

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

ProPec

Maßgeschneiderte Pektine aus Zuckerrüben für pharmazeutische Anwendungen

Teilvorhaben 2: Analytik

| | |
|-------------------------|---|
| Zuwendungsgeber: | Projekträger Jülich (PTJ) Forschungszentrum Jülich GmbH Postfach 610247 10923 Berlin |
| Zuwendungsempfänger: | HV-Polysaccharides GmbH & Co. KG Am Amselberg 1 07751 Bucha |
| Laufzeit des Vorhabens: | 01.04.2023 – 31.03.2024 |
| Förderkennzeichen: | 03WIR5312B |

Inhalt

| | |
|---|----------|
| Sachbericht zum Verwendungsnachweis | 1 |
| I Kurzbericht | 3 |
| Ursprüngliche Aufgabenstellung | 3 |
| Wissenschaftlich-technischer Stand..... | 3 |
| Ablauf des Vorhabens..... | 4 |
| Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen..... | 4 |
| II Eingehende Darstellung | 5 |
| Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse | 5 |
| Zahlenmäßiger Nachweis | 6 |
| Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit | 6 |
| Verwertbarkeit der Ergebnisse | 7 |
| Auf dem Gebiet des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte Dritter | 7 |
| Veröffentlichungen..... | 7 |

I Kurzbericht

Ursprüngliche Aufgabenstellung

Ziel des WIR! Bündnis „BioZ– Biobasierte Innovationen aus Zeitz und Mitteldeutschland“ ist es neue Produkte, neue Verfahren und neue Wertschöpfung für die Region zu entwickeln. Aufgabe des Projekts „ProPec“ war es im Rahmen einer Machbarkeitsstudie, ein Pektin mit einem bestimmten Eigenschaftsspektrum aus Zuckerrübenschnitzeln herzustellen. Das Pektin sollte als Ausgangsmaterial für die pharmazeutische Industrie geeignet sein. Von dem Projektpartner Fraunhofer CBP wurde im Teilprojekt 1 u. a. das Extraktionsverfahren im Technikumsmaßstab realisiert um Pektin zu gewinnen.

Im Teilprojekt 2 sollten die physikochemischen Eigenschaften der in Teilprojekt 1 gewonnenen Pektine analysiert und bewertet werden.

Der Fokus liegt dabei auf:

- dem Molekulargewicht
- dem Gehalt an Homogalakaturonan bzw. Rhamnose, Arabinose und Galaktose
- dem Veresterungsgrad

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde bei der HVP eine analytische Methode auf Basis der Größenausschlusschromatographie entwickelt und etabliert. Zur Analyse der Zuckerzusammensetzung und der Veresterungsgrad wird ebenfalls eine chromatographische Methode und die erforderliche Probenbehandlung entwickelt und standardisiert.

Wissenschaftlich-technischer Stand

Im Allgemeinen ist die Anwendung von Pektin im pharmazeutischen Bereich weitverbreitet. Aufgrund der Unverdaulichkeit von hochmolekularem Pektin wird dieses häufig als Trägermaterial von Wirkstoffen in Tabletten eingesetzt, z.B. auch für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung im Magen-Darm-Trakt.¹ Werden die langkettigen Pektinmoleküle in unverzweigte und kurze Ketten mit einem Molekulargewicht von <20 kDa umgewandelt, kann das Pektin an das mit Metastasen assoziierte Protein Galectin-3 (Gal-3) binden und somit die Bildung von Karzinommetastasen hemmen. Dieser Effekt wird bereits seit langem in der Literatur beschrieben.² Die Anwendung von entsprechend modifiziertem Pektin zur Reduzierung von Metastasen bei Tieren ist in den USA patentiert.³ Als weitere pharmazeutische Anwendung wird niedrigverestertes Pektin auch in blutstillenden Pads eingesetzt.⁴ Die konkrete Anwendung des im Vorhaben erzeugten Pektins soll in einem Nachfolgeprojekt entsprechend der erreichbaren Pektineigenschaften untersucht werden.

¹ a) O. D. Akin-Ajani, A. Okunlola (2021), *Pectins - The New-Old Polysaccharides. Pharmaceutical Applications of Pectin*, 2021, IntechOpen, London, doi.org/10.5772/intechopen.100152.

b) Cargill, Unipectine™ SS ND Pectin, <https://www.cargill.com/pharmaceutical/hydrocolloids-for-pharma/pectin-in-pharma>

² a) Platt D, Raz A. (1992) *Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin*. J Natl Cancer Inst, 84, 438–42.

b) Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, Yamazaki K, Replogle TS, Lehr J, et al. (1995) *Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin*. J Natl Cancer Inst, 87, 348–53.

