungen von (A) pH 3, (B) pH 5, (C) pH 7 und (D) pH 10. Alle Bilder stammen aus der unteren Hälfte der Vials (10 x 10 μm , Kontraststufenhöhe: 41 nm).

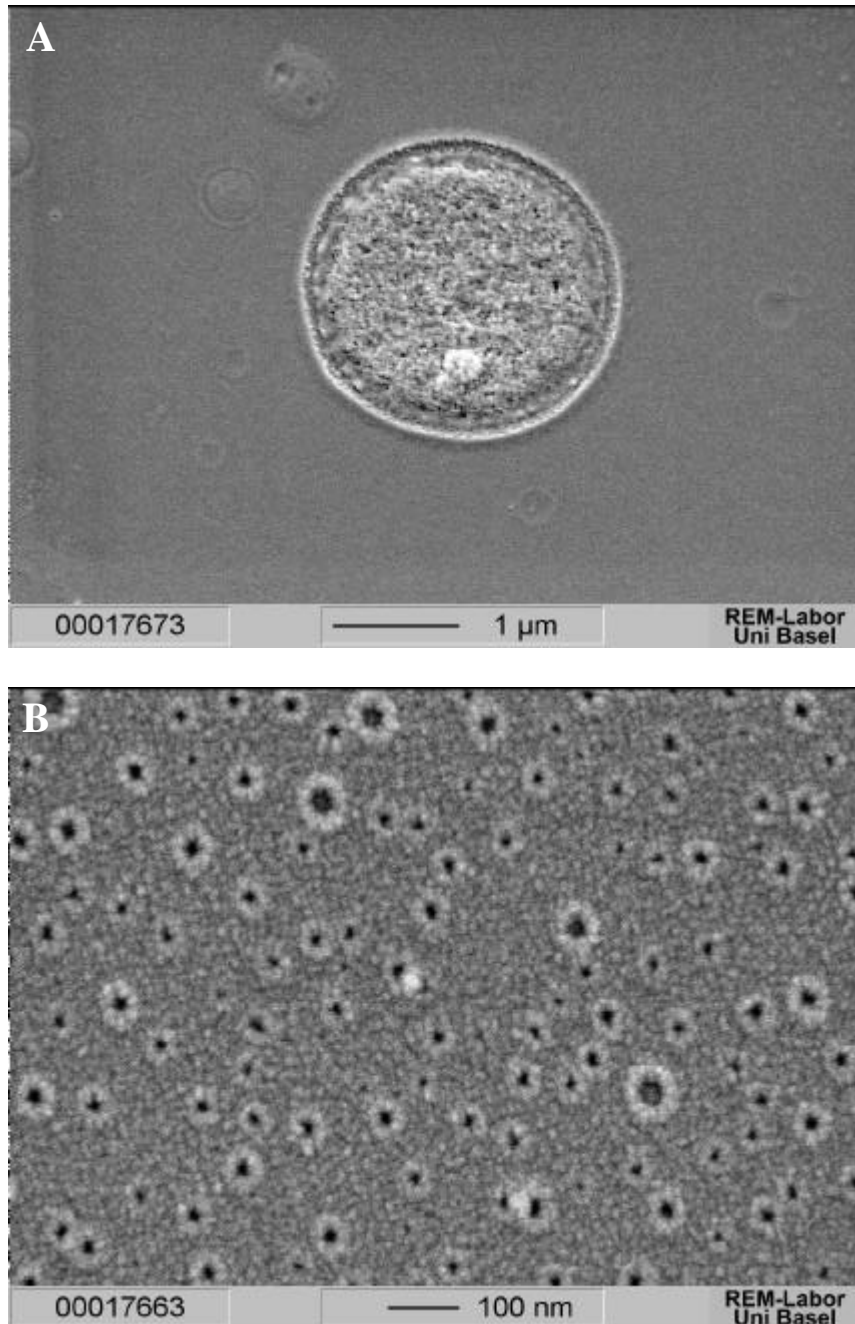


Abbildung 4.6: Rasterelektronenmikroskopaufnahme einer (A) Linse auf der Innenoberfläche eines FIOLAX Vials nach 3-tägiger Lagerung bei pH 5 und (B) der Innenoberfläche eines KG-33 Vials im abgewaschenen Anlieferungszustand mit Ringlistrukturen. Die Körnigkeit des unteren Bildes stammt von der Titanbedampfung.

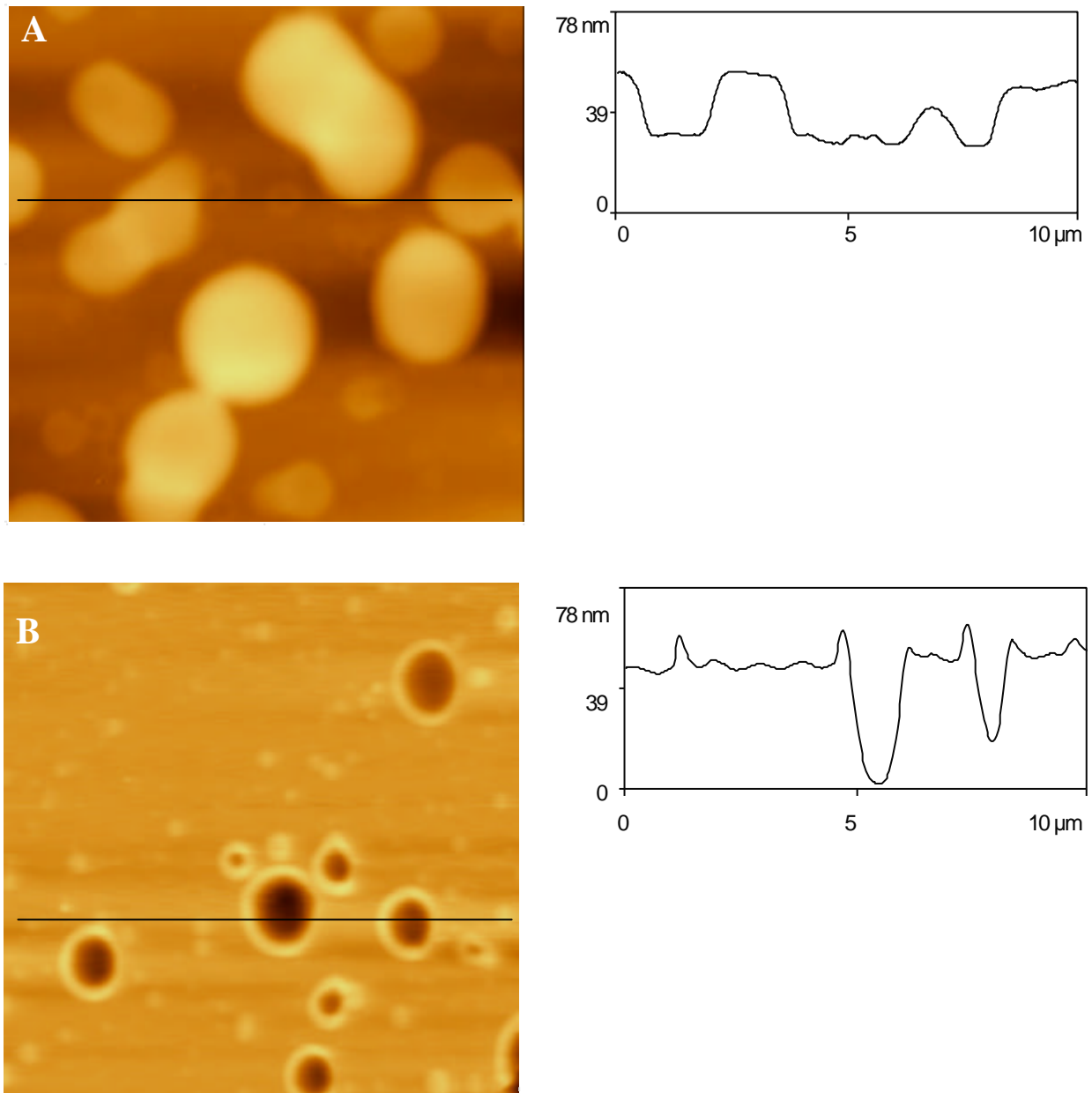


Abbildung 4.7: AFM-Topographiebilder der Innenoberflächen eines FIOLAX-Vials vor dem Entspannungsöfen (A) im Nichtkontaktmodus an Luft gemessen und (B) im Kontaktmodus in Wasser gemessen (10 x 10 μm, Kontraststufenhöhe: 78 nm).

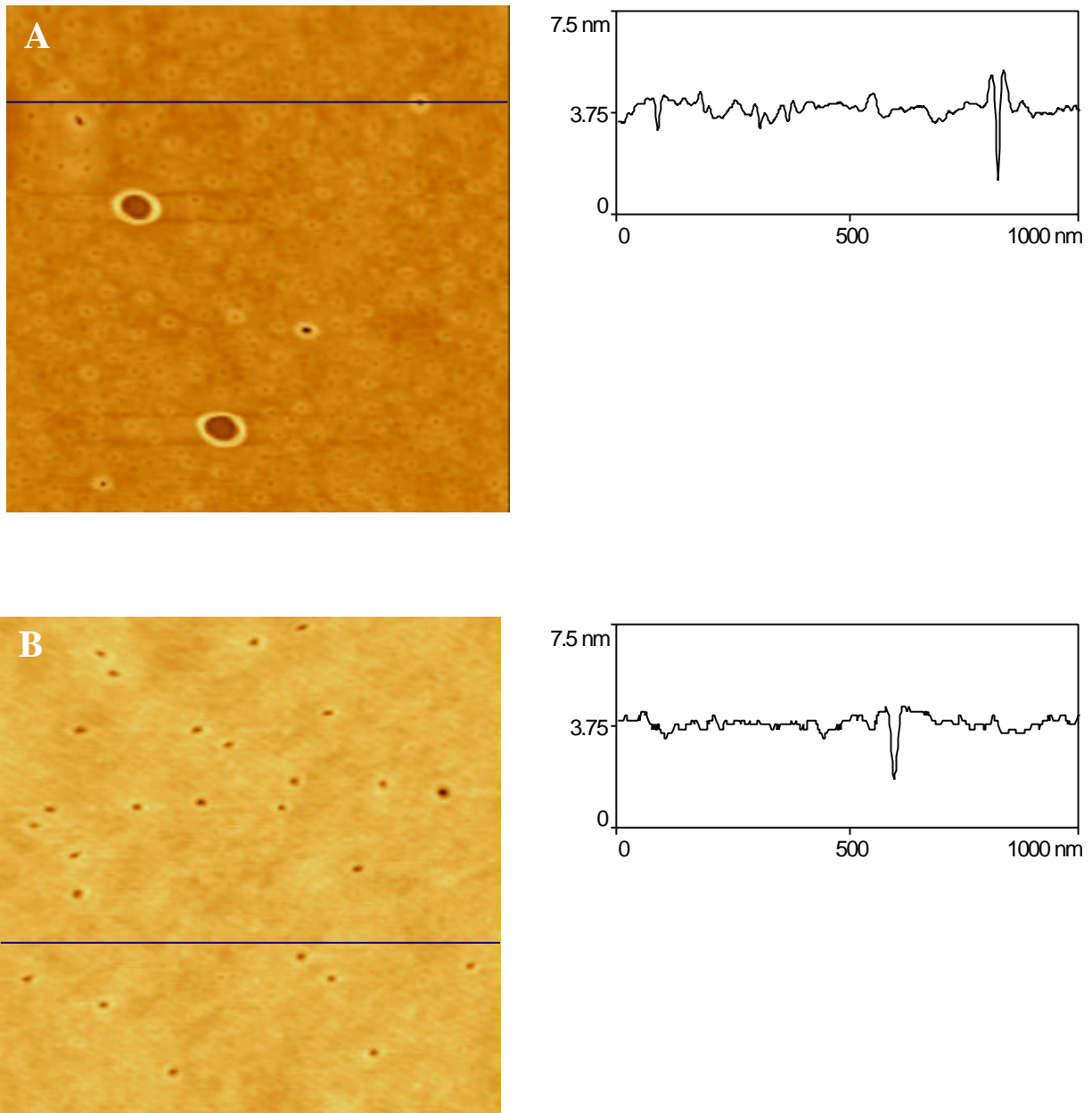


Abbildung 4.8: Topographiebild der (A) Innenoberfläche eines KG-33 Vials im abgewaschenen Zustand und (B) eines Deckgläschens für die Lichtmikroskopie ($1 \times 1 \mu\text{m}$, Kontraststufenhöhe: 7.5 nm). Die mittlere Rauheit, berechnet als das arithmetische Mittel der Höhenabweichung vom Mittelwert, des in (A) eingezeichneten Profils beträgt 0.23 nm, in (B) 0.26 nm.

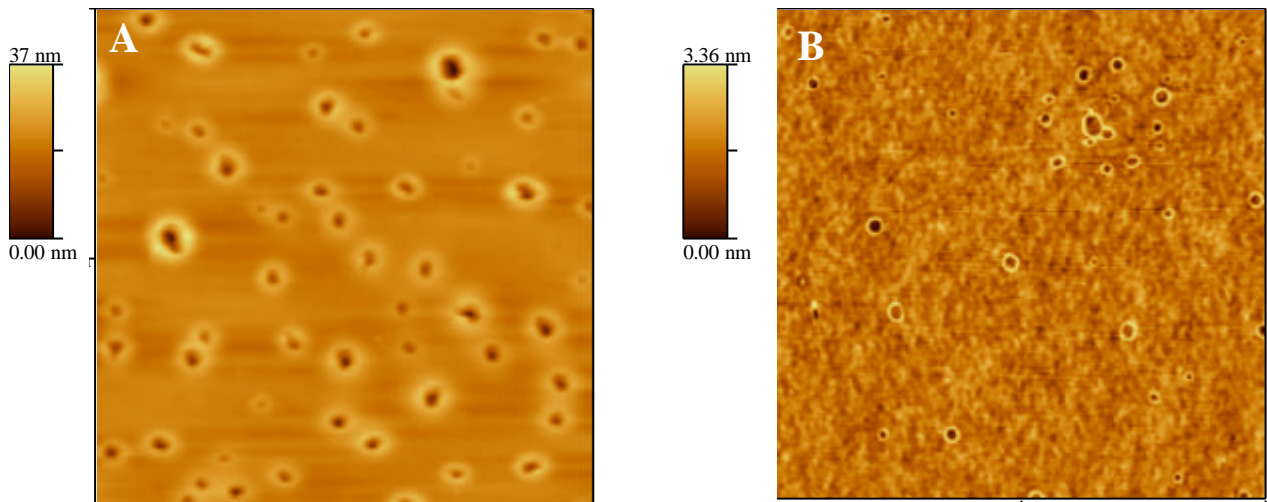


Abbildung 4.9: Topographiebilder der Aussenoberfläche eines (A) KG-33 Vials und (B) FIOLAX Vials ($3 \times 3 \mu\text{m}$).

