

Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von kurzkettigen Chitosanen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Sven Krohn

Kiel 2003

Referent:

Prof. Dr. Dr. h. c. B. W. Müller

Korreferent:

Prof. Dr. D. Heber

Mündliche Prüfungen:

03., 07. und 10.07.2003

Zum Druck genehmigt:

03.07.2003

Prof. Dr. W. Depmeier

(Dekan)

Ist ein Geheimnis erst gelöst, ist es nur noch Tatsache. Wird Magie erklärt, entpuppt sie sich als Wissenschaft.

Harold R. Foster

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	2
2	Chitosan als Hilfsstoff in der Pharmazie	4
2.1	Langkettige Chitosane	4
2.2	Kurzkettige Chitosane	7
2.3	Charakterisierung von Chitosan	15
2.3.1	Bestimmung des Molekulargewichtes	15
2.3.2	Bestimmung des Deacetylierungsgrades	21
2.3.2.1	UV-Spektroskopie	21
2.3.2.2	IR-Spektroskopie	22
2.3.2.3	Kernresonanzspektroskopie	23
2.3.2.4	Titrationverfahren	25
2.3.2.5	Partikelladungsdetektor	28
2.4	Chitosan-Mikro- und Nanopartikel	31
2.4.1	Herstellungstechniken	31
2.4.2	DNA-Vakzinierung	33
3	Experimenteller Teil	40
3.1	Herstellung von kurzkettigen Chitosanen	40
3.1.1	Einleitung	40
3.1.2	Methode 1	41
3.1.3	Ergebnis der Methode 1	42
3.1.4	Methode 2	44
3.1.5	Statistischer Versuchsplan	45
3.1.6	Ergebnisse des Versuchsplanes nach Methode 2	47

3.1.6.1	Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf das Molekulargewicht der ersten Fraktion	50
3.1.6.2	Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf die Ausbeute der ersten Fraktion	55
3.1.6.3	Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf das Molekulargewicht der Säure löslichen Fraktion	56
3.1.6.4	Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf die Ausbeute der zweiten Fraktion	56
3.1.7	Prognosen	59
3.1.8	Zusammenfassung	60
3.2	Charakterisierung von kurzkettigen Chitosanen mittels MALDI-TOF	62
3.2.1	Einleitung	62
3.2.2	Methode	63
3.2.3	Ergebnisse	63
3.2.4	Zusammenfassung	70
3.3	Bestimmung des Deacetylierungsgrades von Chitosan	72
3.3.1	Einführung	72
3.3.2	Bestimmung des Deacetylierungsgrades mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$	74
3.3.2.1	Probenbereitung $^1\text{H-NMR}$	74
3.3.2.2	Spektrenauswertung $^1\text{H-NMR}$	75
3.3.2.3	Probenbereitung und -vermessung $^{13}\text{C CP/MAS NMR}$	82
3.3.2.4	Spektrenauswertung $^{13}\text{C-NMR}$	85
3.3.3	Bestimmung des Deacetylierungsgrades mit Hilfe des Partikelladungsdetektors	87
3.3.4	Ergebnisse	89
3.3.5	Vergleich der ermittelten Deacetylierungsgrade mit den Herstellerangaben	95

3.3.6	Zusammenfassung	96
3.4	Mikro- und Nanopartikel als Träger von Vakzinen	98
3.4.1	Einleitung	98
3.4.2	Herstellung von Mikropartikeln durch Fällung mit Natriumsulfat	99
3.4.3	Abhängigkeit der Partikelgröße von der Titrationsmenge	103
3.4.4	Charakterisierung der Mikropartikel in Abhängigkeit vom eingesetzten Molekulargewicht	104
3.4.4.1	Partikelgröße und -gestalt	104
3.4.4.2	Bestimmung der Kristallinität	107
3.4.4.3	Zetapotential	109
3.4.5	Herstellung von Nanopartikeln durch Fällung mit Tripolyphosphat	112
3.4.6	Charakterisierung der Nanopartikel in Abhängigkeit vom eingesetzten Molekulargewicht	113
3.4.6.1	Partikelgröße	113
3.4.6.2	Zetapotential	114
3.4.7	Durchführung der In-vitro-Untersuchungen zur Aufnahme von pDNA	115
3.4.8	Auswertung der inkubierten Zellen	116
3.4.9	Einfluss der Partikelart und des Chitosan-Molekulargewichtes auf den Transfektionserfolg	117
3.4.10	Einfluss der Partikelbeladung auf die Fluoreszenz und Granularität	120
3.4.11	Einfluss der Ultraschallbehandlung auf Fluoreszenz und Granularität	122
3.4.12	Zusammenfassung	124
4	Zusammenfassung der Arbeit	125
5	Abstract (English Version)	129
6	Anhang	132
6.1	Allgemeine Materialien und Geräte	132

6.1.1	Verwendete Chemikalien	132
6.1.2	Verwendete Chitosanqualitäten	133
6.1.3	Geräte	134
6.2	Spezielle Methoden und Geräte	136
6.2.1	Säurehydrolyse	136
6.2.2	Molekulargewichtsbestimmungen	137
6.2.2.1	Gelfiltrationschromatographie (GFC/MALLS)	137
6.2.2.2	Flugzeitspektrometrie, MALDI-TOF MS	138
6.2.3	Bestimmung des Deacetylierungsgrades	139
6.2.3.1	¹ H-NMR	139
6.2.3.2	Festkörper- ¹³ C CP/MAS NMR	140
6.2.3.3	Polyelektrolyttitration	140
6.2.4	Herstellung der Mikro- und Nanopartikel	141
6.2.4.1	Gefriertrocknung der unbeladenen Mikropartikel	142
6.2.5	In-vitro-Testmethode	143
6.2.5.1	Beladung der Partikel	144
6.2.5.2	Beladung und Bebrütung der Zellen	144
6.2.5.3	Aufarbeitung	144
6.2.5.4	Durchflusszytometrie	145
7	Literaturverzeichnis	146
8	Danksagung	165

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen

a	Mark-Houwink-Exponent
A_2	zweiter Virialkoeffizient
a.i.	absolute Intensität
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ASTM	American Society for Testing and Materials
b	Achsenabschnitt
c	Konzentration
CD	Cytotoxische T-Zelle
CMV	Cytomegalivirus
CP	Kreuzpolarisation (Cross Polarization)
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
CT	Kontaktzeit (Contact Time)
Da	Dalton
DD	Deacetylierungsgrad (Degree of deacetylation)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
dn/dc	Brechungsindexinkrement
DP	Polymerisationsgrad (Degree of polymerisation)
DSC	Differential Scanning Calorimetry
d	Partikeldurchmesser
F_A	Molenfraktion der N-acetylierten Einheiten
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FL1-H	Fluoreszenzstreulicht, Detektor1
FSC	(Vorwärtsstreuung) Forward scatter
GFC	Gelfiltrationschromatographie
K	Mark-Houwink-Konstante
k. A.	keine Angabe
LD	Letale Dosis
m	Masse
M_A	Molekulargewicht eines acetylierten Chitosanmonomers

MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectroscopy
MALLS	Multi Angle Laserlight Scattering
MAS	Magic Angel Spinning
M_D	Molekulargewicht eines deacetylierten Chitosanmonomers
MHC	Major Histocompatibility Complex
M_n	zahlenmittleres Molekulargewicht
M_w	massenmittleres Molekulargewicht
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse pro Ladung
n_A	Anzahl der acetylierten Chitosanmonomere
n_D	Anzahl der deacetylierten Chitosanmonomere
n_P	Anzahl der PES-Monomere
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
$P(\theta)$	Streuungsfunktion, particle scattering factor
PCD	Partikelladungsdetektor (Particle Charge Detector)
PCS	Photonenkorrelationspektrometer
PD	Polydispersitätsgrad M_w/M_n
PES	Polyethylensulfonsaures Natrium
Polydadmac	Polydimethylallylammoniumchlorid
pDNA	Plasmid-DNA
R^2	Bestimmtheitsmaß
R_θ	reduzierte Streuintensität, Rayleigh-Verhältnis
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
SC	Somatische Zelle
SSC	Rechtwinkelstreulicht (Side scatter)
t	Zeit
T	Temperatur
T_{1H}	Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit
T_{1pH}	Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden Device
T_{CH}	Kreuzpolarisationszeit

THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
TMSPS-Na	Trimethylsilylpropansulfonsäure-Natrium
TPP	Tripolyphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
δ	chemische Verschiebung
$[\eta]$	Grenzviskosität
λ	Wellenlänge
θ	Detektionswinkel

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die Geschichte des Chitosans geht bis in das Jahr 1859 zurück, als Rouget beim Kochen von Chitin in Kaliumhydroxid ein neues, säurelösliches Produkt beobachtete, die deacetylierte Form des Chitins, welches 1811 von Braconnot zum ersten mal als Bestandteil von Pilzen beschrieben wurde. Der Name „Chitosan“ wurde allerdings erst 35 Jahre später von Hoppe-Seyler in einem Bericht der Deutschen Chemischen Gesellschaft geprägt [Paul und Sharma 2000]. In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse an dem vor allem aus Krabbenschalen gewonnen, biokompatiblen Produkt stark gestiegen. Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über die Einsatzgebiete des bioabbaubaren Materials in den vielfältigsten Formen [Hirano 1996, Illum 1998, Singla und Chawla 2001]. Hierbei ist vor allem das Wissen über das Molekulargewicht und den Deacetylierungsgrad von entscheidender Bedeutung, da die physikalischen und biologischen Eigenschaften von Chitosan hierdurch maßgeblich beeinflusst werden. Gerade in den letzten zehn Jahren sind durch verbesserte Analyseverfahren diese Größen immer besser bestimmbar geworden. Trotzdem gibt es immer noch keine einheitliche Analytik für Chitosane, sodass, je nach verwendetem Verfahren, Werte erheblich voneinander abweichen können.

Handelsübliche Chitosane besitzen meist ein Molekulargewicht zwischen 2 Millionen und 50.000 Dalton [Illum 1998] und einen Deacetylierungsgrad zwischen 70 und 95 % [Ph Eur 2002]. Das Interesse an kurzkettigeren Chitosanen stieg in letzter Zeit vor allem in Hinblick auf die Kontrolle der Freisetzungsgeschwindigkeit von festen Arzneiformen [Genta et al. 1998], die verbesserte Löslichkeit von schwer löslichen Arzneistoffen [Shiraishi et al. 1990], das bessere Abbauverhalten im lebenden Organismus [Seo et al. 2000], das geringere Akkumulationsverhalten in Organen wie der Leber [Richardson et al. 1999] oder den posi-

tiven Effekt bei der Tumorbehandlung [Suzuki et al. 1986]. So ist beim Einsatz von Chitosan in pharmazeutischen Systemen das Molekulargewicht bei allen Effekten zu berücksichtigen und eine Auswahl von schnell und einfach herzustellenden, nicht toxischen, definierten Chitosan-Chargen verschiedener Kettenlänge von besonderer Bedeutung.

Im Bereich der Immuntherapie ist es gelungen, mit Hilfe von DNA-Plasmiden ein Vakzinierungsprinzip zu finden, das einfach herzustellen ist und die Sicherheit der üblichen Immunisierungsverfahren durch Lebend- oder Totimpfstoffe sowohl bei der Herstellung als auch bei der Anwendung übertrifft. Sowohl die humorale als auch die zelluläre Abwehr kann, wie in Tiermodellen gezeigt wurde, aktiviert werden [Gurunathan et al. 2000]. Ein Problem hierbei ist jedoch, dass die notwendigen Dosen für eine ausreichende Antwort zu hoch sind und somit einen Einsatz von Adjuvantien erforderlich machen. Nishimura et al. [1984 und 1986] und Knapczyk et al. [1989] beobachteten einen immunstimulierenden Effekt von Chitosan. Seferian und Martinez zeigten 2001, dass die Verwendung von zwei verschiedenen, auf Chitosan basierenden Formulierungen zu einem höheren und länger andauernden Antikörpertiter bei der Immunisierung mit rekombinanten Proteinen führt. Bewährt hat sich hier vor allem der Einsatz von Mikro- und Nanopartikelsystemen, die die Aufnahme von Plasmid-DNA in Zellen verstärken [Erbacher et al. 1998]. Eine Verwendung von Chitosan in partikulären, parenteralen Transportsystemen wie zum Beispiel für die Immuntherapie mit Plasmid-DNA ist deshalb von großem Interesse.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die gezielte Herstellung kurzkettiger Chitosane mit definierten Molekulargewichten. Die Charakterisierung der Chitosane sollte zum einen mit einer möglichst genauen, aber andererseits auch mit einfachen Methoden erfolgen. Dazu wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie als eines der jüngsten Analyseverfahren hinsichtlich der Anwendbarkeit und Eignung zur

Ermittlung des Molekulargewichtes untersucht. Zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades ist die Kernresonanzspektrometrie die zur Zeit genaueste Methode [Rinaudo et al. 1992, Heux et al. 2000, Duarte et al. 2001]. Aufgrund der hohen Kosten für ein solches System wurde die Verwendungsmöglichkeit eines Partikkelladungsdetektors als eine kostengünstige und einfache Bestimmungsmethode untersucht. Gleichzeitig sollten die Herstellerangaben von handelsüblichen Chitosanen für den Deacetylierungsgrad, die meist auf kolloidtitrimetrische Verfahren mit einer Endpunktbestimmung über Farbstoffe oder potentiometrische Verfahren basieren, mit Hilfe der Kernresonanzspektrometrie überprüft werden, um eine eventuelle Notwendigkeit des Einsatzes von genaueren Verfahren für die Standardanalytik aufzuzeigen.

Des weiteren sollte die Anwendungsmöglichkeit von kurzkettigen Chitosanen in der Form von Mikro- und Nanopartikeln als Transportsystem für Plasmid-DNA in vitro studiert werden. Hier lag der Fokus auf der Herstellung von unterschiedlich großen Trägern aus verschiedenen Chitosan-Molekulargewichten und deren Auswirkung auf eine Transfektionsverbesserung im Vergleich zur nackten DNA.