³ US 7491708 B1 (2009) *MODIFIED PECTIN*.

⁴ EP 3 074 055 B1 (2014) *DRY PAD COMPRISING THROMBIN AND PECTIN*.

Ablauf des Vorhabens

Tabelle 1 Zeitplanung der Arbeiten und des Meilensteins [1]

| | Monat | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------|---|---|---|---|-----|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | | | | | | MS1 | | | | | | |
| AP1.1 Extraktion - Labor | | | | | | | | | | | | |
| AP1.2 Extraktion - Pilot | | | | | | | | | | | | |
| AP2 Analytik | | | | | | | | | | | | |
| AP3 Reststoffverwertung | | | | | | | | | | | | |
| AP4 Bewertung | | | | | | | | | | | | |

Die Arbeiten des Gesamtvorhabens waren in vier Arbeitspakete aufgeteilt, wobei die HVP das Arbeitspaketen 2 hauptverantwortliche bearbeitete, die Parameterauswahl in den Arbeitspaketen 1 und 2 unterstützte sowie die Bewertung der Machbarkeitsstudie gemeinsam mit den Partnern vornahm.

Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen

Ausgehend von Vorinformationen aus der Literatur wurde eine Methode zur Größenausschlusschromatographie entwickelt und aufgebaut um die Molmassenverteilung als einen der wichtigsten Parameter der im Verbundvorhaben gewonnenen Pektine hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Pharmarohstoff zu untersuchen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Molmassenverteilung durch die Extraktionsbedingungen steuerbar ist und das kommerziell relevante Molmassenbereiche grundsätzlich erreichbar sind. Der im Projekt angestrebte Nachweis der Machbarkeit hinsichtlich des Parameters Molmassenverteilung wurde damit erbracht.

Darüber hinaus wurde eine Methode zur Bestimmung des Veresterungsgrads sowie der Zuckerzusammensetzung entwickelt und aufgebaut. Dabei wurde eine Vorgehensweise erarbeitet, die eine zuverlässige Bestimmung des Gehalts an gebundener Essigsäure als Leitsubstanz für den Veresterungsgrad ermöglicht. Bei den Versuchen zur Bestimmung der Zuckerzusammensetzung zeigte sich, dass Differenzierung aller konstituierender Zucker mit der vorhandenen Ausstattung wider Erwarten nicht möglich ist. So war es trotz umfangreicher Versuche insbesondere nicht möglich zwischen Rhamnose und Arabinose zu unterscheiden. Die Methode zur Ermittlung der Zuckerzusammensetzung konnte daher im Rahmen dieses Projektes nur soweit entwickelt werden, dass qualitative oder bestenfalls halbquantitative Aussagen möglich sind. Dennoch kann die prinzipielle Machbarkeit einer gerichteten Pektin-Extraktion auf Basis der gewonnenen Ergebnisse trotzdem positiv bewertet werden.

Die vom Fraunhofer CBP gewonnen Pektine wurden kontinuierlich mit Hilfe der entwickelten Methoden untersucht und die Ergebnisse flossen kontinuierlich in die Planung der Versuche der Arbeitspakete 1 und 2 ein. Gemeinsam mit den Partnern wurde das gesamte Verwertungskonzept der entzuckerten Rübenschnitzel zu Pektin, Energie und Dünger betrachtet. Auf Basis der Machbarkeitsstudie wird die Umsetzbarkeit und Wirtschaftlichkeit positiv beurteilt.

II Eingehende Darstellung

Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

AP 2.1 Bestimmung des Molekulargewichts von Zuckerrübenpektin

Um die Molmassenverteilung als einen der wichtigsten Parameter der im Verbundvorhaben gewonnenen Pektine hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Pharmarohstoff untersuchen zu können, wurde eine Methoden zur Größenausschlusschromatographie entwickelt und aufgebaut. Ausgehend von Vorinformationen aus der Literatur wurden DMSO, wässrige Salzlösungen und verschiedene DMSO-Wasser-Mischungen untersucht. Dabei stellten sich rein wässrige Systeme bei entsprechender Probenvorbereitung aufgrund ihrer einfachen Herstellung, Handhabbarkeit sowie der besten Gesamtstabilität des chromatographischen Systems (z. B. Basislinienstabilität) für die untersuchten Proben als am besten geeignet heraus.