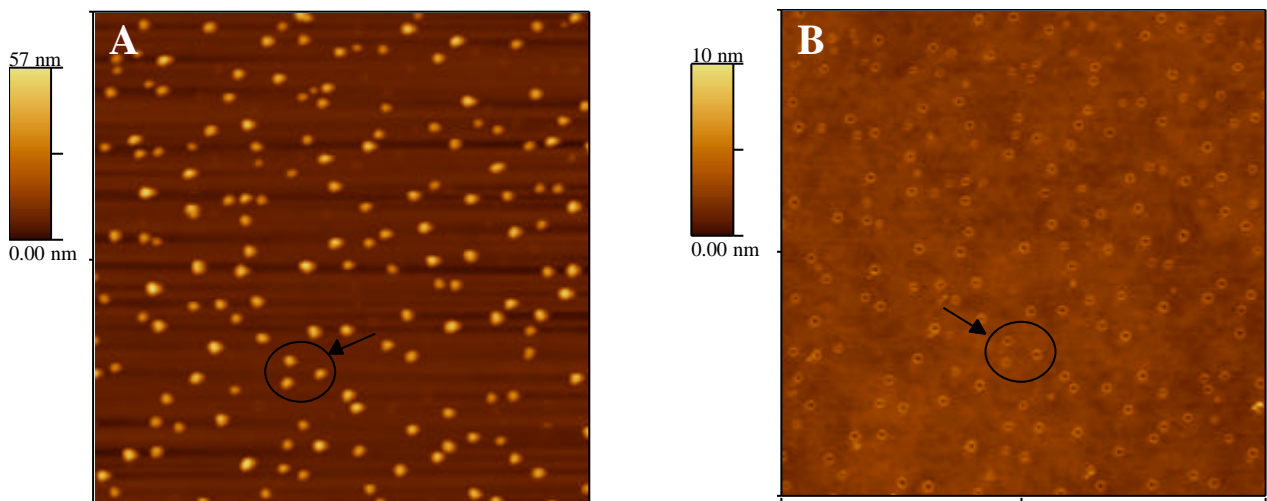


Abbildung 4.10: Topographiebilder der Innenoberfläche eines KG-33 Vials (A) im Anlieferungszustand und (B) nach Abwaschen mit Wasser ($5 \times 5 \mu\text{m}$). Die Markierung verweist auf die gleiche Stelle vor und nach der Behandlung mit Wasser.

4.1.3 Fertigspritzen

Die Topographie von Innenoberflächen der Fertigspritzen ist viel schwieriger zu charakterisieren, als die der Vials. Weder bei FIOLAX noch bei KG-33 Glas treten regelmässig die gleichen Strukturen auf. Im Anlieferungszustand konnten auf FIOLAX häufig, auf KG-33 seltener einzelne Partikel auf der Oberfläche gemessen werden. Während die meisten Strukturen auf FIOLAX in Wasser unlöslich waren (*Abbildung 4.11.A*), konnten praktisch alle Partikel auf KG-33 abgewaschen werden (*Abbildung 4.11.B*).

Nach dem Silikonisierungsschritt an der Abfüllanlage weisen FIOLAX Gläser häufiger als KG-33 Gläser flache Einzelstrukturen auf, welche weder mit Wasser noch mechanisch entfernt werden konnten (*Abbildung 4.11.C und D*).

Eine geheimnisvolle Ausnahme bilden die Fertigspritzen einer Charge aus DURAN Glas, einem dem KG-33 vergleichbaren Glas aus der Gruppe mit tiefen Expansionskoeffizienten. Auf der Innenoberfläche solcher Fertigspritzen wurden im unbehandelten Zustand kristalline Figuren im AFM abgebildet (*Abbildung 4.12.A und 4.12.B*), die weder mechanisch zu entfernen, noch in Wasser löslich waren. Mit einer erstaunlichen Reproduzierbarkeit wurden Strukturen dieser Art jeweils im unteren Drittel gegen die Spritzenmündung detektiert. Einfachere Formen, aber wiederum unter Ausbildung von 120° -Winkeln, schienen auch auf anderen Fertigspritzen aus 33-er Glas vorzukommen. Ein Beispiel dafür sind die in *Abbildung 4.12.C* gezeigte, auf der Innenoberfläche einer KG-33 Fertigspritze entstandenen Figuren.

Veränderung der Topographie in wässrigen Lösungen

Aufgrund der schlechten Charakterisierbarkeit resp. des Fehlens von Strukturen auf den Innenoberflächen von Fertigspritzen, fielen die analogen Versuche mit sauren und basischen Lösungsmitteln, wie sie mit den Vials durchgeführt worden waren, wenig aussagekräftig aus. Aufgefallen ist einzig das Auftreten von kleinen Löchern auf FIOLAX Glasproben, die während 3 Tagen in pH 10 gelagert worden sind.

4.1.4 Chemische Zusammensetzung der Innenoberflächen von Vials und Fertigspritzen

Röntgen-Photoelektronenspektroskopie

Bisher sind die Strukturen auf den Oberflächen mit AFM abgebildet worden. Einen weiteren, wichtigen Aufschluss auf die Herkunft und Ursache dieser Strukturen liefert die chemische Analyse. Dazu wurden FIOLAX und KG-33 Glasproben von Rohrglas und von der unteren Hälfte eines Vials resp. der Spritzenhälfte nahe des Konus im Anlieferungszustand und im gewaschenen resp. silikonisierten Zustand vorbereitet. Von FIOLAX Vials waren zusätzlich Proben nach dem Sterilisiertunnel verfügbar.

Jeweils zwei verschiedene Stellen der Oberflächen wurden mittels XPS gemessen und die Atomprozentage der gefundenen Elemente gemittelt. Aus Diagramm 4.1 – 4.4 kann die Verteilung der sechs häufigsten Elemente auf den verschiedenen Oberflächen entnommen werden.

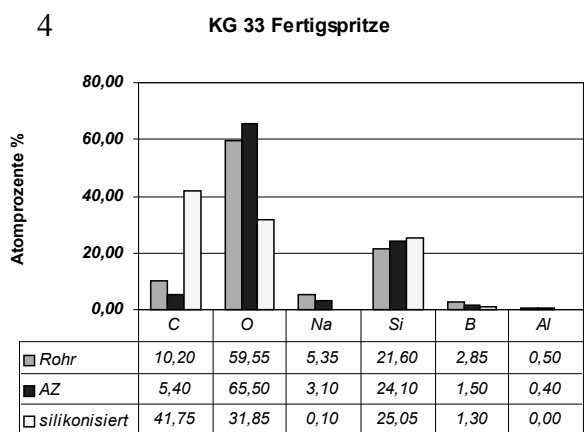
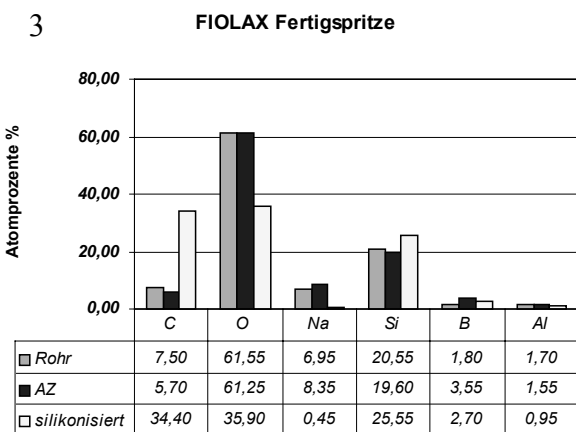
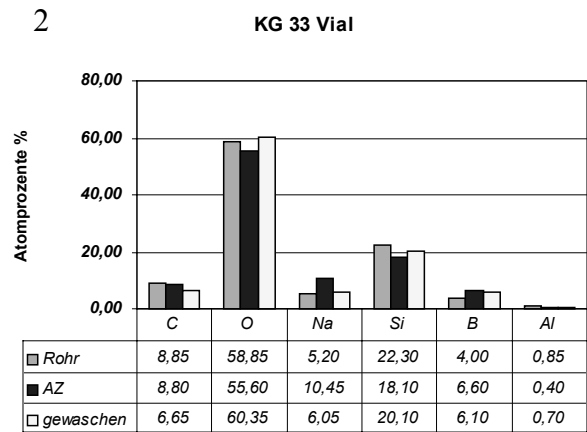
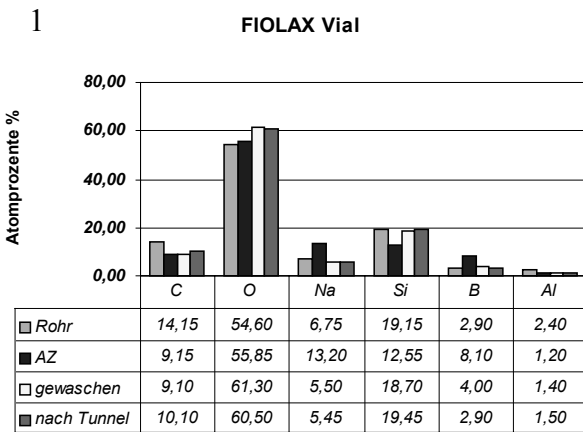


Diagramme 4.1 - 4.4: Atomprozentage der häufigsten Elemente auf den Innenoberflächen von FIOLAX und KG-33 Vials resp. Fertigspritzen gemäss XPS-Analyse. (AZ= Anlieferungszustand)

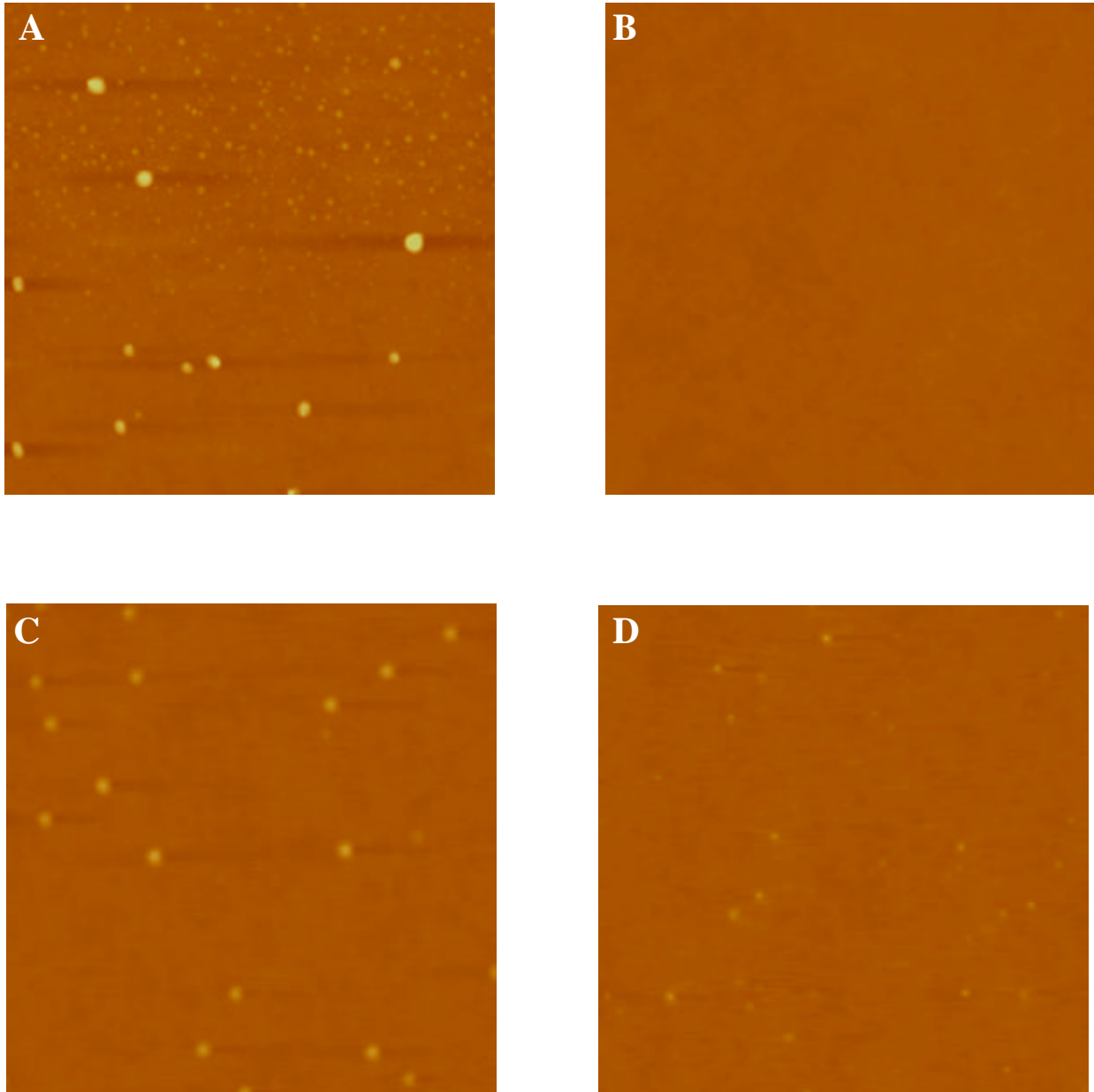


Abbildung 4.11: Topographiebilder der Innenoberflächen einer (A) FIOLAX Fertigspritze und (B) KG-33 Fertigspritze im abgewaschenen Anlieferungszustand und nach Silikonisierung (C, FIOLAX) und (D, KG-33). Die Aufnahmen stammen aus der Nähe des Spritzenhals ($5 \times 5 \mu\text{m}$, Kontraststufenhöhe: 31 nm).