2 Chitosan als Hilfsstoff in der Pharmazie

2.1 Langkettige Chitosane

Chitosan ist ein lineares Copolymer aus β -1,4-glycosidisch gebundener 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose und 2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose, wobei der Anteil des Glucosamins größer ist als der des Acetylglucosamins (Abb. 2.1).

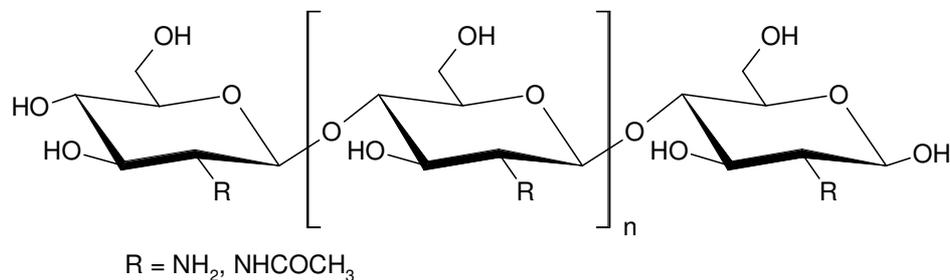


Abb. 2.1 Strukturformel von Chitosan

Chitosan kommt naturgemäß in einigen Mikroorganismen und Pilzen vor. Die industrielle Gewinnung erfolgt jedoch fast ausschließlich durch partielle Deacetylierung von Chitin, dem zweithäufigsten Biopolymer nach Cellulose, aus Schalenabfällen von Krebsen und Garnelen, deren Chitingehalt bis zu 70 % betragen kann [Felt et al. 1998]. Die chemische Herstellung umfasst die Deproteinierung der zerkleinerten und gewaschenen Schalen mit 3 – 5 %-iger Natronlauge, die Demineralisierung mit 3 – 5 %-iger Salzsäure, Entfärbung und die Deacetylierung mit 40 – 45 %-iger Natronlauge. Das entstandene Präzipitat wird mit Wasser gewaschen, in Essigsäure gelöst, filtriert und mit Natronlauge gefällt. Das gewaschene, weiße Endprodukt wird getrocknet und meist als Pulver oder in Flocken verschiedener Qualität in den Handel gebracht [Roberts 1992a, Hirano 1996]. Das Europäische Arzneibuch 4.00 beschreibt in seiner Monographie das wasserlösliche Chitosanhydrochlorid, das zwischen 10 und 20 % Chlo-

rid enthalten darf und durch Fällung oder Trocknung von in Salzsäure gelöstem Chitosan gewonnen werden kann.

Charakterisiert wird Chitosan über den Deacetylierungsgrad (DD), der bei der Lebensmittelqualität meist zwischen 75 und 80 % und bei der pharmazeutischen Qualität zwischen 90 und 95 % liegt [Paul et al. 2000], über das Molekulargewicht (MW), das bei handelsüblichen Chitosanen über 50000 Dalton liegt und über die Viskosität einer 1 %-igen Chitosanlösung in 1 %-iger Essigsäure, die einen Wert von 2000 mPas nicht überschreitet [Illum 1998]. Langkettiges Chitosan besitzt in Abhängigkeit vom DD und MW einen durchschnittlichen pK_a -Wert von 6,5 [Domard 1987a, Anthonsen und Smidsroed 1995] und ist bei einem Deacetylierungsgrad von über 85 % in den meisten verdünnten organischen Säuren wie Ameisen-, Essig-, Milch- oder Zitronensäure und einigen Mineralsäuren wie Salz-, Salpeter- oder Perchlorsäure zwischen pH 2 und 6,5 löslich [Singla und Chawla 2001]. Verringert man den Deacetylierungsgrad auf 40 bis 60 %, so lassen sich diese Chitosane auch in neutralem und leicht alkalischem Milieu lösen. [Sannan et al. 1976, Varum et al. 1994]. Aufgrund der protonierbaren Aminogruppe zeigt Chitosan ein polykationisches Verhalten, das zur Komplexbildung mit vielen negativ geladenen Komponenten wie Polyanionen, Farbstoffen, Proteinen und DNA führen kann. Ebenfalls bildet Chitosan mit Schwermetallionen schwerlösliche Chelatkomplexe, sodass es seit 1975 vor allem in Japan in großen Mengen zur Abwasseraufbereitung eingesetzt wird [Hirano 1996]. Weiterhin ist Chitosan gelbildend, filmbildend, verpressbar, ausfällbar, aufschäumbar, sodass zahlreiche Applikationsformen wie zum Beispiel Lösungen [Thanou et al. 2001], Emulsionen [Jumaa und Müller 1999], Gele [Kristl et al. 1993], Schwämme [Oungbho und Müller 1997], Tabletten [Brine 1989], Filme [Kanke et al. 1989], Mikro- und Nanopartikel [Nishimura et al. 1987, Bodmeier et al. 1989] hergestellt worden sind.

Arai fand für Chitosan 1968 einen LD_{50} -Wert von 16 g/kg bei der oralen Gabe an Mäusen, eine Größenordnung, die der von Saccharose und Kochsalz ent-

spricht, und viele weitere Arbeiten bestätigten die hohe Biokompatibilität des Biopolymers für enterale und parenterale Zwecke [Knapczyk et al. 1989, Chandy und Sharma 1990, Hirano et al. 1988 und 1990, Rao und Sharma 1997]. Tanaka et al. beobachteten 1997 nach einer oralen, subcutanen und intraperitonealen Langzeitgabe von Chitosanpartikeln keine äußerlichen Veränderungen an den getesteten Mäusen, bis auf eine leichte Abnahme des Körpergewichtes. Bei der histologischen Untersuchung der intraperitoneal behandelten Gruppe fand er jedoch eine Vielzahl von Makrophagenhyperplasien und riet deshalb zu einem achtsamen Umgang bei der pharmazeutischen Verwendung von Chitin und Chitosan über einen längeren Zeitraum. Allerdings wurde in dieser Arbeit das eingesetzte Chitosan nicht speziell für die parenterale Applikation aufgereinigt, so dass der beobachtete Effekt ebenfalls durch Verunreinigungen wie einen erhöhten Restproteingehalt zu erklären wäre.