Die Methoden wurde entsprechend den Richtlinien des International Council for Harmonisation (anerkannt durch die Arzneimittelbehörden der EU, Japans und der USA) validiert und es konnte eine relative Standardabweichung von kleiner 1 % für alle relevanten Validierungsparameter erreicht werden. Diese Methode bildet somit das Fundament für alle Untersuchungen hinsichtlich der Extraktionsbedingungen und der damit erreichten Molmassenverteilungen sowie den darauf aufbauenden Bewertungen. So konnten die vom Fraunhofer CBP durchgeführten Versuche ausgewertet werden und es ergab sich, dass das Molekulargewicht von der Extraktionstemperatur, vom pH-Wert, dem Fest-Flüssig-Verhältnis sowie der Extraktionszeit abhängig ist (Abbildung 1)

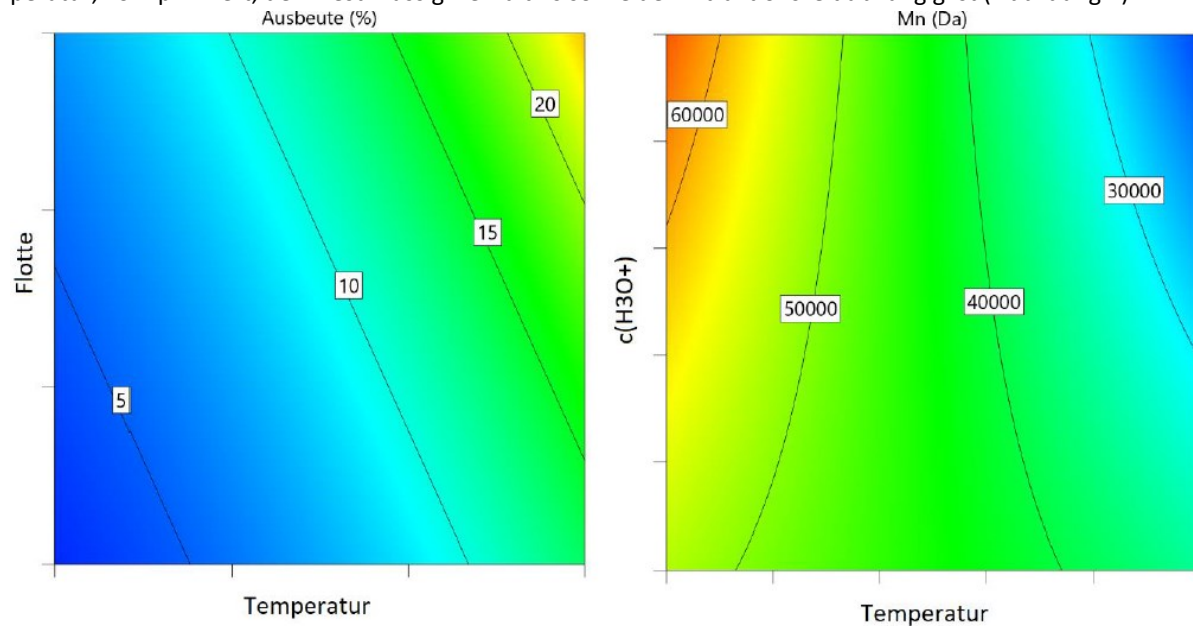


Abbildung 1: Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Molekulargewicht und Extraktionstemperatur und Fest-Flüssig-Verhältnis (links) sowie Extraktionstemperatur und pH (rechts).

Es wurden sämtliche durch den Verbundpartner zur Verfügung gestellten Pektine analysiert und relativ mit konventionellen Pektinen verglichen. Es zeigte sich, dass die Molmassenverteilung durch die Extraktionsbedingungen steuerbar ist und das kommerziell relevante Molmassenbereiche grundsätzlich erreichbar sind. Der im Projekt angestrebte Nachweis der Machbarkeit ist damit hinsichtlich des Parameters Molmassenverteilung erbracht. Die Bestimmung absoluter Molekulargewichte zur Etablierung einer klareren Struktur-Eigenschafts-Beziehung war nicht Gegenstand dieses Projektes.

AP 2.2 Analyse der Zuckerzusammensetzung und Bestimmung des Veresterungsgrads

Neben der Molmassenverteilung stellen die Zuckerzusammensetzung und insbesondere der Veresterungsgrad (Acetylierung) weitere wichtige analytische Parameter zur Bewertung von Pektinen hinsichtlich ihrer Eignung als Pharmarohstoff dar. Daher sollten in diesem Arbeitspaket Methoden für diese Parameter erarbeitet werden. Ausgehend von Literaturinformationen war zu erwarten, dass der Veresterungsgrad durch die Extraktionsbedingungen steuerbar ist während die Zuckerzusammensetzung eher durch das botanische Rohmaterial bestimmt wird.