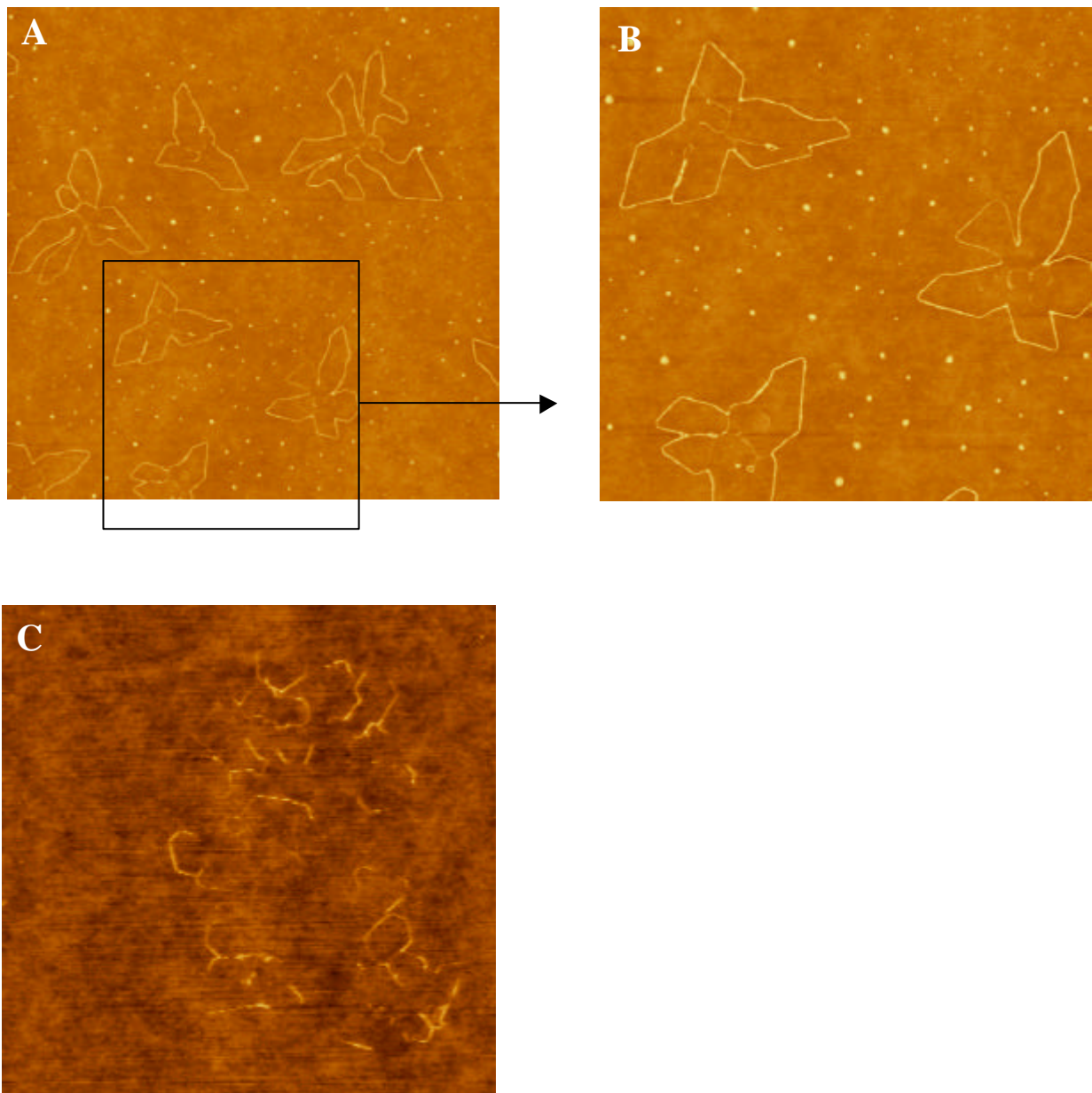


Abbildung 4.12: Topographiebilder der Innenoberflächen einer (A) DURAN Fertigspritze und (C) KG-33 Fertigspritze im abgewaschenen Anlieferungszustand (20 x 20 μm, Kontraststufenhöhe: 11 nm). (B) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von (A) (10 x 10 μm, Kontraststufenhöhe: 11 nm).

Gegenüber den Rohrgläsern findet sich eine markante Zunahme von Natrium- und Borionen auf den obersten 3-4 Atomlagen der Proben von FIOLAX und KG-33 Vials, sowie gering von FIOLAX Fertigspritzen. Auf KG-33 Fertigspritzen, wo auch im AFM keine Strukturen gemessen wurden, nimmt der Anteil an Natrium und Bor im Anlieferungszustand sogar leicht ab. Entsprechend gegenläufig verhalten sich die Anteile an SiO_2 (Silizium und Sauerstoff).

Bei FIOLAX und KG-33 Vials wurde der Einfluss der kurzen Behandlung mit Wasser geprüft, wobei gemäss den AFM-Messungen bei KG-33 vorwiegend die Partikel über den Ringli entfernt wurden. Bei KG-33 wird fast ausschliesslich der Anteil an Natriumionen reduziert. Bei FIOLAX Vials sinkt nach kurzem Wasserkontakt sowohl der Natrium- als auch der Boranteil. Letzterer fällt nach Durchlauf der Waschmaschine und des Tunnels weiter ab, so dass die löslichen Natrium- und Borbestandteile nach dem Tunnel praktisch wieder den Anfangswert des Rohres erreichen.

In den Fertigspritzen fällt durch die Silikonisierung der Anteil an Natrium-, Bor- und Aluminiumionen praktisch auf Null ab. Der Kohlenstoff stellt ausser auf den silikonisierten Flächen eine natürliche Kontamination der Oberfläche dar.

Mittels XPS kann ein Tiefenprofil der Glasinnenoberfläche aufgenommen werden, indem die Elementverteilung während eines Abtragungsvorgangs verfolgt wird. Am Beispiel von FIOLAX konnte so eine deutliche Anreicherung von Natriumionen an der Oberfläche gezeigt werden (*Diagramm 4.5*). Das Probenmaterial wurde während 10 Minuten mit 4 keV Argon gesputtert, was auf SiO_2 eine Abtragung von 176 nm Oberfläche bewirkt. Der rasche Abfall von Kohlenstoff ist wiederum auf die Verunreinigung an der Oberfläche zurückzuführen.

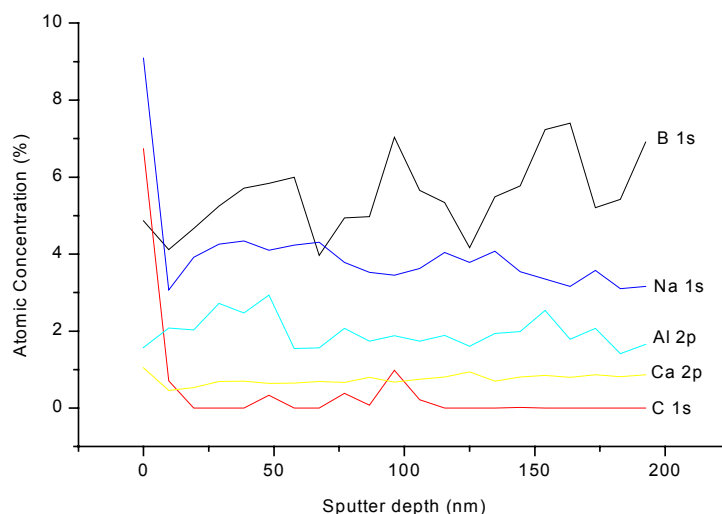


Diagramm 4.5: XPS-Tiefenprofil der Innenoberfläche eines FIOLAX Vials im abgewaschenen Anlieferungszustand. (Sputtergeschwindigkeit: 17.6 nm/min)

Mikrosonde

Der Versuch, die Strukturen an der Glasoberfläche mit der zugehörigen chemischen Elementverteilung an der Elektronenstrahlmikrosonde (EMS) abzubilden, ist insbesondere an der relativ hohen Eindringtiefe des Elektronenstrahles im μm -Bereich gescheitert. Dadurch sind die Informationen der obersten 50-100 nm, welche für die Identifizierung der Linsen von Bedeutung gewesen wären, verloren gegangen.

Hingegen konnte die Anreicherung von Natrium- und Bor an der Oberfläche mit Hilfe der Mikrosondentechnik qualitativ dargestellt werden. In *Abbildung 4.13.A* ist das Sekundärelektronenbild einer FIOLAX Rohrglasprobe mit einem Oberflächenriss dargestellt. Die *Abbildungen 4.13.B, C und D* zeigen die Elementverteilungen für Natrium, Bor und Silizium der gleichen Stelle. Die Anreicherung von Natrium und Bor am Oberflächenriss, der senkrecht zur Oberfläche verlief, tritt deutlich hervor, während sich das Siliziumvorkommen auf den Glasbulk beschränkt.

4.1.5 Zusammenfassung der Resultate

	Vial FIOLAX	Vial KG-33	Fertigspritze FIOLAX	Fertigspritze KG-33
Linsen	wasser- und säurelabil	wasser- und säurestabil	linsenähnliche Strukturen	linsenähnliche Strukturen
Partikel	abwaschbar in Wasser (Reibungscontrast)	keine	teilweise abwaschbar in Wasser	abwaschbar in Wasser
Besondere Strukturen	keine	Ringli: wasser- und säurestabil Partikel auf Ringli: in Wasser abwaschbar	keine	Figuren (v.a. DURAN)
Alkaligehalt im AZ	++++	+++	++	+
Alkaligehalt, abgewaschen	++	++		
Aluminium Gehalt im AZ	++	+	++	+
Alkali nach Tunnel / Silikonisierung	++		(+)	-

Tabelle 4.1: Topographie und Chemie der Innenoberflächen von FIOLAX und KG-33 Vials und Fertigspritzen im Anlieferungszustand (AZ) und nach entsprechender Behandlung. Analyse mittels AFM und XPS bzw. EMS.

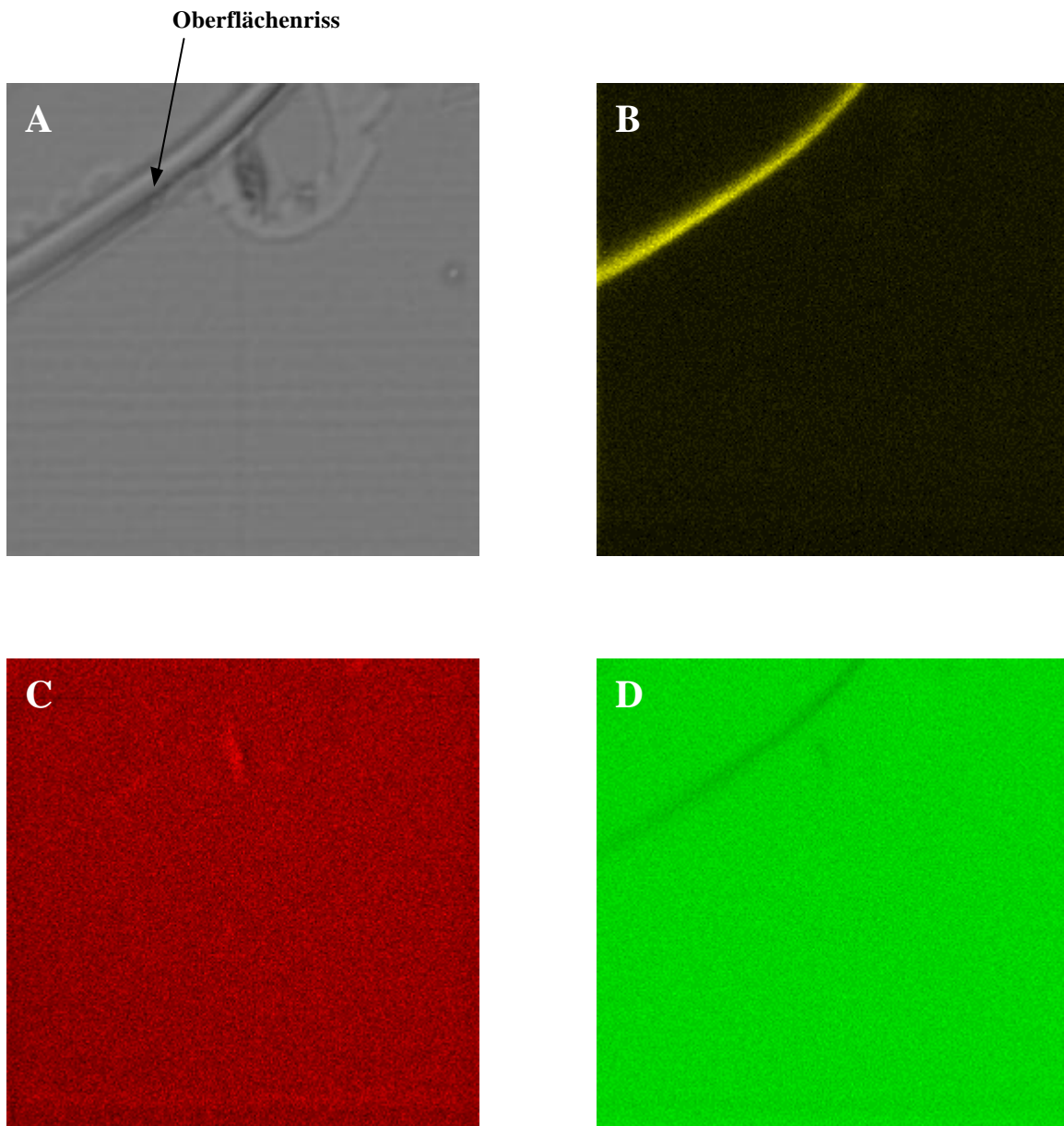


Abbildung 4.13: Qualitative Mikrosonde-Elementverteilungsbilder der Bruchfläche eines FIOLAX Glasrohres. In (A) ist das Sekundärelektronenbild des Ausschnittes mit dem Oberflächenriss dargestellt (80 x 80 μm). (B) zeigt deutlich die Anreicherung von Natrium am Oberflächenriss, während in (C) die Bor-Anreicherung nur schwach erkennbar ist. (D) zeigt die homogene Verteilung von Silizium im Bulkglas, während um den Oberflächenriss praktisch kein Silizium detektiert wurde. (80 x 80 μm , heller Kontrast bedeutet Anreicherung des jeweiligen Elementes).

4.1.6 Hochauflösung auf Silikaglas

In Zusammenhang mit einer anderen, dem Dissertationsthema aber eng verwandten Fragestellung wurde versucht, mit dem Rasterkraftmikroskop der Strukturaufklärung von Silikaglas im Nanometerbereich näher zu kommen. Silikaglas oder Kieselglas ist amorph und besteht aus reinem Siliziumdioxid.