Im Körper wird Chitosan über ubiquitär vorhandenes Lysozym zu N-Acetylglucosamin abgebaut, das in den Syntheseweg von Glycoproteinen eingebunden und später als Kohlendioxid ausgeschieden wird [Chandy und Sharma 1990, Muzzarelli 1997, Kristiansen et al. 1998]. Chitosan ist bakterizid [No et al. 2002], fungizid [Knapczyk et al. 1992] und durch Stimulation der Zellproliferation wundheilungsfördernd [Muzzarelli et al. 1988]. Zusammen mit seinen wasserbindenden und hämostatischen Eigenschaften [Fradet et al. 1986, Olsen et al. 1989] eignet es sich hervorragend für die Wundbehandlung zum Beispiel in Form von Hydrokolloidpflastern (TegasorbTM), eine der wenigen, momentan auf dem pharmazeutischen Markt befindlichen Einsatzformen von Chitosan neben einigen kosmetischen Produkten wie Haarfestigern, Cremes und Deodorantien [Skaugrud 1991, Dodane und Vilivalam 1998]. Die hämostatische Aktivität begründeten Rao und Sharma 1997 mit einer Interaktion zwischen dem positiv geladenen Chitosan und der negativ geladenen Oberfläche der roten Blutkörperchen. Ebenso zeigt Chitosan gute Bindungseigenschaften auf Schleimhäuten und Zelloberflächen und kann daher in bioadhäsiven Arzneiformen verwendet wer-

den [Lehr et al. 1992, Takeuchi et al. 1994]. Illum et al. berichteten 1994 von einer verbesserten nasalen Aufnahme von Insulin durch Chitosan. Tengamnuay et al. bestätigten dies 2000 und beobachteten eine leichte Überlegenheit zu Dimethyl- β -cyclodextrin bei geringerer Irritation der Mucosa. Den besten Effekt eines Penetrationsenhancers lieferten Chitosane mit einem hohen Deacetylierungsgrad [Schipper et al. 1996]. Lueßen et al. [1996] und Bernkop-Schnurch [2000] fanden eine Verbesserung der oralen Verfügbarkeit von Peptidarzneistoffen, was sie auf die Interaktion des Polykations mit den Glycoproteinen der Mucosa und der Öffnung von Tight Junctions zurückführten.

Ohe sprach Chitosan 1996 eine antimutagene Wirkung zu. Er beobachtete einen verminderten Effekt von erbgutschädigenden Substanzen durch Absorption in ionischen und nichtionischen Lösungen und schlug Chitin und Chitosan als Protektiva gegen Mutagene vor. Ebenfalls zeigen Chitosan-Suspensionen oder Mikropartikel einen immunstimulierenden Effekt wie die Aktivierung von Makrophagen, die Hemmung von Tumorwachstum über die verstärkte Ausschüttung von NO durch Makrophagen, eine Induktion der Produktion der Cytokine IL-1 und CSF, eine verbesserte Abwehr durch Antikörper und eine Verstärkung der Bildung von T-Zellen [Nishimura et al. 1986, Muzzarelli et al. 1988, Peluso et al. 1994, Otterlei et al. 1994, Calvo et al. 1997]. Die Verwendung von Chitosan führt zu einer allgemeinen, unspezifischen Immunantwort [Seferian und Martinez 2001] und unterstreicht damit seine Eignung als Adjuvans in der Immuntherapie.

2.2 Kurzkettige Chitosane

Kurzkettige Chitosane werden im allgemeinen die Chitosane genannt, deren Molekulargewichte die der handelsüblichen, nicht speziell depolymerisierten Chitosane unterschreiten. Die Bezeichnung ist gleichbedeutend mit dem Begriff „Chitooligomere“ oder „niedermolekulare Chitosane“, deren Molgewichte üblicherweise unter 50.000 Dalton liegen. Eine einheitliche Abgrenzung zu den

langkettigen wurde jedoch noch nicht definiert. So sahen No et al. [2002] die Grenze zum Beispiel bei 25.000 g/mol. In dieser Arbeit wurden handelsübliche Chitosane mit einem kleinsten Molgewicht von 64.500 g/mol verwendet. Alle anderen wurden durch Hydrolyse speziell hergestellt und werden als „kurzkettig“ bezeichnet. Hierunter fallen auch die Chitooligosaccharide, deren Polymerisationsgrad nicht höher als 10 ist, entsprechend einem Molekulargewicht von 1.612 g/mol einer vollständig deacetylierten Base.

Grundsätzlich können kurzkettige Chitosane entweder über chemische oder über enzymatische Verfahren hergestellt werden. Die erste Spaltung von Chitin zum Salz des deacetylierten Monomers Glucosamin-Hydrochlorid gelang Ledderhose 1.876 beim Kochen von Chitin in konzentrierter Salzsäure. Das gleiche Ergebnis beobachtete Hoppe-Seyler 18 Jahre später bei der sauren Hydrolyse von Chitosan. 1957 präparierten Horowitz et al. die ersten Chitooligomere aus Chitosan mit einer maximalen Kettenlänge von sechs Monomeren durch die Depolymerisation mit konzentrierter Salzsäure. Dieser Versuch wurde bei 53 °C durchgeführt und dauerte 48 Stunden. Rupley untersuchte 1964 die salzsaure Hydrolyse von Chitin bei verschiedenen Temperaturen und Säurekonzentrationen und fand für den Hydrolyseverlauf zwischen 10 und 90 Prozent eine Kinetik erster Ordnung. 1989 stellten Domard und Cartier durch eine nach Horowitz modifizierte Methode mit 12 molarer Salzsäure bei 72 °C und einer Hydrolysedauer von 75 Minuten ein Gemisch aus Chitooligomeren her, deren Polymerisationsgrad zwischen 1 und 37 lag. Jedoch war der Anteil an längerkettigem Chitosan über einem Polymerisationsgrad von 10 mit 25 % eher gering. Rege und Block untersuchten 1999 die Bedeutung von Temperatur, Zeit und Rührgeschwindigkeit auf die saure und alkalische Hydrolyse von Chitosan. Sie erhitzten Chitosan in 2,5 M HCl unter Rückfluss 0,5 bis 4 Stunden bei 60 bis 100 °C und fanden einen signifikanten Einfluss von Temperatur und Zeit, nicht aber einen der Rührgeschwindigkeit. Diese hatte jedoch einen Einfluss auf die Aktivierungsenergie, die bei einer Rührgeschwindigkeit von 1000 U/min mit 20,7 und ohne Rühren

mit 28,5 kJ/mol bestimmt wurde. Die Auswirkungen verschiedener Salzsäurekonzentrationen auf die Depolymerisationsrate wurden 2000 von Varum et al. untersucht. Für den Konzentrationsbereich von 0,01 – 0,8 M wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und der Abbaukonstanten beobachtet. Die Spaltung der glycosidischen Verbindung verläuft nach einer S_N1 -Reaktion, die in Abb. 2.2 dargestellt ist.