Der Fokus der Methodenentwicklung lag daher zunächst auf dem Veresterungsgrad und dabei vorrangig auf dem Gehalt an gebundener Essigsäure als Leitsubstanz. Die wesentlichen methodischen Schwierigkeiten liegen dabei in der analytischen Differenzierung zwischen kovalent an das Pektin Rückgrat gebundener und anderweitig in den Proben vorhandener Essigsäure. Es wurde daher eine mehrstufige Methode für die entsprechende Analyse entworfen.

1. Abtrennung und Quantifizierung (mittels HPLC) der ungebundenen Essigsäure
2. Aufschluss des Pektins
3. Abtrennung und Quantifizierung (mittels HPLC) der gebundenen Essigsäure

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden für die unterschiedlichen Stufen verschiedene Bedingungen erprobt und es konnte eine Vorgehensweise gefunden werden die eine zuverlässige Bestimmung ermöglicht. Dabei wurde auch erreicht, dass der Aufschluss des Pektins ebenfalls bei der Bestimmung der Zuckerzusammensetzung genutzt werden kann. Die HPLC Methode zur Bestimmung der gebundenen Essigsäure wurde ebenfalls hinsichtlich ihrer apparativen Eignung validiert und es konnten ebenfalls relative Standardabweichung von kleiner 1 % erreicht werden. Eine vollständige Validierung der Gesamtmethode einschließlich des Aufschlusses war in Ermangelung geeigneter Referenzsubstanzen im Rahmen dieses Projektes jedoch nicht möglich. Die Bewertung der absoluten Richtigkeit der Gesamtmethode wäre daher Gegenstand weiterführender Forschung.

Für die Ermittlung der Zuckerzusammensetzung müssen die polymer gebundenen Zucker zunächst als Monomere freigesetzt werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde erreicht, dass die Aufschlussbedingungen passend zum Aufschluss für die Bestimmung des Acetylierungsgrades gewählt werden können. Es zeigte sich jedoch, dass die HPLC analytische Differenzierung aller konstituierender Zucker mit der vorhandenen Ausstattung wider Erwarten nicht möglich ist. So war es trotz umfangreicher Versuche insbesondere nicht möglich zwischen Rhamnose und Arabinose zu unterscheiden. Die Methode zur Ermittlung der Zuckerzusammensetzung konnte daher im Rahmen dieses Projektes nur soweit entwickelt werden, dass qualitative oder bestenfalls halb-quantitative Aussagen möglich sind. Obwohl eine Weiterentwicklung der Methode zur Bestimmung der Zuckerzusammensetzung weiterer Forschung bedarf, kann die prinzipielle Machbarkeit der gerichteten Pektin-Extraktion auf Basis der gewonnenen Ergebnisse trotzdem positiv bewertet werden.

Zahlenmäßiger Nachweis

Die Fördermittel sind planmäßig für die labortechnischen Analysen, die wissenschaftliche Aus- und Bewertung eingesetzt worden.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Aufwendungen betrafen hauptsächlich die Personalkosten. Einen großen Anteil daran hatte die Methodenentwicklung sowie die Durchführung und Auswertung der Analysen.

Verwertbarkeit der Ergebnisse

Es konnte prinzipiell nachgewiesen werden, dass Pektin mit dem gefragten Eigenschaftsspektrum aus Zuckerrübenschnitzeln gewonnen werden kann und deren Analyse grundsätzlich in Übereinstimmung mit den Richtlinien der pharmazeutischen Industrie erfolgen kann. Nach Projektende sind noch einige Fragen offen, z.B. bezüglich der Aktivität des Pektins an Gal-3 zu binden, der absoluten Richtigkeit der erhaltenen Analysenergebnisse sowie einer Detailanalyse hinsichtlich der einiger Parameter.

Die Ergebnisse der Machbarkeitsstudie sind direkt in für die Planung weiterer Forschungsprojekte verwertbar und verbessern die Expertise der HVP im Bereich Extraktion und Analyse von pharmazeutisch relevanten Wertstoffen aus biobasierten Rohmaterialien.

Auf dem Gebiet des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte Dritter

Nach eigener Recherche gibt es keine relevanten Veröffentlichungen oder Patentanmeldungen, welche das Pektinextraktionsverfahren oder der Anwendung der gewonnenen Pektine entgegenstehen.

Veröffentlichungen

Von Seiten der HVP sind keine Veröffentlichungen geplant.