Zur Untersuchung der Bulkglasstruktur muss eine möglichst saubere Bruchfläche des Glases jeweils frisch präpariert werden. Die Probe wurde mit einem weichen Siliziumnitrid Cantilever im Kontaktmodus in Wasser gemessen, damit die Einwirkung von Normalkräften gering bleibt und eine möglichst gute Auflösung der Feinstruktur mit AFM erzielt werden kann. Das Wasser wurde nahe des isoelektrischen Punktes von Silikat auf einen pH von 3 angesäuert [Doremus, 1994], so dass Ladungen auf der Bruchfläche reduziert werden konnten. Die Silikaprobe wurden am Institute des Verres in Montpellier hergestellt und mit der Vierpunktemethode durch eine definierte Krafteinwirkung kurz vor der Messung gebrochen.

In *Abbildung 4.14.A* und *4.14.B* sind Ausschnitte der Bruchfläche gezeigt. Die laterale Auflösung liegt bei ungefähr 10 nm.

4.2 Diskussion

4.2.1 Rohrglas

Die Herstellung von Glasrohren aus FIOLAX und KG-33 verläuft technisch weitgehend identisch. Trotzdem unterscheiden sich die Topographien beider Gläser im Anlieferungszustand voneinander. Eine Vielzahl von Messungen auf verschiedenen Glassorten hat gezeigt, dass nur Partikel auf der Innenoberfläche von Gläsern mit Expansionskoeffizient grösser $49 \times 10^{-7} (\text{°C})^{-1}$ gemessen werden. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Partikeln und dem Alkaligehalt der Glasoberfläche.

Aufgrund der Analysen mit XPS und Mikrosonde wissen wir, dass sich im Glasrohr mobile Ionen wie Natriumionen an der Oberfläche anreichern. Diese können mit gasförmigem Wasser oder Säuren der Luft, z.B. Kohlendioxid, reagieren und Salzkristalle bilden [Peters, 1980]. Solche Ausscheidungen auf dem Glas, z.B. die Partikel auf FIOLAX Rohrglas, sind wasserlöslich und sind häufiger anzutreffen, je mehr Natrium- und/oder Calciumionen an der Oberfläche zur Verfügung stehen.

Aus den Reibungsmessungen geht hervor, dass der beobachtete Kontrast auf Glasrohroberflächen mit dem Vorkommen von Partikeln korreliert. Der Reibungskontrast gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass sich die Glasoberfläche von den Stellen, wo an Luft Partikel auskristallisieren, unterscheidet. Es bleibt allerdings dahingestellt, ob der Kontrast durch einen winzig kleinen, im Topographiebild nicht mehr aufgelösten, Restpartikel zustande gekommen ist, oder ob es sich tatsächlich um einen Materialunterschied handelt.

4.2.2 Vials

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei FIOLAX und KG-33 Vials gemacht. Mittels Abbilden und XPS-Analyse der Oberfläche vor und nach dem Wegwaschen der Partikel auf den Ringli von KG-33 konnte sogar ein indirekter Beweis erbracht werden, dass diese kristallinen Partikel vorwiegend aus Natrium bestehen.

Das besondere auf KG-33 sind aber noch die den abwaschbaren Partikel zugrunde liegenden Ringlistrukturen des Grundglases. Die Ringli könnten entweder eine Folgereaktion in der Umgebung der kristallinen Abscheidungen darstellen, oder sie sind vor den Partikeln durch Korrosion entstanden und bilden ein Kernzentrum für die Salzkristallisation.

Die Linsen sind wahrscheinlich im Gegensatz zur Ringli- und Partikelbildung eine direkte Folge der Vialherstellung. Weil die Formgebung des Bodens einer Ampullenflasche bis zu 1200°C hohe Temperaturen erfordert, können leichter flüchtige Glaskomponenten, z.B. Alkalioxide und Borsäure, im gasförmigen Zustand entweichen [Peters, 1980] und auf kälteren Oberflächen in Form von Tröpfchen (Linsen) wieder kondensieren. Somit kommt es zu einer Alkali- und Boranreicherung an den Innenwänden des Fläschchens, wie wir dies für FIOLAX und KG-33 mit XPS bestätigt haben. Durch die lokale Erwärmung des Bodens bildet sich eine gegen die Wände des Innenvolumens gerichtete Verdampfungskeule und prägt somit die Verteilung der Kondensationströpfchen.

Dass sich die Tröpfchen auf FIOLAX Glas in reinem Wasser und Säure rascher auflösen als in KG-33, könnte mit dem a priori höheren Gehalt an Alkaliverbindungen in FIOLAX zusammenhängen. Natriumborate sind gut säurelöslich, während die Hydrolyse von Silikatverbindungen durch einen hohen pH begünstigt wird [Vogel, 1992; Doremus, 1994]. Deshalb erfährt KG-33 umgekehrt durch den hohen Silikatgehalt eine geringere Basenstabilität als FIOLAX.

Wie mit den Glasproben vor dem Entspannungsofen gezeigt werden konnte, lassen sich Natrium- und Borreiche Agglomerationen unmittelbar nach ihrer Kondensation auf der Oberfläche viel einfacher lösen als nach dem Kühllofen. Der Grund liegt vermutlich darin, dass bei

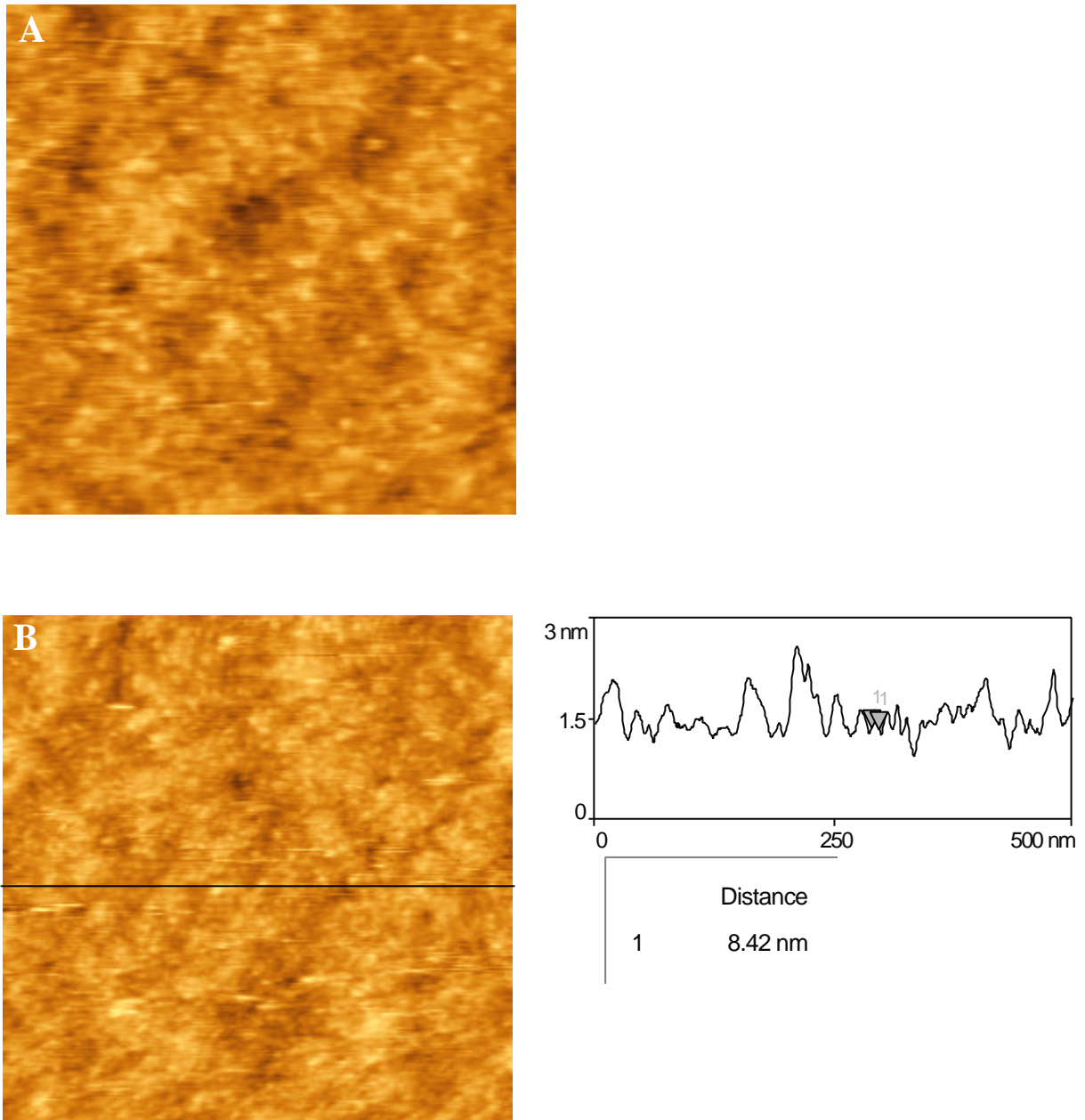


Abbildung 4.14: Topographiebilder einer Bruchfläche von Silikaglas (A) und (B) (500 x 500 nm, Kontraststufenhöhe: 3 nm). Im Profil von (B) lässt sich eine laterale Auflösung von ca. 10 nm abschätzen.

höheren Temperaturen (<600 °C) Alkaliborate, die bekanntlich die einfachsten Gläser bilden, an- bzw. einglasen, wobei sie optisch wieder unsichtbar werden [Peters, 1980]. Damit nimmt auch ihre Löslichkeit drastisch ab.

An dieser Stelle möchte ich erwähnen, dass diejenigen Vials, die an der Produktionskette vor dem Entspannungsofen entnommen wurden, einen gelblich-braunen Belag auf der Innenseite aufwiesen, der erst nach Passieren des Kühlofens verschwand.

Die kondensierten Tröpfchen scheinen sich nicht nur auf der Oberfläche abzuscheiden, sondern reagieren gleichzeitig mit der Glasgrundlage. So jedenfalls wäre die Beobachtung erklärbar, dass beim Herauslösen der Linsen mit Wasser oder Säure eine Vertiefung zurückbleibt. Es finden scheinbar mit der Bulksubstanz Austauschvorgänge statt, welche zur Kraterbildung führen. Gleichermassen kann auch der Rand, der bei der Auflösung der Linsen zurückbleibt, als siliziumreiche und somit bei tiefem pH schwerlösliche Diffusionsschicht interpretiert werden.

4.2.3 Fertigspritzen

Die Innenoberflächen der Fertigspritzen scheinen allgemein homogener aufgebaut als die der Vials. Ihre Oberflächen zeigen nicht nur weniger Topographie, sondern sie sind auch chemisch geringeren Schwankungen ausgesetzt. Insbesondere im silikonisierten Zustand besteht die Oberfläche praktisch nur noch aus Silizium, Sauerstoff und Kohlenstoff, d.h. alle Komponenten des Silikonüberzuges.

Das Fehlen von Linsen auf der Innenoberfläche kann einerseits auf die etwas tieferen Temperaturen bei der Verformung von Fertigspritzen zurückgeführt werden, andererseits erlauben die beidseitigen Öffnungen der Fertigspritze ein besseres Entweichen der flüchtigen Glasbestandteile.

Die Entstehung der kristallinen Figuren auf 33-er Fertigspritzen, vor allem DURAN Glas, ist noch weitgehend ungeklärt. Die Ecken der Figuren scheinen aus den sie umgebenden Einzelpartikel hervorgegangen zu sein. Das häufige Auftreten von 120°-Winkeln innerhalb einer Figur stellt keinen Zufall dar und deutet auf ein hexagonales oder trigonales Kristallwachstum hin. Aufgrund der Unlöslichkeit der Kristallite in Wasser und der scheinbar zeitlich unveränderten Kristallstruktur, könnte das Wachstum primär, d.h. unmittelbar nach der Verformung des Glasrohres, während der langsamen Abkühlung auf der Oberfläche stattgefunden haben. Entweder ist das Glas also als solches an diesen Stellen in den kristallinen Zustand übergegangen, oder es sind wiederum Alkaliionen auf der Oberfläche, welche mit sauren Gasen der Umgebung reagiert haben und als Salzkristalle die Oberfläche bedecken. Die Luftfeuchtigkeit

könnte daraufhin eine Umkristallisation der Einzelkristalle bewirkt haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde von A. Peters [1980] beschrieben. Die Salzbildung auf der Glasoberfläche wird dort als Hüttenrauch bezeichnet. Bei der Verbrennung von Heizöl oder Heizgas entstehen saure Gase von Schwefeloxiden und Kohlensäure, die im Kühllofen mit Alkaliionen reagieren. Bei Temperaturen um 600 °C brennen diese Verbindungen ein.

4.2.4 Silikaglas

Die Auflösung von einzelnen Körnern auf der Silikaglasbruchfläche deutet daraufhin, dass sich mittels AFM die molekulare Struktur von Glas abbilden lässt.

Silikagläser lassen sich einfacher brechen als Quarzglas und zeigen mikroskopisch eine viel glattere Bruchfläche als kristalliner Quarz. Andererseits weist die amorphe Oberfläche von reinem Silikaglas eine bedeutend höhere Rauheit als die gespaltene Oberfläche von Glimmer auf.

Mit AFM-Messungen im Ultrahochvakuum, sowie Elastizitätsmessungen auf der Oberfläche, erhoffen wir uns weitere Erkenntnisse zur Bedeutung und Anordnung der Kornstrukturen in Silikaglas.

5 Proteinwechselwirkungen

5.1 Resultate

5.1.1 Abbilden von Interferon α -2a auf Glimmer und Glas

Die Abbildung von Protein auf Glimmer und Glas mit dem Rasterkraftmikroskop ist in den folgenden Experimenten mit Cantilever aus Silizium, im Nichtkontaktmodus und an Luft erfolgt.

Abbildung 5.1.A zeigt einen Ausschnitt einer Glimmeroberfläche, welche zuvor gemäss Abschnitt 3.6 mit 9.5 $\mu\text{g/ml}$ Interferon α -2a in Pufferlösung pH 7 inkubiert worden war. Aufgrund der geringen Dichte und der durchschnittlichen Grösse der abgebildeten Strukturen von 15 nm im Durchmesser und 0.5 nm Höhe ist anzunehmen, dass es sich dabei um einzelne Proteinmoleküle handelt.

Die Kontrollmessung auf Glimmer in *Abbildung 5.1.B* weist keine vergleichbaren Strukturen auf der Oberfläche auf und erhärtet damit die Beobachtung und die gute Auflösung einzelner Moleküle.