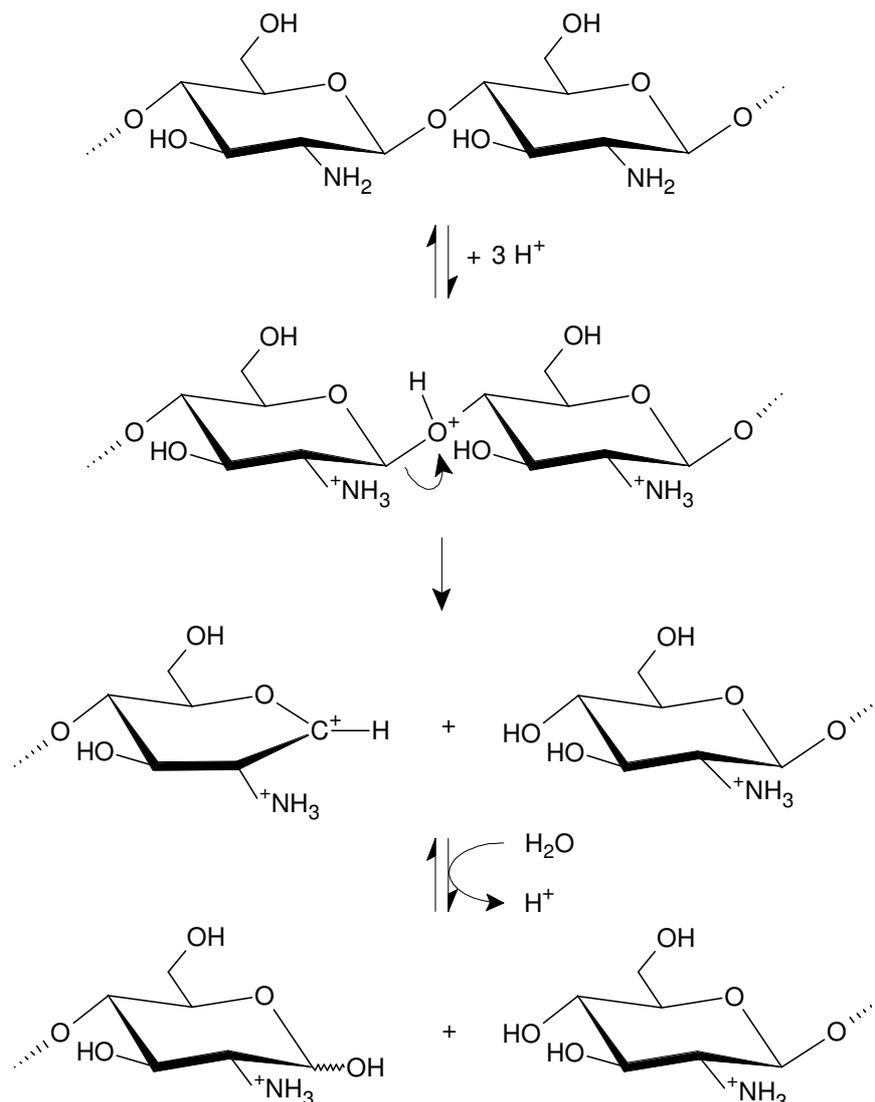


Abb. 2.2 Salzsäure Hydrolyse von Chitosan

Hierbei wird die Bindung zwischen zwei acetylierten Glucosaminen (A-A) und einem acetylierten und deacetylierten (A-D) drei mal so schnell gespalten wie die anderen beiden Bindungen (D-D) und (D-A). Die jeweiligen Aktivierungs-

energien, die ebenfalls vom Deacetylierungsgrad des Gesamtmoleküls abhängig sind, berechneten Varum et al. zwischen 130,4 und 158,1 kJ/mol.

Eine andere häufig verwendete Methode, kurzkettige Chitosane herzustellen, ist die Hydrolyse mit salpetriger Säure (vgl. Abb. 3.19, S. 73). Es wurde für die Depolymerisation ebenfalls eine Reaktion erster Ordnung bestimmt, deren Kinetik stark von der Chitosankonzentration und dem Deacetylierungsgrad abhängt [Allan und Peyron 1989]. Der Angriff erfolgt durch das Nitrosyl-Kation NO^+ an den freien Aminogruppen des Polyglucosamins. Die homogene Spaltung der β -glycosidischen Bindungen, die wesentlich rascher als mit Salzsäure verläuft, ist aufgrund eines nahezu stöchiometrischen Verlaufs relativ gut kontrollierbar [Allan und Peyron 1995]. Da aber gleichzeitig eine Desaminierung der N-Acetylglucosamin-Einheiten stattfindet, ist die genaue Kenntnis des Deacetylierungsgrades des Ausgangsmaterials von besonderer Bedeutung. Ein großer Nachteil ist, dass unter Abspaltung von Stickstoff am neuen, reduzierenden Ende als Hauptprodukt eine 2,5-Anhydro-D-mannose gebildet wird, deren Aldehydgruppe aufgrund der hohen Reaktivität zu weiteren, von Tommeraas et al. 2001 beschriebenen Nebenprodukten reagieren kann. Zur Stabilisierung des Endproduktes ist daher eine Reduktion zu 2,5-Anhydro-D-mannitol durch Zugabe von NaBH_4 erforderlich [Hirano et al. 1986]. Die Aufreinigung der Oligomere von Nebenprodukten und Resten der salpetrigen Säure für die Verwendung in der Pharmazie ist aufwendig. Die Endprodukte sind streng genommen keine reinen Chitosane mehr, da ein Teil der Makromoleküle einen endständigen Tetrahydrofuran-2-carbaldehyd besitzen. Der Anteil an Chitosan fremden Strukturen wird größer, je kurzkettiger die Produkte werden. Andere Säuren wie Flusssäure und Schwefelsäure sind zur Herstellung von Chitooligomeren eher ungeeignet, da sie zu weiteren ungewollten Nebenprodukten führen [Defaye et al. 1989, Nagasawa und Tanoura 1972]. Bei der Behandlung von Chitin mit Natronlauge mit dem Ziel der Desaminierung kommt es ebenfalls zur Reduktion des Molekulargewichtes. Die alkalische Hydrolyse ist jedoch ein sehr langsam

ablaufender Prozess, der zu Produkten mit hohen Polydispersitätsgraden führt und drastische Bedingungen erfordert [Allan und Peyron 1989]. Hwang et al. untersuchten 2002 ausführlichst den Einfluss von Zeit, Temperatur und Natronlaugekonzentration auf den Deacetylierungsgrad und das Molekulargewicht, erhielten aber selbst nach 34 Stunden und 120 °C lediglich Chitosane mit einem Molekulargewicht von minimal 100 kDa.

Interessante Ansätze findet man bei der enzymatischen Gewinnung von kurzkettigen Chitosanen. Untersucht worden sind vor allem Endochitosanasen aus Bakterien und Pilzen, deren Aktivitäten stark abhängig vom Deacetylierungsgrad des Substrates Chitosan sind. So zeigt die Chitosanase von *Bacillus ciruculans* seine größte Aktivität bei 80 % deacetyliertem Chitosan [Yabuki 1989], während die von *Penicillium islandicum* ihre beste Wirksamkeit bei Deacetylierungsgraden von 40 – 70 % entfaltet [Fenton et al. 1978]. Die meisten Untersuchungen ergaben sehr niedrige Polymerisationsgrade. Yabuki erhielt nach 32 Stunden Oligomere mit einem Polymerisationsgrad von 2 – 6, Uchida et al. [1989] verwendeten eine Kultur von *Bacillus* sp. No.7-M und detektierte nach 1 bis 8 Stunden Polymerisationsgrade zwischen 3 und 7. Erst 1999 stellten Zhang et al. mit Hilfe der Chitosanase aus *Streptomyces griseus* Chitooligomere mit einem maximalen Polymerisationsgrad von 17 her, entsprechend einem Molekulargewicht von 2754 g/mol. Aber auch hier hatte der größte Anteil einen $DP \leq 4$. Ilyana präsentierte 2000 einen Enzymkomplex aus dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces kurssanovii*, mit dem es in 0,5 bis 3 Stunden gelang, Chitooligomere mit verschiedenen Molekulargewichten zwischen 2 und 23 kDa herzustellen. Die Werte wurden jedoch nur viskosimetrisch ermittelt, sodass diese nur ein mittleres Molekulargewicht darstellten. Es ist also nicht möglich zu sagen, ob die vorhandenen einzelnen Oligomere wirklich diese Kettenlängen besaßen, oder ob dies nur ein Gemisch aus dem Ausgangsmaterial und extrem kurzkettigen Oligosacchariden repräsentierte. Ein weiteres Problem stellt die Verfügbarkeit der Enzyme für einen großtechnischen Einsatz dar. Chitosanasen