Im Gegensatz zur atomar flachen Oberfläche von Glimmer zeichnet sich Glas durch eine bedeutend höhere Rauheit aus. Die Interpretation von AFM-Bildern kleiner biologischer Adsorbate auf Glasoberflächen wird erschwert, weil einzelne Moleküle in der Oberflächenstruktur des Substrates verschwinden resp. unentdeckt bleiben können. Dennoch sind in *Abbildung 5.1.C*, im Vergleich zur proteinfreien Glasoberfläche einer Fertigspritze aus KG-33 Glas (Füllvolumen 1 ml) in *Abbildung 5.1.D*, individuelle Moleküle erkennbar. Diese liegen trotz geringerer Proteinkonzentration (4.75 $\mu\text{g/ml}$) der inkubierten Lösung dichter aneinander gedrängt als im entsprechenden Experiment auf Glimmer.

Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert

Messungen auf Glimmer zeigen, dass einzelne Proteinmoleküle bei einer Konzentration von 14.25 µg/ml in pH 7 (*Abbildung 5.2.A*) noch erkennbar sind, bei 9.5 µg/ml in pH 5 die Oberfläche aber bereits praktisch vollständig mit Protein bedeckt ist (*Abbildung 5.2.B*). Übereinstimmend wurden bei einer Konzentration von 4.75 µg/ml in pH 7 (*Abbildung 5.2.C*) weniger Ereignisse detektiert als in pH 5 (*Abbildung 5.2.D*).

5.1.2 Kraftspektroskopie auf FIOLAX und Type 1 plus

Abilden der Oberfläche von Type 1 plus

Für die Interpretation der Kraftmessungen ist es unerlässlich, die Topographie der Grundstruktur der verwendeten Substrate zu kennen. Mit dem Rasterkraftmikroskop wurde die Innenoberfläche eines Type 1 plus beschichteten Vial (Füllvolumen 2 ml) gemessen und mit der eines unbeschichteten Vial verglichen. Die in *Abbildung 5.3* dargestellten Aufnahmen lassen erkennen, dass die modifizierte Oberfläche (*A*), im Gegensatz zur unbehandelten FIOLAX Oberfläche (*B*), eine grössere Rauheit aufweist. Die Körner besitzen einen Durchmesser von rund 20 nm und eine Höhe von 1-2 nm.

Aufnahme von Kraft-Distanz Kurven

Die Reproduzierbarkeit der Kraftexperimente ist einerseits durch die simultane Immobilisierung mit Protein aller Cantileverspitzen einer Messserie, andererseits durch die Vielzahl von Einzelmessungen innerhalb einer Serie gegeben. Weil die Absolutwerte der gemessenen Adhäsionskräfte eines präparierten Cantilevers nicht mit denen eines anderen verglichen werden können, musste jeweils der gleiche Cantilever auf beiden zu testenden Glassorten nacheinander verwendet werden. Als Testsubstrate wurden Glasproben von FIOLAX Vials (Füllvolumen 2 ml) und Glasproben von Type 1 plus Vials (Füllvolumen 2 ml) eingesetzt. Bei der Durchführung der Experimente wurde darauf geachtet, dass abwechslungsweise eine Messreihe einmal auf FIOLAX begann, einmal auf Type 1 plus.

Abbildung 5.4 zeigt den rückziehenden Teil einer typischen Kraft-Distanz Kurve, wie sie hier beispielsweise auf einer Type 1 plus-Glasprobe aufgenommen wurde.

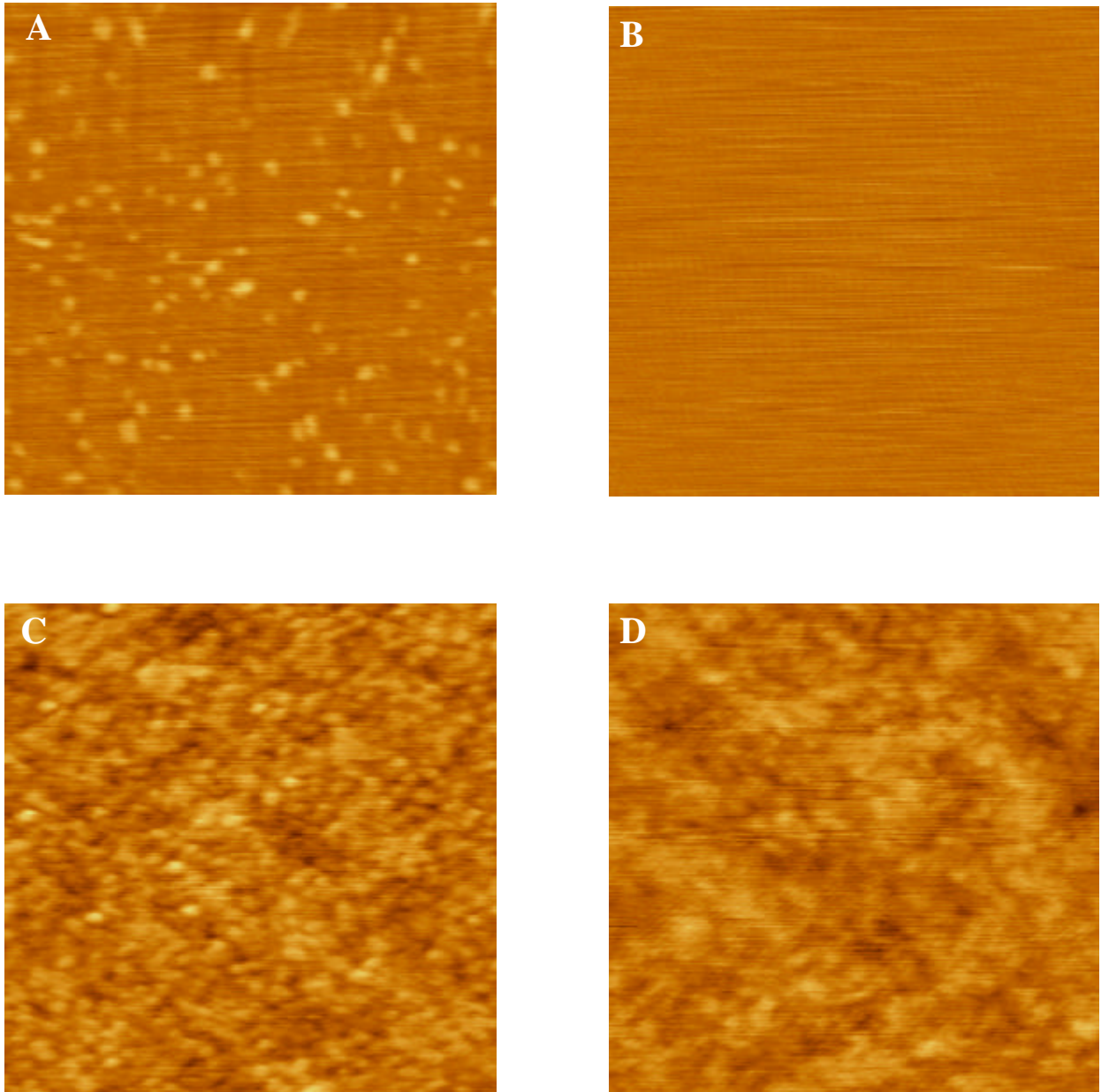


Abbildung 5.1: AFM-Topographiebilder einer Glimmeroberfläche (A) mit und (B) ohne Inkubation von 9.5 $\mu\text{g/ml}$ Interferon α -2a in pH 7 und einer KG-33-Glasoberfläche (C) mit und (D) ohne Inkubation von 4.75 $\mu\text{g/ml}$ Interferon α -2a in pH 7 (500 x 500 nm, Kontraststufenhöhe: 1.6 nm).

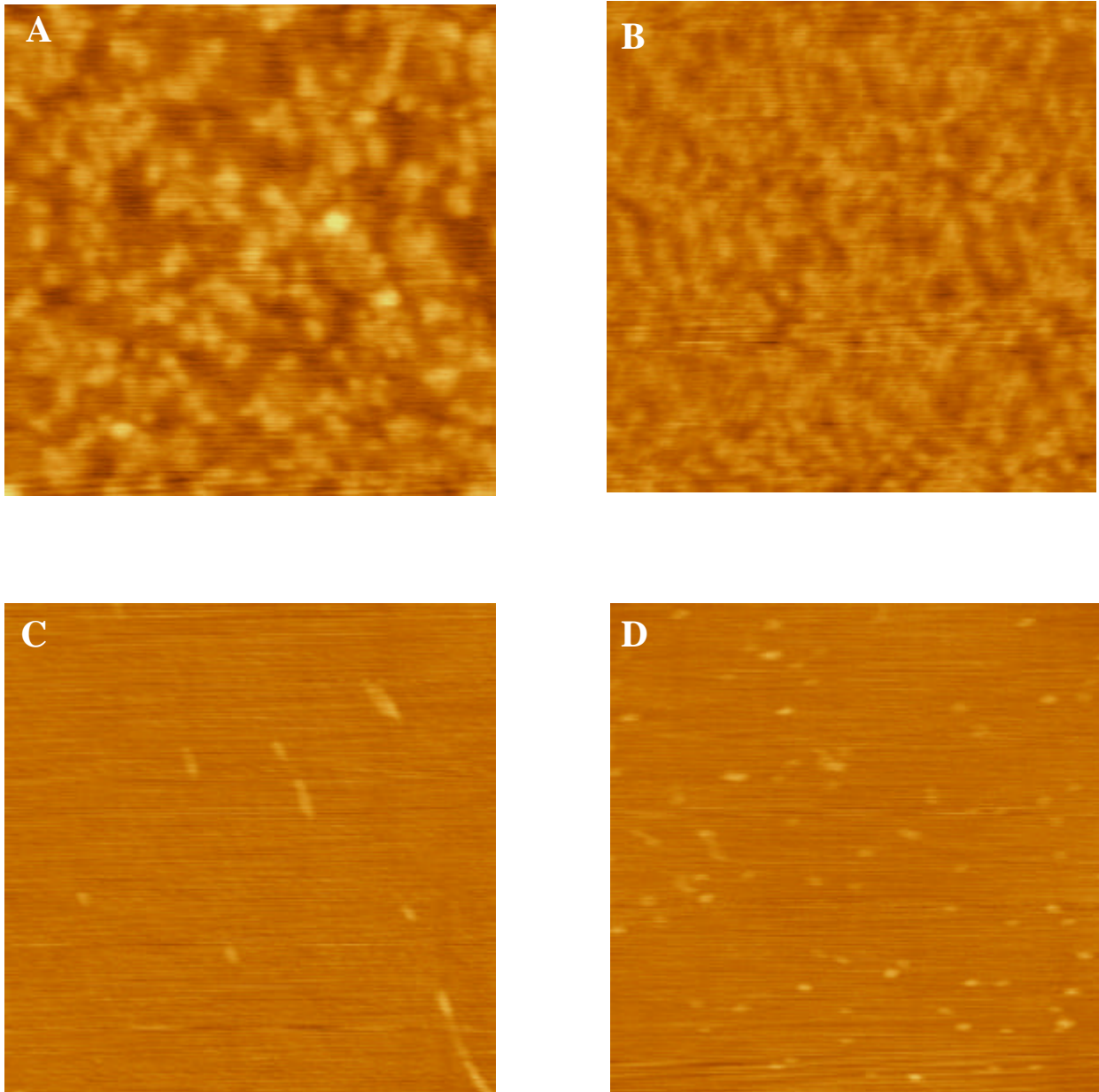


Abbildung 5.2: AFM-Topographiebilder einer Glimmeroberfläche mit Inkubation von (A) 14.25 $\mu\text{g/ml}$ Interferon α -2a in pH 7 und (B) 9.5 $\mu\text{g/ml}$ in pH 5, sowie (C) 4.75 $\mu\text{g/ml}$ Interferon α -2a in pH 7 und (D) 4.75 $\mu\text{g/ml}$ in pH 5 (500 x 500 nm, Kontraststufenhöhe: 1.6 nm).

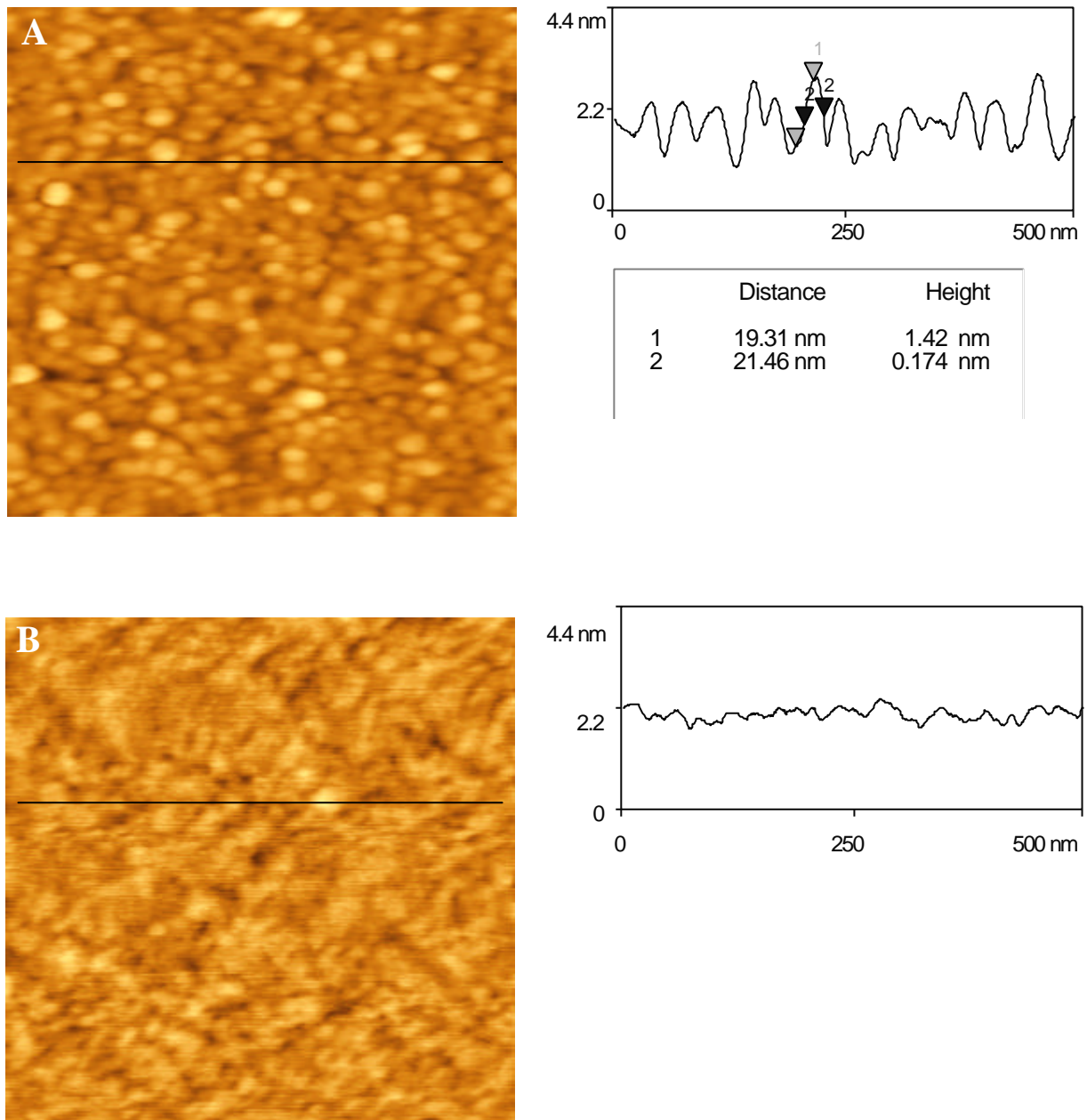


Abbildung 5.3: AFM-Topographiebilder der Innenoberfläche eines (A) Type 1 plus Vials und (B) FIOLEX Vials (500 x 500 nm, Kontraststufenhöhe: 4.4 nm). Im Profil von (A) lässt sich der Durchmesser der Körner auf rund 20 nm und einer Höhe von 1-2 nm abschätzen.