sind für eine kommerzielle Nutzung nicht in ausreichenden Mengen erhältlich [Zhang und Neau 2001], sodass andere, unspezifischere Enzymsysteme getestet worden sind. Terbojevich et al. [1996] benutzten Papain und erhielten aus Chitosan mit einem Ausgangsmolekulargewicht von 784.000 Da nach sieben Tagen nur ein Endgewicht von 201.000 Da bei einem Polydispersitätsgrad von 3. Zhang und Neau [2001] untersuchten eine β -Glucosidase-Enzympräparation, mit der Chitosan in einigen Stunden abbaubar war. Aber auch hier wurden keine Molekülmassenverteilungen gemessen, mit denen eine Aussage über die Polydispersität, bzw. der Zusammensetzung der Produkte möglich gewesen wäre. So ist bisher kaum ein akzeptables enzymatisches Verfahren bekannt, mit dem man gezielt Chitooligomere beliebiger Kettenlänge mit einem geringen Polydispersitätsgrad in kommerziellen Mengen herstellen könnte.

Kurzkettige Chitosane weisen eine bessere Wasserlöslichkeit als die langkettigen Polymere auf. Die beste Löslichkeit besitzen sie ebenfalls bei einem Acetylierungsgrad von 50 %. Mit Molekulargewichten unter 20.000 g/mol sind sie dann im gesamten pH-Bereich von 0 – 14 gut löslich [Kubota et al. 2000]. Chitooligosaccharide mit höheren Deacetylierungsgraden lassen sich unter einem Polymerisationsgrad von 10 in saurem und neutralem Bereich gut lösen. Die Verwendung von Chitosanen mit einem Molekulargewicht von 3.800 Dalton ermöglicht nach Verkneten eine Verbesserung der Löslichkeiten und Lösungsgeschwindigkeiten von diversen Arzneistoffen durch eine bessere Benetzbarkeit und Verringerung der Kristallinität der verarbeiteten Wirkstoffe [Shiraishi et al. 1990]. Schipper et al. untersuchten 1996 den Effekt von verschiedenen Chitosanen auf die Absorption von hydrophilen Substanzen in Hinblick auf eine forcierte Aufnahmefähigkeit von Proteinen und Peptiden durch die Mucosa. Chitosane mit einem Molekulargewicht von 4.700 g/mol zeigten neben den langkettigen gute Ergebnisse. Der Deacetylierungsgrad der verwendeten Chitosane sollte für einen optimalen Effekt möglichst unter 15 % liegen. Die Verbesserung der Penetration wird unter anderem mit der Wirkung auf die Tight Junctions erklärt.

Oligosaccharide bis zu einem DP von 6 zeigen keinen, ab 13 einen leichten und bei einem Molekulargewicht von 34.000 den größten Effekt auf deren Öffnung [Holme et al. 2000].

Die antibakterielle Aktivität von Chitosanen ist ebenfalls abhängig von deren Kettenlänge. Uchida et al. [1989] zeigten, dass nur Oligomere über einem DP von 4 einen ausreichend bakteriziden und fungiziden Effekt besitzen. Tanigawa et al. [1992] beobachtete eine optimale Wirkung gegenüber sieben Standardkeimen bei Chitooligomeren mit einem Molekulargewicht von 2.000 g/mol und den langkettigeren Polymeren, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von No et al. [2002] ist. Der Deacetylierungsgrad sollte hier ebenfalls über 80 % liegen, was die These unterstützt, dass unter anderem Reaktionen des Polykations mit der negativ geladenen Zellwand der Keime für diese Wirkung verantwortlich sind. Tarsi et al. fanden 1998 heraus, dass Chitooligomere mit einem MW von 1.500 g/mol die Anheftung von *Streptococcus mutans*, dem Hauptverursacher von Karies, an Hydroxyapatit unterbinden kann und schlugen daher den Zusatz der Oligomere zu Zahncremes vor.

Suzuki et al. untersuchten 1986 den Effekt von Chitohexanosen auf implantierte Tumore in Mäusen. Sie konnten nach einer mehrmaligen parenteralen Gabe einer Chitosanlösung eine Tumorreduktion um bis zu 100 % ohne toxische Begleiterscheinungen beobachten. Seo et al. [2000] begründeten die immunstimulierenden und tumorhemmenden Wirkungen von Chitooligosacchariden mit einer direkten Stimulation der Makrophagen. Sie fanden einen synergistischen Effekt mit Interferon- γ , was zur vermehrten Ausschüttung von Stickstoffmonoxid aus Makrophagen führte und so eine wichtige Rolle bei der Makrophagen vermittelten Antitumoraktivität spielt.

Hirano et al. untersuchten 1988 die Toxizität von kurzketttigen Chitosanen an Kaninchen und Hühnern und bestimmten die sicheren Dosen mit 1 g/kg/d für die perorale und 4,5 mg/kg/d für die intravenöse Applikation, was den Ergebnissen von Suzuki et al. [1986] gegenübersteht, die selbst bei der parenteralen Gabe

von 300 mg/kg Chitohexaosen an Mäusen keine toxischen Effekte feststellen konnten. Richardson et al. [1999] beobachteten bei der parenteralen Gabe von Chitosan-DNA-Komplexen an Ratten und Molekulargewichten des Trägers über 5.000 Dalton im Gegensatz zu den kurzkettigeren eine Akkumulation der Partikel besonders in der Leber und der Niere. 1997 berichteten Richardson et al. und Carreno-Gómez et al. von einer höheren Zelltoxizität bei langkettigen Chitosanen im Vergleich zu kurzkettigen. Beide schlugen deshalb für die parenterale Anwendung Chitosane mit einem niedrigen Molekulargewicht zum Beispiel als Komponente für Gentransportsysteme vor, da diese keine relevante Toxizität besitzen und eine gute Verteilung im Körper zur Erreichung des Zielortes zulassen.

Zusammengefasst stellt Chitosan eine interessante Komponente bei der Verwendung in pharmazeutischen Systemen dar. Die kurzkettigen, hoch deacetylierten Polymere sind insbesondere bei parenteralen Applikationen im Hinblick auf die Toxizität, die bessere Verteilung und das Abbauverhalten im Körper den langkettigen überlegen. Es ist deshalb von großem Interesse, definierte, kurzkettige Chitosane mit einer engen Molmassenverteilung schnell, einfach und mit einer möglichst hohen Ausbeute herzustellen, um sie als Hilfsstoffe gezielt einzusetzen. Da sowohl das Molekulargewicht als auch der Deacetylierungsgrad das Verhalten und die Wirkung von Chitosanen im Organismus maßgeblich beeinflusst, ist die genaue aber auch einfache Charakterisierung von entscheidender Bedeutung.

2.3 Charakterisierung von Chitosan

2.3.1 Bestimmung des Molekulargewichtes

Die entscheidenden Parameter, die die Eigenschaften und die daraus resultierenden Einsatzgebiete für Chitosan bestimmen, sind das mittlere Molekulargewicht, die Molekulargewichtsverteilung und der Deacetylierungsgrad. Die relevanten Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes können in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Das Ergebnis einer *Relativmethode* lässt sich von der chemischen und physikalischen Struktur der gelösten Makromoleküle und von deren Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel beeinflussen. Es ist deshalb notwendig, die Beziehung zwischen Mess- und Bestimmungsgröße zu kalibrieren, um diese Zusammenhänge zu berücksichtigen. Zu diesen Methoden zählen das viskosimetrische Verfahren und die Größenausschlusschromatographie. Die Viskosimetrie ist heute immer noch ein häufig verwendetes Verfahren für die Bestimmung des Molekulargewichtes von Chitosanen, da es einen nur geringen apparativen Aufwand erfordert und für Molekulargewichte ab 100 Dalton geeignet ist. Der Zusammenhang zwischen der Viskosität einer Polymerlösung und des mittleren Molekulargewichtes wird durch die Mark-Houwink-Gleichung 2.1 beschrieben:

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad \text{Gleichung 2.1}$$

K und a sind empirische Größen, für deren experimentelle Ermittlung möglichst monodisperse Standards vorliegen müssen, die mit einem absoluten Verfahren genau zu charakterisieren sind. Sie sind außerdem abhängig von der Temperatur, dem Lösungsmittel, der Ionenstärke und dem Acetylierungsgrad des Chitosans und geben Aufschluss über die Geometrie des gelösten Moleküls [Wang et al. 1991, Roberts 1992b]. Ebenfalls beeinflusst das mittlere Molekulargewicht und der Dispersitätsgrad die Konstante K [Ottøy et al. 1996a] und genaue Kenntnisse

über die Restfeuchte und Verunreinigungen sind für die exakte Bestimmung erforderlich [Knaul et al. 1998]. Durch die Wahl des Lösungsmittels muss wie auch bei der Gelfiltrationschromatographie (GFC) eine Aggregation der Polymere vermieden werden [Rinaudo et al. 1993]. All diese Schwierigkeiten führen dazu, dass die gefundenen Werte für K und a ständig neu bestimmt worden sind und je nach Arbeitsgruppe erheblich voneinander abweichen können [Kasaai et al. 2000]. Es ist daher fraglich, ob sich diese Methode für die genaue Bestimmung von Molmassen wirklich eignet [Beri et al. 1993]. Sie gibt im Gegensatz zur GFC, die in Kopplung mit einer Absolutmethode heute überwiegend für die Ermittlung von zahl- und massenmittleren Molekulargewichten eingesetzt wird, auch keinen Aufschluss über die Molmassenverteilung.

In den *Absolutmethoden* steht der Messwert in direkter Beziehung zur Bestimmungsgröße Molmasse. Eine Annahme über die physikalische und chemische Struktur ist nicht erforderlich. Hierzu gehören alle Messmethoden, die auf kolligativen Eigenschaften beruhen, sowie Streulicht- und Ultrazentrifugationsverfahren. Die Molmassenbestimmungen mit Hilfe der Osmometrie und der Ultrazentrifugation haben aufgrund ihrer schwierigen bzw. eingeschränkten Anwendung keine Bedeutung erlangt [Roberts 1992b, Beri et al. 1993]. Von großem Interesse ist die Anwendung der statischen Lichtstreuung. Die Grundlage hierfür bildet die Tatsache, dass Licht, wenn es auf ein gelöstes Molekül trifft, in alle Richtungen gestreut wird. Die Streuintensität ist abhängig vom Molekulargewicht und von der Konzentration des Moleküls. Ist die charakteristische Dimension D der streuenden Moleküle kleiner als $1/20$ der eingestrahnten Wellenlänge λ , werden die Streustahlen als Kugelwellen abgegeben und sind winkelnunabhängig. Ist $D > \lambda/20$ (entsprechend einer Molmasse von etwa 10^5 g/mol) kommt es zu Interferenzerscheinungen und zu einer Winkelabhängigkeit des Streulichtes. Der Zusammenhang zwischen dem Streulicht und dem Molekulargewicht des gelösten Polymers ist in der Gleichung 2.2 zusammengefasst worden, die die Grundlage für die Berechnung der Molekulargewichte bildet.

$$\frac{K \cdot c}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} + 2A_2c \quad \text{Gleichung 2.2}$$

Die reduzierte Streulichtintensität wird mit dem Rayleigh-Verhältnis R_{θ} und die Schwächung der Streuintensität durch Interferenz wird durch die Streufunktion $P(\theta)$ beschrieben. Der zweite Virialkoeffizient A_2 berücksichtigt die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel. Die optische Konstante K ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Laserlichtes und ist direkt proportional zum Brechungsindexinkrement dn/dc . Die Konzentration c wird üblicherweise online mit einem Brechungsindexdetektor bestimmt. Wird zur Auftrennung von polydispersen Proben eine Trennsäule vorgeschaltet, erhält man ein Messsystem, mit dem man sehr präzise Molekulargewichtsverteilungen in einem Bereich von 500 bis zu mehreren Millionen Dalton ermitteln kann. Beri et al. [1993] überprüften ein solches System, ausgerüstet mit einem Mehrwinkelstreulichtdetektor, für die Anwendbarkeit auf Chitosanproben und unterstrichen die Genauigkeit dieser Methode und die Notwendigkeit einer Absolutmethode für die Molmassenbestimmung von Chitosanen. Signini und Filho [1999] sowie Burdalo et al. [2000] bestätigten die Überlegenheit und die Vorteile des Verfahrens für die Routineuntersuchung, sodass in dieser Arbeit allen Molekulargewichtsbestimmungen und Vergleichen diese Methode zu Grunde gelegt worden ist.

Aus der direkten Proportionalität des reduzierten Streusignals mit dem Molekulargewicht des gelösten Moleküls ergibt sich jedoch ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis bei sehr kleinen Molekülen (<1.000 g/mol), die nur zu sehr geringen Streulichtintensitäten führen. Eine sehr genaue Auftrennung und Analytik besonders von Oligomeren ist mit der 1988 von Hillenkamp eingeführten Methode der Massenspektrometrie mittels Matrix-unterstützter Laserdesorption-Ionisation Flugzeitspektroskopie (**Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectroscopy - MALDI-TOF-MS**) möglich (Abb. 2.3). Sie wurde vor allem für die Analyse von Biopolymeren wie Proteine, Oligonuc-

leotide und Polysaccharide mit einem Molekulargewicht bis zu über 10^5 Da entwickelt [Martin et al. 1996], wobei bisher auch Polymere bis zu über 10^6 Da detektiert werden konnten [Schriemer und Li 1996].