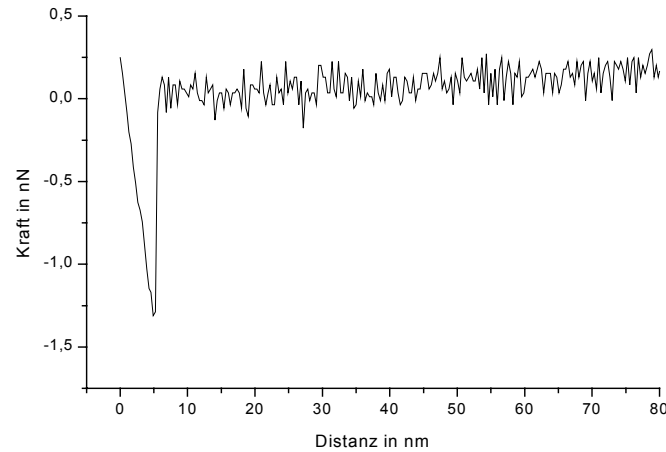


Abbildung 5.4: Rückziehender Teil einer typischen Kraft-Distanz Kurve auf einer Type 1 plus-Glasoberfläche.

Die Verteilung aller insgesamt 150 Messwerte werden in einem Histogramm zusammengetragen und der Erwartungswert anhand der Gaussgleichung ermittelt. In *Abbildung 5.5* liegt das Maximum der Verteilung einer Messserie von 150 Einzelkurven auf Type 1 plus bei 363 ± 111 pN. Im entsprechenden Messexperiment auf FIOLAX liegt der wahrscheinlichste Mittelwert bei 695 ± 173 pN, und ist also rund doppelt so hoch als auf dem SiO₂-beschichteten Glas.

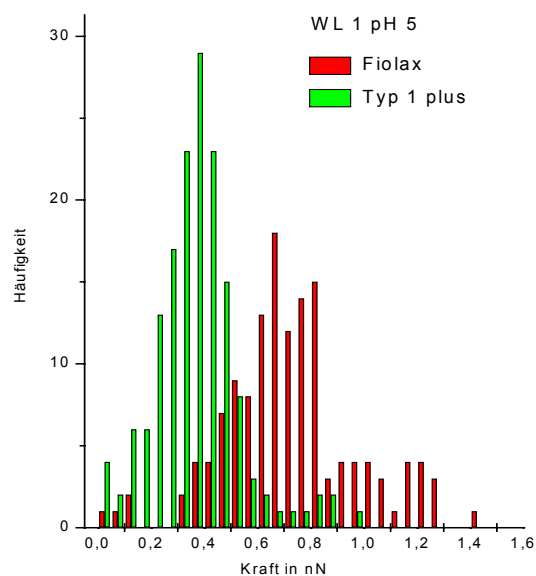


Abbildung 5.5: Verteilung von je 150 Kraft-Distanz-Kurven auf FIOLAX und Type 1 plus.

Als Kontrollexperiment wurden Cantilever ohne Proteinimmobilisierung nach dem gleichen Verfahren getestet.

Um gleichzeitig die Grösse der Adhäsionskräfte in Abhängigkeit des pH-Wertes zu untersuchen, wurden Messreihen bei pH 5 und pH 7 mit jeweils mindestens drei Interferon-immobilisierten Cantilever auf FIOLAX und Type 1 plus durchgeführt. Die Zusammenfassung der Resultate ist in *Tabelle 5.1* wiedergegeben.

pH 5	FIOLAX Adhäsionskraft [pN]	Type 1 plus Adhäsionskraft [pN]	Abweichung der Mittelwerte [%] zwischen FIOLAX und Type 1 plus
Cantilever 1:	695 ± 173	363 ± 111	+ 48
Cantilever 2:	1319 ± 267	850 ± 216	+ 36
Cantilever 3:	1075 ± 502	690 ± 222	+ 36
mittlere Abweichung:			+ 40%
pH 7			
Cantilever 4:	214 ± 131	143 ± 121	+ 33
Cantilever 5:	4990 ± 1023	2265 ± 1181	+ 55
Cantilever 6:	1387 ± 486	995 ± 385	+ 28
mittlere Abweichung:			+ 39%

Tabelle 5.1: Adhäsionskräfte und prozentuale Abweichungen zwischen FIOLAX und Type 1 plus Glasoberflächen mit Interferon-gekoppelten AFM-Spitzen bei pH 5 und pH 7.

Beide Messreihen wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Weil die Absolutwerte der gemessenen Adhäsionskräfte von den Eigenschaften der individuell präparierten Cantilever abhängen, sind nur die prozentualen Abweichungen von FIOLAX gegenüber Type 1 plus vergleichbar. Eine Gegenüberstellung beider Messbedingungen in Puffer pH 5 und Puffer pH 7 zeigt eine gleichnamige Verringerung der Interferon-Wechselwirkungskräfte auf Type 1 plus gegenüber FIOLAX um rund 40%.

Die in der Tabelle aufgeführten statistischen Fehler lassen sich anhand der Breite $\pm 2\sigma$, also dem Bereich innerhalb des Vertrauensintervall von 95% um das Maximum der Gauss Glockenkurve mit N Kraftwerten, aus $2\sigma/\sqrt{N}$ abschätzen.

Die Federkonstanten der verwendeten Cantilever wurden über das thermische Rauschverhalten ermittelt (vgl. Kapitel 2, Abschnitt 2.1.6). Sie lagen für die Messbedingung pH 5 im Bereich von 225-265 pN/nm und für Messbedingung pH 7 zwischen 170-400 pN/nm. Die durchschnittlichen Andruckkräfte bei der Kontaktierung der Spitze mit der Substratoberfläche bewegten sich um 320 ± 150 pN.

Die Auswertung der Kontrollexperimente mit Cantilever ohne Interferonmodifizierung zeigt die Umkehrung des Adhäsionsverhaltens (*Tabelle 5.2*).

pH 7	FIOLAX Adhäsionskräfte [pN]	Type 1 plus Adhäsionskräfte [pN]	Abweichung der Mittelwerte [%] zwischen FIOLAX und Type 1 plus
Cantilever R1:	6775 ± 1487	9146 ± 1114	- 35
Cantilever R2:	1472 ± 362	2155 ± 549	- 46

Tabelle 5.2: Adhäsionskräfte und prozentuale Abweichungen zwischen FIOLAX und Type 1 plus Glasoberflächen mit einer nicht-modifizierten (R1) resp. goldbeschichteten (R2) AFM-Spitze bei pH 7.

Sowohl der nicht-modifizierte Cantilever R1, als auch der goldbedampfte, proteinfreie Cantilever R2, reisst mit einer grösseren Kraft auf Type 1 plus ab als auf FIOLAX. Die Ermittlung der Federkonstanten der Silizium-Cantilever ergab für R1 420 pN/nm und für R2 220 pN/nm.

5.2 Diskussion

5.2.1 Abbilden von Interferon α -2a auf Glimmer und Glas

Abhängigkeit vom pH-Wert

Der Erfolg, adsorbierte Proteine mit dem Rasterkraftmikroskop abbilden zu können, ist abhängig von den Wechselwirkungen zwischen Molekül, Substratoberfläche und AFM-Spitze. Angesichts der relativ hohen Dichte von negativen Ladungen auf Glimmer und den zahlreich vorhandenen positiven und negativen Ladungen auf Interferon α -2a ist eine physikalische Adsorption, auch Physisorption genannt, durch ionische Wechselwirkungen denkbar. Die Adsorption wird deshalb auch durch die Wahl des pH-Wertes der Inkubationslösung beeinflusst.

Bei pH 7 hat das Protein mit einem isoelektrischer Punkt von zirka 6 eine schwach negative Nettoladung und erfährt von der ebenfalls negativ geladenen Glimmeroberfläche eine elektrostatische Abstossung. Bei pH 5, hingegen, sind alle freien Aminogruppen positiv geladen und die Carboxylgruppen protoniert. Hier sind anziehende Kräfte stärker ausgeprägt und könnten für die erhöhte Adsorption auf Glimmer bei pH 5 verantwortlich sein.

Eine erhöhte Adsorption von Interferon α -2a bei pH 5 gegenüber pH 7 wurde auch auf Glasproben erzielt. Auf die Präsentation dieser Resultate habe ich allerdings verzichtet, weil die Aussage mit grossen Unsicherheitsfaktoren behaftet ist. Erstens lässt sich das Ausmass der

Adsorption bei unterschiedlichen pH-Werten wegen der Oberflächenrauheit von Glas nicht ohne weiteres bestimmen und interpretieren. Zweitens ist die Glasoberfläche chemisch und topographisch nicht homogen, so dass das Adsorptionsvermögen je nach Grösse und Herkunft des Bruchstückes variieren kann.

Einen Zusammenhang zwischen elektrostatischen Wechselwirkungen und der Interferon α -2a-Adsorption auf Glas besteht bereits in früheren Experimenten [Gross, 1995]. Es wurden Adsorptionsstudien an Glas in Abhängigkeit des pH-Wertes durchgeführt und die Wiederfindungsrate in der Lösung bestimmt. Bei diesen Untersuchungen resultierte ebenfalls eine geringere Adsorption bei pH 7 gegenüber pH 5.

Einen weiteren Hinweis auf die elektrostatische Natur des Adsorptionsmechanismus lieferten dieselben Studien, indem durch Zugabe von NaCl-Ionen das Adsorptionsausmass weiter reduziert werden konnte.

Bei der Adsorption von Protein auf Oberflächen aus wässrigen Lösungen können auch zugesetzte Hilfsstoffe oder Pufferbestandteile adsorbieren. Für die Interpretation von proteinadsorbierten Oberflächen im AFM sind deshalb Kontrollmessungen mit den wirkstofffreien Lösungsmitteln unerlässlich.

Abschätzung der Molekülgrösse

Die adsorbierten Proteinmoleküle auf Glimmer liegen bei einer Konzentrationen von 4.75 $\mu\text{g/ml}$ in pH 5 gleichmässig über die Oberfläche verteilt. Eine einzelne Struktur misst lateral zirka 10-20 nm und ist damit deutlich grösser als der durch Röntgenkristallographie ermittelte mittlere Durchmesser eines Interferon-Moleküls von ca. 3 nm.

Die Verbreiterung der Abbildung eines Moleküls im AFM kommt durch die Geometrie der abbildenden Spitze zustande (*Abbildung 5.6*).

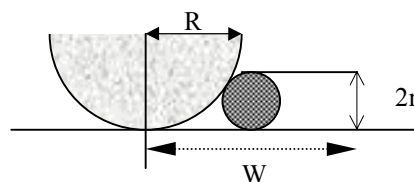


Abbildung 5.6: Verbreiterung des abgebildeten Objektes durch die Grösse des AFM-Spitzenradius.

Gemäss Angaben des Herstellers weist eine Siliziumspitze einen Spitzenradius R von zirka 10 nm auf. Wird für ein Interferon α -2a Molekül ein Durchmesser von 3 nm ($=2r$) angenommen, lässt sich diese Verbreiterung W einfach berechnen:

$$W = 2\sqrt{(R+r)^2 - (R-r)^2} = 15.5 \text{ nm} \quad (5.1)$$

Diese Abschätzung hat allerdings nur Gültigkeit, solange die Moleküle auf der Oberfläche mindestens eine Breite W weit auseinander liegen.

Die effektiv gemessene Höhe einer einzelnen Struktur stimmt meist nicht mit der realen Grösse überein und kann ebenfalls durch die Messung beeinflusst sein. Obwohl sämtliche Proteinmessungen im schonenden Nichtkontaktmodus gemacht wurden, können besonders in Luft Kräfte bis zu einigen Nanonewton auf biologische Moleküle wirken und diese deformieren [Overney, 1998; Shao, 1996]. Andererseits verlieren Proteine beim Adsorptionsprozess ihre helikale Struktur, weil sie versuchen, sich an die ungewohnte Umgebung anzupassen [Norde, 1992].

Aus diesen Gründen sind Rückschlüsse auf die effektive Molekülgrösse anhand der AFM-Abbildungen nur limitiert möglich. Trotzdem möchte ich mit den Resultaten noch eine weitere Überlegung anstellen. Angenommen, ein einzelnes kugelförmiges Interferon-Molekül misst 3 nm im Durchmesser, dann können auf einer Fläche von 500 x 500 nm maximal 37'263 Moleküle Platz finden. Die Berechnung setzt die Bildung einer vollständigen Monolage voraus und stützt sich auf eine hexagonale (111)-Anordnung.

Die in *Abbildung 5.1.C* total inkubierte Anzahl Moleküle umfasst nun aber nur 3654 Einzelproteine. Abgesehen davon, dass wahrscheinlich nur ein Teil der anwesenden Proteine auf der Glasoberfläche adsorbiert, lässt sich beim Betrachten der Abbildung kaum vorstellen, dass mindestens zehnmals mehr darauf plziert werden könnten. Erinnern wir uns aber an den Verbreiterungseffekt der abbildenden Spitze, so ist unschwer zu erkennen, dass die Oberfläche erst zu einem geringen Grad bedeckt ist (*Abbildung 5.7*).

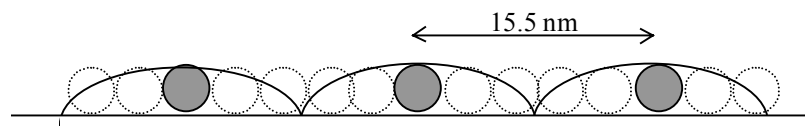


Abbildung 5.7: Verminderung der Auflösung durch zunehmende Bedeckung der Oberfläche mit Molekülen in Abhängigkeit vom Spitzenradius.

Wird nun in eine Fertigspritze mit einer Benetzungsfläche von 4.5 cm^2 0.5 ml einer Interferon α -2a-Lösung von $20 \mu\text{g/ml}$ abgefüllt, so interagieren rund 172'222 Moleküle mit einer Wand-

fläche von 500 x 500 nm. Weil sich aufgrund obiger Berechnungen theoretisch nur 37'263 Moleküle auf dieser Fläche absetzen können, vorausgesetzt Interferon adsorbiert höchstens als Monolage, können folglich aus der Lösung 22% an der Glaswand verloren gehen. Solch hohe Verluste von Wirkstoff sind für pharmazeutische Präparate unzulässig und stellen ein aktuelles Problem für alle niedrigdosierten Medikamente in Glasfläschchen dar. Streuungen bei der Wiederfindungsrate von Wirkstoff sind aufgrund der chemischen Inhomogenität der Glasbehältnisoberfläche zu erwarten.

5.2.2 Kraftspektroskopie auf FIOLAX und Type 1 plus

Die Reproduzierbarkeit der Messungen und die Kontrollexperimente haben bestätigt, dass die Adhäsion von Interferon α -2a auf FIOLAX Glas grösser ist als auf Type 1 plus, welches speziell für eine verminderte Proteinadsorption entwickelt wurde.

Weil die Proteine kovalent an die goldbeschichtete und mit DSU funktionalisierte Spitze gebunden sind, ist es möglich, mehr als 300 Messungen mit derselben Spitze durchzuführen.

Die Grösse der Andruckkräfte der Spitze auf die Oberfläche konnte im Experiment nicht auf eine Maximalkraft geregelt werden, sondern nur auf eine maximale Auslenkung der Feder. Da das Sensorsignal im Experiment Drift und Unstabilitäten ausgesetzt ist, das Gerät den Wert für die relative Auslenkung aber nicht entsprechend nachregeln kann, musste dies manuell überwacht werden. Für zukünftige Messungen soll deshalb ein zusätzlicher Feedback die Krafteinwirkung auf die Moleküle limitieren und gleichzeitig der repulsive Anteil auf <50 pN reduziert werden.

Auf weitere Unstabilitäten bei der Aufnahme der Messdaten weisen die generell relativ hohen Fehler bei der Auswertung hin. Aus diesem Grund wurden zwei Messserien der Messreihe pH 7 nicht in die Statistik aufgenommen, obwohl ihre Resultate die gleiche Aussage erlaubt hätten, wie die übrigen dieser Messserie. Bei der Messreihe pH 5 wurde die letzte von vier Serien ausser Betracht gelassen. Diese Messungen waren ebenfalls mit einer hohen Streuung behaftet und zeigten statt einer kleineren Adhäsionskraft auf Type 1 plus eine um 6% höhere Abrisskraft als auf FIOLAX.

Dass bei den Kraftexperimenten von pH 7 und pH 5 keine nominellen Unterschiede gemessen wurden, könnte auch durch diese hohen Streuungen und die ungenügende Sensitivität der Instrumentierung bedingt sein. Für eine statistische Aussage wäre deshalb der Vergleich einer viel grösseren Anzahl Cantilever erforderlich.

Die Grösse der Adhäsion ist durch die Verteilung der Abrisskräfte im Histogramm gegeben. Die Beobachtung, dass insbesondere die Abrisskurven auf FIOLAX (vgl. *Abbildung 5.5*) eine

breite Verteilung zeigen und die mittleren Kräfte über 600 pN liegen, lässt auf eine Beteiligung mehrerer Proteine schliessen. Eine Abschätzung der Zahl von Proteine, welche während eines Kraft-Distanz Zyklus mit der Oberfläche interagieren, kann anhand des Spitzenradius und der Grösse der Proteine erfolgen. Unter der Annahme, dass ein Proteinmolekül bis zu 50% unter der Spitze komprimiert werden kann [Shao,1996], ergibt sich eine 900 nm^2 grosse Kontaktfläche (der Spitzenradius unter der Goldbeschichtung beträgt ca. 25 nm, der Durchmesser von Interferon α -2a misst ca. 3 nm). Bei einer hexagonalen (111)-Bedeckung dieser Oberfläche sind somit 134 Interferonmoleküle bei der Adhäsion involviert.

Wird die effektiv gemessene Abrisskraft nun auf die Anzahl Moleküle verteilt, bleibt pro Protein noch eine durchschnittliche Bindungskraft von 12 pN, was durchaus im Bereich einer unspezifischen Bindung liegt.

Diese Berechnungen beruhen auf groben Abschätzungen. Viele Fragen nach der effektiven Geometrie der Spitze, der Gleichmässigkeit der Goldbedampfung, der Vollständigkeit der Kopplungsreaktion und der effektiven Grösse und Elastizität des Proteins bleiben in dieser Arbeit unbeantwortet und tragen zur Unsicherheit der Resultate bei.

Schliesslich stellt sich die Frage, warum in unseren Experimenten immer noch grosse Adhäsionskräfte auf Type 1 plus gemessen wurden, obwohl sich das Type 1 plus Glas durch eine vernachlässigbar geringe Proteinadsorption auszeichnet. Dies ist insofern erklärbar, dass einerseits die Proteine im Kraftexperiment viel stärker auf die Oberfläche gedrückt werden, als sie dies bei der Adsorption aus „eigener Kraft“ aus der Lösung erfahren würden. Andererseits weist die hochreine SiO_2 -Schicht von Type 1 plus eine Rauheit von einigen Nanometern auf und besitzt somit eine um ein Vielfaches grössere Oberfläche als FIOLAX Glas. Entsprechend nimmt die Kontaktfläche zwischen Spitze und Substrat und somit die Anzahl der Wechselwirkungen zwischen Protein und Glas auf rauheren Oberflächen zu.

Der genaue molekulare Ablauf einer Interferon α -2a-Adsorption auf Glas bleibt weiterhin ungeklärt. Die Ergebnisse der Adhäsionsstudie auf FIOLAX und Type 1 plus Glasoberflächen haben allerdings gezeigt, dass die Rauheit eines Substrates von geringer Bedeutung für die Adsorption als solche ist. Vielmehr wird die chemische Oberflächenbeschaffenheit für das Ausmass der Adsorption verantwortlich gemacht. Dabei wirkt sich eine Oberfläche mit verschiedenen chemischen Struktureinheiten wahrscheinlich günstiger auf die Adsorption aus, d.h. das Adsorptionsausmass liegt höher, als bei einer Oberfläche mit monofunktionellen Gruppen. Je weniger sich chemisch verschiedene Elemente auf einer Oberfläche präsentieren, desto kleiner ist scheinbar ihr Adsorptionspotential, denn die Proteinadsorption wird

bekanntlich stets durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen herbeigeführt [Brash, 1995; Norde, 1995]. Nebst Adsorption können bestimmte Ionen, wie Aluminium, Calcium oder Barium, Proteine auch denaturieren und ausfällen, so dass die Anwesenheit solcher Elemente grundsätzlich vermieden werden muss. Insofern trifft die Aussage bezüglich der Homogenität einer Oberfläche nur bedingt zu. Eine noch so reine Titandioxid-Beschichtung auf Glas bewirkt zum Beispiel eine dramatische Reduktion der Konzentration vieler Proteine in Lösung [Schrattenholz, 1998].

Somit ist jede Proteinadsorption ein individueller Vorgang, der nicht einfach mit den biophysikalischen Eigenschaften des Proteins in Zusammenhang gebracht werden kann. Anhand von Kraft-Distanz Kurven mit dem AFM wurden in dieser Arbeit, am Beispiel von Interferon α -2a, Nettoadhäsionskräfte des Proteins auf verschiedenen Oberflächen verglichen. Diese Methode kann zukünftig die Möglichkeit bieten, geeignete Packmittel für empfindliche Wirkstoffe zu finden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Um die Kompatibilität von Wirkstoffen mit pharmazeutischen Verpackungsmaterialien zu charakterisieren, sind Informationen über die Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten von grosser Bedeutung. In dieser Arbeit hat sich die Rasterkraftmikroskopie als wertvolle Methode zur Messung von topographischen Strukturen, sowie intermolekularen Wechselwirkungskräften zwischen proteinbedeckten Oberflächen und Glas erwiesen.

Im ersten Teil wurden die Innenoberflächen von Glasbehältnissen morphologisch untersucht und die beobachteten Strukturen in Zusammenhang mit der Verformung des Rohrglases zur Ampullenflasche resp. Fertigspritze gebracht. Es hat sich gezeigt, dass Ausdampfprozesse von leichtflüchtigen Alkali- und Borbestandteilen während der Fertigung von Ampullenflaschen für die typischen Linsenstrukturen auf der Innenoberfläche verantwortlich sind. Andere Merkmale, z.B. die Ringlistrukturen, treten bevorzugt auf Gläsern mit geringerem Alkali- und erhöhtem Boroxidanteil auf und deuten eher auf eine nachträgliche Korrosion der Oberflächen hin. Ergänzende chemische Oberflächenverfahren lieferten weitere Informationen über die Verteilung der chemischen Glasbestandteile auf der Oberfläche. Sowohl anhand der topographischen Merkmale, als auch der chemischen Beschaffenheit der Innenoberflächen, liessen sich die Gläser mit einem hohen thermischen Ausdehnungskoeffizienten (FIOLAX) von denen mit einem tieferen Koeffizienten (KG-33) unterscheiden.

Die Rasterkraftmikroskopie kann damit zur Herkunftsbestimmung und Identifizierung von pharmazeutisch gebräuchlichen Borsilikatgläsern herangezogen werden.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die Abbildung von adsorbierten Interferon α -2a Molekülen auf verschiedenen Substraten, sowie die Messung von Wechselwirkungskräften zwischen einer proteinmodifizierten Messspitze und Glas mit Hilfe der Rasterkrafttechnik. Die Adsorption von Interferon α -2a auf Glimmer und Glas aus Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten konnte die Bedeutung der elektrostatischen Wechselwirkungen auf das

Adsorptionsverhalten aufzeigen. Anhand einer rechnerischen Überlegung wurde ferner die Relevanz der Proteinadsorption an Glas für die pharmazeutische Industrie verdeutlicht.

Mit einer Interferon α -2a-funktionalisierten Messspitze wurden erstmals Adhäsionskräfte auf herkömmlichem FIOLAX Glas und speziell beschichtetem SCHOTT Type 1 plus Glas gemessen. Übereinstimmend mit der für Type 1 plus postulierten verringerten Proteinadsorption lagen die experimentell ermittelten Adhäsionskraftwerte jeweils tiefer als beim unbehandelten Glas. Für diesen Fall wurde also eine Korrelation zwischen der Adsorption und der Adhäsionskraft gefunden.

Daraus ergeben sich interessante Möglichkeiten, das Ausmass der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Behältnisinnenwand vorauszusehen resp. für jedes Protein das bestgeeignete Packmittel zu finden. Die Methode lässt sich prinzipiell auf alle denkbaren Wirkstoffe übertragen, wenn geeignete Immobilisierungsmethoden an die Messspitze anwendbar sind. Eine individuelle Abklärung ist nötig, und sie sollte wenn möglich auch im entsprechenden Lösungsmittel durchgeführt werden. Hilfsstoffe und Zusätze, wie Salze oder Tenside, können die Oberflächenladungen eines Moleküls drastisch verändern und die Interaktionsbereitschaft damit wesentlich beeinflussen.

Lösungswege, die Proteinadsorption in pharmazeutischen Formulierungen zu kontrollieren, setzen beispielsweise genau an diesem Punkt an. Duncan [1995] vermochte die Adsorption von Serumalbumin auf Glas sowohl durch Erhöhung der Ionenstärke, als auch durch Zusatz von verschiedenen Lösungsvermittlern, wie Tween 20 oder Natriumdodecylsulfat, zu erniedrigen. Ferner erreichte Van Oss [1998] mit dem Komplexbildner Natrium-EDTA eine Reduktion der Serumalbuminadsorption auf Silika um 50%.

Weitere Schlüsselstellen in der Problematik der Proteinadsorption an Glasoberflächen sind die kontrollierte Temperatureinstellung bei der Verformung von Glasrohren, sowie die Lagerung der fertigen Glasprodukte. Durch Aufbewahrung der Glasrohre und Glasbehältnisse in klimatisierten Räumen bei rund $(20\pm 1)^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von weniger als 20% kann die Bildung einer Wasserhaut auf der Glasoberfläche weitgehend verhindert werden [Scheerer, 1993]. Folglich findet die Dissoziation der leichtlöslichen Metalloxide in der Glasmatrix und damit die Auslaugung resp. Korrosion der Glasoberfläche praktisch nicht mehr statt.

Mit hochempfindlichen Rasterkraftmikroskopen wird es in Zukunft möglich sein, die Kraftbeiträge einer Wechselwirkung einzeln aufzutrennen und den Adsorptionsmechanismus unter definierten Bedingungen zu beschreiben.

Literaturverzeichnis

- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H, Drenckhahn D. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:4005-4010, 2000.
- Bennewitz R, Gyalog T, Guggisberg M, Bammerlin M, Meyer E, Güntherodt H-J. Atomic-scale stick-slip processes on Cu(111), *Phys. Rev. B*, **60**:R11301-R11304, 1999.
- Brash J L, Horbett T A. Proteins at interfaces – an overview, aus: Proteins at interfaces II Fundamentals and applications (Horbett T A, Brash J L), ch.1, American Chemical Society, Washington D.C., 1995
- Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy, *Helv. Phys. Acta*, **55**:726-735, 1982.
- Binnig G, Quate C.F, Gerber Ch. Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.*, **56**:930-933, 1986.
- Butt H-J. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope, *Biophys. J.*, **60**:1438-1444, 1991.
- Cleveland J P, Manne S, Bocek D, Hansma P K. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.*, **64**:403-405, 1993.
- Cullen D C, Lowe C R. AFM Studies of Protein Adsorption, *J. Colloid Interface Sci.*, **166**:102-108, 1994.
- Dammer U, Hegner M, Anselmetti D, Wagner P, Dreier M, Huber W, Güntherodt H-J. Specific Antigen/Antibody interactions measured by force microscopy, *Biophys. J.*, **70**:2437-2441, 1996.
- De Maeyer E, Schellekens H. aus: The biology of the interferon system, Elsevier Scientific Press, Amsterdam, 1983.

- Doremus R H. Glass science, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.
- Drake B, Prater C B, Weisenhorn A L, Gould S A C, Albrecht T R, Quate C F, Cannelli D S, Hansma H G, Hansma P K. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope, *Science*, **243**:1586-1589, 1989.
- Duncan M R, Lee J M, Warchol M P. Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene, *Int. J. Pharm.*, **120**:179-188, 1995.
- Fritz M, Radmacher M, Cleveland J P, Allersma M W, Stewart R J, Gieselmann R, Janmey P, Schmidt C R, Hansma P K. Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solutions with tapping mode atomic force microscopy, *Langmuir*, **11**:3529-3535, 1995.
- Gibson C T, Watson G S, Myhra S. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy, *Nanotechnology*, **7**:259-262, 1996.
- Giessibl F J. Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy, *Science*, **267**:68-71, 1995.
- Gnecco E, Bennewitz R, Gyalog T, Loppacher Ch, Bammerlin M, Meyer E, Güntherodt H-J. Velocity dependence of atomic friction, *Phys. Rev. Lett.*, **84**:1172-1175, 2000.
- Greenwood N N, Earnshaw A. Chemie der Elemente, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990.
- Gross G, Persönliche Mitteilung
- Hutter J L, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips, *Rev. Sci. Instrum.*, **64**:1868-1873, 1993
- Israelachvili J N. Intermolecular and surface forces, 2nd edition, Academic Press, London, 1991.
- Klaus W, Gsell B, Labhardt A M, Wipf B, Senn H. The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution, *J. Mol. Biol.*, **274**:661-675, 1997.
- Lantz M A, Hug H J, van Schendel P J A, Hoffmann R, Martin S, Baratoff A, Abdurixit A, Güntherodt H-J, Gerber Ch. Low temperature scanning force microscopy of the Si(111)-(7x7) surface, *Phys. Rev. Lett.*, **84**:2642-2645, 2000.
- Ludwig M, Dettmann W, Gaub H E. Atomic force microscope imaging contrast based on molecular recognition, *Biophys. J.*, **72**:445-448, 1997.

- Lüth H. Surfaces and interfaces of solid materials, 2nd edition, Springer, Berlin, 1993.
- Morant J, Ruppanner H. Arzneimittel-Kompendium der Schweiz 1998, Documed, Basel, 1997.
- Müller D J, Amrein M, Engel A. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy, *J. Struct. Biol.*, **119**:172-188, 1997.
- Müller D J, Baumeister W, Engel A. Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:13170-13174, 1999.
- Norde W, Favier J P. Structure of adsorbed and desorbed proteins, *Coll. Surf.*, **64**:87-93, 1992.
- Norde W, Haynes C A. Reversibility and the mechanism of protein adsorption, aus: Proteins at interfaces II Fundamentals and applications (Horbett T A, Brash J L), ch.2, American Chemical Society, Washington D.C., 1995
- Overney R M, Tsukruk V V. Scanning probe microscopy in polymers, aus: ACS Symposium Series 694 (Ratner B, Tsukruk V), ch.1, American Chemical Society, Washington D.C., 1998.
- Pestka S, Langer J A, Zoon K C, Samuel C E. Interferons and their actions, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**:727-777, 1987.
- Peters A. Chemische Veränderungen an der Oberfläche des Glases, aus: Glastechnische Fabrikationsfehler (Jebsen-Marwedel H, Brückner R), Kap.11, Springer-Verlag, Berlin, 1980.
- Pfaender H G. Schott-Glaslexikon, 5.Auflage, mvg-verlag, Landsberg am Lech, 1997.
- Pharmacopoea Helvetica 8, Eidgenössische Durcksachen- und Materialzentrale, Bern, 1997.
- Rädlein E, Ambos R, Frischat G H. Atomic force microscopy of coated glasses, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **353**:413-418, 1995.
- Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez J M, Gaub H E. Reversible Unfolding of individual Titin immunoglobulin domains by AFM, *Science*, **276**:1109-1112, 1997.
- Ros R, Schwesinger F, Anselmetti D, Kubon M, Schäfer R, Plückthun A, Tiefenauer L. Antigen binding forces of individually adressed single-chain Fv antibody molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:7402-7405, 1998.

- San Paulo A, García R. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes, *Biophys. J.*, **78**:1599-1605, 2000.
- Scheerer F, Grünwald H, Gunkel C, Baalman A. Blitzsaubere optische Gläser – ohne FCKW, *Dünne Schichten*, **1**:6-11, 1993.
- Schmitz I, Schreiner M, Friedbacher G, Grassbauer M. Tapping-mode AFM in comparison to contact-mode AFM as a tool for in situ investigations of surface reactions with reference to glass corrosion, *Anal. Chem.*, **69**:1012-1018, 1997.
- Scholze H. Bedeutung der ausgelaugten Schicht für die chemische Beständigkeit: Untersuchungen an einem Kalk-Natronsilicatglas, *Glastech. Ber.*, **58**:116-124, 1985.
- Schrattenholz A, Auchter-Krummel P, Walther M. Investigation of protein adsorption properties of vials with modified surfaces from the RPA-test kit (Schott), aus: SCHOTT Pharma-Symposium, 1998.
- Shao Z, Mou J, Czajkowsky D, Yang J, Yuan J-Y. Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed, *Advances in Physics*, **45**:1-86, 1996.
- Stricker H (Hrsg.). Physikalische Pharmazie – pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1987.
- Strunz T, Oroszlan K, Schäfer R, Güntherodt H-J. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:11277-11282, 1999.
- Stryer L. Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1991.
- Stuart J K, Hlady V. Effects of discrete protein-surface interactions in scanning force microscopy adhesion force measurements, *Langmuir*, **11**:1368-1374, 1995.
- Van Oss C J, Wu W, Giese R F. Macroscopic and microscopic interactions between albumin and hydrophilic surfaces, aus: Proteins at interfaces II Fundamentals and applications (Horbett T A, Brash J L), ch.6, American Chemical Society, Washington D.C., 1995.
- Vogel W. Glaschemie, 3. Auflage, Springer, Berlin, 1992.
- Wälivaara B, Warkentin P, Lundström I, Tengvall P. Aggregation of IgG on methylated silicon surfaces studied by tapping mode atomic force microscopy, *J. Colloid Interface Sci.*, **174**:53-60, 1995.

- Wagner C D, Riggs W M, Davis L E, Moulder J F, Muilenberg G E (Hrsg.). Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy, Perkin Elmer Corporation , Physical Electronics Division, Eden Prairie, USA, 1979.
- Wagner P, Hegner M, Kern P, Zaugg F, Semenza G. Covalent immobilization of native biomolecules onto Au(111) via N-hydroxysuccinimide ester functionalized self-assembled monolayers for scanning probe microscopy, *Biophys. J.*, **70**:2052-2066, 1996.
- Walther M, Spallek M, Auchter-Krummel P. Behälter mit einer Oberfläche wie Quarz für das Verpacken empfindlicher Medikamente, aus: SCHOTT Pharma-Symposium, 1998.
- Weisenhorn A L, Hansma P K, Albrecht T R, Quate C F. Forces in atomic force microscopy in air and water, *Appl. Phys. Lett.*, **54**:2651-2653, 1989.

Abkürzungen und Glossar

AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
Cantilever	Blattfeder
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
DSU	Dithiobis(succinimidylundecanoat)
DURAN	Glasqualität mit thermischen Ausdehnungskoeffizient von $33 \times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$
EMS	Elektronenstrahlmikrosonde
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
FIOLAX	Glasqualität mit thermischen Ausdehnungskoeffizient von $49 \times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$
KG-33	Glasqualität mit thermischen Ausdehnungskoeffizient von $32 \times 10^{-7}/^{\circ}\text{C}$
mRNA	messenger-RNA
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pK	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante (Mass für die Säurestärke)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale RNA
SAM	self-assembled monolayer (selbst-organisierende Monolage)
SFM	Scanning Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
SPM	Scanning Probe Microscopy (Rastersondenmikroskopie)

STM	Scanning Tunneling Microscopy (Rastertunnelmikroskopie)
Type 1 plus	quarzähnliche Beschichtung von SCHOTT
Vial	Ampullenflasche
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy (Röntgen-Photoelektronenspektroskopie)

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle recht herzlich danken. Ich möchte insbesondere Herrn Prof. Güntherodt von der Universität Basel und Herrn Dr. Schwob von der Firma F.Hoffmann-La Roche AG in Basel danken, dass sie mir diese Dissertation ermöglicht haben. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen der Universität und der Industrie bot mir sowohl einen interessanten Einblick in die aktuelle Grundlagenforschung, als auch ins Tagesgeschehen eines grossen pharmazeutischen Betriebes. Herrn Prof. Meyer von der Uni Basel danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Meinen ganz besonderen Dank gilt Peter Reimann, Verena Thommen, Heinz Breitenstein und Silvester Jakob, die mich auf grossartige Weise in ihr Technologie-Team am Institut für Physik aufgenommen haben. Herrn Reimann danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz, mich in die Rasterkraftmikroskopie einzuführen, zu unterstützen und dafür zu sorgen, dass ich mich ganz meiner Arbeit widmen konnte. Dank seiner freizügigen Hilfsbereitschaft konnte ich manche Ideen verwirklichen und habe in wertvollen Diskussionen viel von ihm gelernt. Frau Thommen danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit, die gute Einarbeitung am Gerät und natürlich auch für die Vorabklärungen, die sie geleistet hat. Ohne die schönen Resultate ihrer ersten Untersuchungen an Glas wäre diese Dissertation vielleicht gar nicht ins Leben gerufen worden. Ich danke Herrn Breitenstein und Herrn Jakob, dass sie mir stets bei handwerklichen und technischen Problemen zur Seite standen. Ihnen ist der Probenstisch zur einfachen Handhabung des AFM, die Geräteaufhängung zur effizienten Dämpfung, die Fertigung der Flüssigkeitszellen und vieles mehr zu verdanken.

Dr. Martin Hegner und Dr. Rolf Schäfer möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit danken. Sie haben beide stets grosses Interesse gezeigt und liessen wichtige chemische und biochemische Aspekte einfliessen, die mich in der Aufgabe weiterbrachten.

Besonders im biophysikalischen Teil meiner Arbeit konnte ich von der Erfahrung Herrn Hegners profitieren und habe seine Diskussionen und Anregungen sehr geschätzt.

Für die fachliche Betreuung bei Roche war Dr. Marco Mumenthaler zuständig. Durch ihn habe ich sowohl den pharmazeutischen Betrieb, als auch zahlreiche Kontaktpersonen kennengelernt, welche Antworten auf meine Fragen wussten. Ich danke ihm vor allem für die interessanten Gespräche, für die Bereitstellung der internen Unterlagen und der vielen Glasmuster vom Produktionsbetrieb.

Für die erfolgreichen Messungen am Röntgen-Photoelektronenspektrometer möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Roland Hauert und Dr. Gilbert Franz von der EMPA in Dübendorf bedanken. Die Resultate waren als Ergänzung zum AFM von grosser Bedeutung und sehr aufschlussreich.

Daniel Mathys vom REM-Labor und Jean-Pierre Ramseyer vom Institut für Physik verdanke ich die Rasterelektronenmikroskopaufnahmen. Ich danke Frau Dr. Susanne Schmidt vom Mineralogischen Institut für ihren grossartigen Einsatz bei der Durchführung von Messungen an der Mikrosonde und für das Vertrauen, das sie mir entgegengebracht hat.

Bedanken möchte ich mich ausserdem bei Krisztina Oroszlan und Dr. Torsten Strunz, sowie bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Physik Institutes, die mir stets freundschaftlich und hilfreich beistanden. Frau Vetter, Frau Kalt und Frau Kammermann danke ich für die geleisteten administrativen Dienste.

Mit besonderem Ausdruck möchte ich aber auch meinen Eltern danken, die den Weg für meine Ausbildung geschaffen haben und mich dabei grossartig unterstützt und begleitet haben. Speziell möchte ich mich auch bei meinem Freund Felix bedanken, der mir während der ganzen Zeit motivierend und tolerant zur Seite stand und bei meinem Grossvater, dem ich zweifellos meine naturwissenschaftliche Ader zu verdanken habe, und der mich stets in faszinierender Art und Weise für die Forschung zu begeistern weiss.

Curriculum vitae

Monica Sandra Schwarzenbach

11. November 1972	geboren in Basel, als Tochter von Jörg H. und Elisabeth Schwarzenbach-Martin
1979 – 1984	Primarschule Füllinsdorf
1984 – 1988	Progymnasium Frenkendorf
1988 – 1991	Gymnasium Liestal
	19. Dezember 1991: Matura Typus D (Neusprachen)
Januar – September 1992	Sprachaufenthalt in New York, USA
1992 – 1997	Pharmaziestudium (Phil.II), Universität Basel
	14. November 1997: eidgenössisches Pharmaziediplom
Januar – Juni 1998	Praktikum bei Novartis Consumer Health SA, Nyon
seit 4. Januar 1999	Dissertation bei F. Hoffmann-La Roche, Basel und Institut für Physik der Universität Basel unter der Leitung von Prof. H.-J. Güntherodt

Folgenden Dozentinnen und Dozenten verdanke ich meine Ausbildung:

D. Anselmetti, J.-P. Barras, H.C. Bartels, K.A. Bienz, R. Bruppacher, H. Durrer, V. Eckert, P. Erb, H.-J. Güntherodt, T.W. Günthert, D. Haag, A. Hädener, W. Haefeli, A. Haegeli,, K. Hersberger, K.G. Hofbauer, W. Hunziker, N. Iberg, G. Imanidis, A. Kress, H. Leuenberger, L. Maître, G.A. Marbet, E. Meyer, J. Meyer, U.A. Meyer, C. Moroni, J. Nicholls, P. Oelhafen, J.M. Pfeilschifter, W. Schaffner, A. Scholer, H. Seiler, U. Séquin, H. Sigel, U.M. Spornitz, K.M. Stöckel, C. Tamm, J. Van de Waterbeemd, P. Weiss, H. v. Hahn, A.D. Zuberbühler.