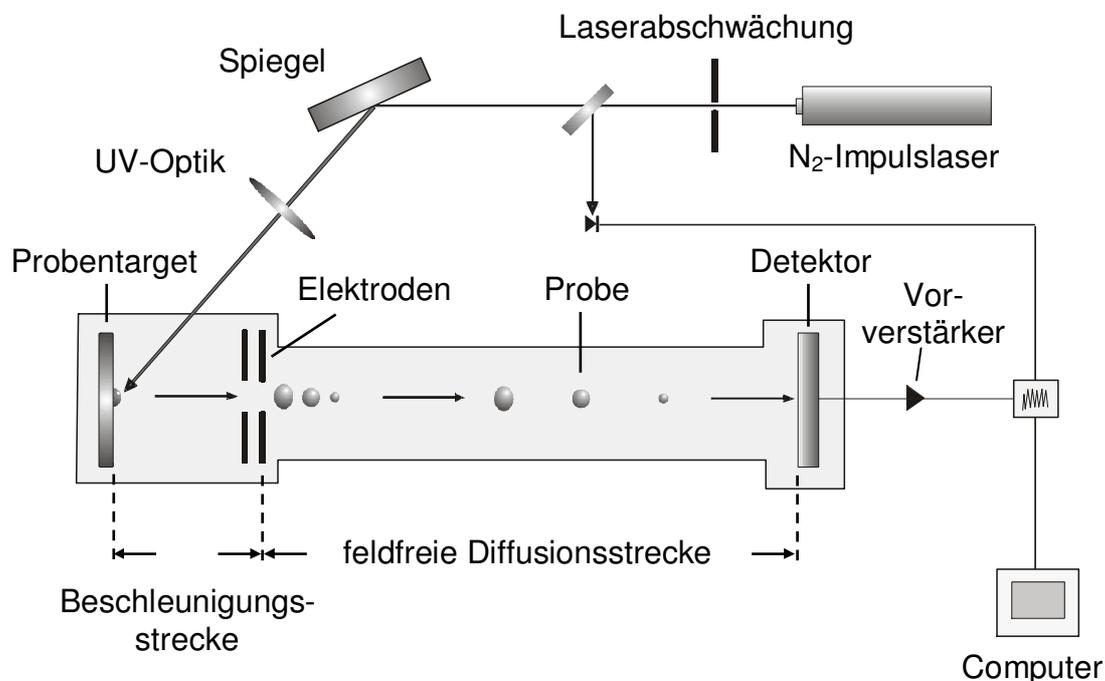


Abb. 2.3 Aufbau eines linearen MALDI-TOF-Massenspektrometers

Für eine Untersuchung wird die gelöste Probe mit einer geeigneten Matrix gemischt, auf das Target überführt und nach dem Abdampfen des Lösungsmittels mit einem gepulsten Laserstrahl abgetastet. Als Matrix werden niedermolekulare, leicht zu kristallisierende Substanzen verwendet, die im Wellenlängenbereich des Lasers gut absorbieren und auch im Vakuum nur einen geringen Dampfdruck besitzen. Die Laserenergie sollte so gewählt werden, dass es zu keiner Fragmentierung der Analytmoleküle kommt und die Matrix überschüssige Energie absorbieren kann. Durch die plötzliche lokale Energiezufuhr kommt es zu einer Anregung des Kristallgitters der Matrix und zu einer Bildung von Cluster-Ionen aus Analyt- und Matrixmolekülen, die in die Gasphase desorbieren. Der Elektronenüberschuss der Cluster wird von der Matrix aufgefangen oder aber in das Vakuum abgegeben. Durch einen Reneutralisationsprozess der Elektronen

und der protonierten Matrix entstehen aus den hochangeregten Clustern durch den Verlust von ungeladenen Matrixmolekülen einfach geladene Analyten [Karas und Krüger 2003]. Aufgrund der großen Anzahl an Freiheitsgraden der eingeschlossenen Polymere können die Schwingungen der Matrix nicht auf die Polymere übertragen werden, so dass diese nahezu unzersetzt in die Gasphase sublimieren können. Die erzeugten Ionen werden im anliegendem elektrischen Feld beschleunigt. Unterschiedliche Massen erhalten bei theoretisch gleicher kinetischer Energie unterschiedliche Geschwindigkeiten, so dass im feldfreien Raum die Moleküle mit der geringsten Masse zuerst detektiert werden. Die Flugzeiten sind direkt proportional zu ihrem Molekulargewicht und liegen im Bereich von 1 bis 100 μs .

Da nicht alle Ionen vom gleichen Ort zur gleichen Zeit desorbiert und ionisiert werden, unterliegen Moleküle mit einem gleichen Masse-Ladungs-Verhältnis einer gewissen Energie-, Orts- und Zeitunschärfe, was eine Verminderung der Auflösung zur Folge hat. Im linearen Flugzeitrohr wird dieser Effekt mit einer verzögerten Ionenextraktion minimiert, bei der das elektrische Feld zeitversetzt zum Laserpuls eingeschaltet wird. Ionen mit einer höheren Startgeschwindigkeit entfernen sich vor der elektrischen Beschleunigung weiter von der Probenoberfläche als Moleküle gleicher Masse und geringerer Startgeschwindigkeit. Beim zeitversetzten Einschalten des Beschleunigers erfahren diese eine geringere kinetische Energie, sodass bei exakter Einstellung Moleküle gleicher Masse gleichzeitig detektiert werden können [Vestal et al. 1995]. Eine weitere Verbesserung der Auflösung erzielt man, indem man am Ende der feldfreien Driftzone einen Reflektor mit entgegengesetzt geladenen Elektroden einsetzt, die die Moleküle zur Richtungsumkehr zwingen. Ionen mit gleicher Masse aber höherer kinetischer Energie dringen tiefer in das elektrische Gegenfeld ein und müssen somit eine längere Flugstrecke zum Detektor zurücklegen. Positioniert man den Detektor so, dass dann Moleküle mit gleicher Masse aber unterschiedlicher Startgeschwindigkeit zum gleichen Zeitpunkt auftreffen, werden schärfere Peaks

erhalten [Lottspeich und Zorbas 1998]. Die Detektoren sind bei diesem Aufbau entweder ringförmig um den Austritt der Ionenkammer oder daneben positioniert. Allerdings kann sich das detektierbare Molekülmassenspektrum von dem des linearen Systems unterscheiden, sodass eine Messung mit beiden Verfahren sinnvoll sein kann.

Die Vorteile der MALDI-TOF-MS liegen in der kurzen Analysendauer, dem minimalen Substanzbedarf, der hohen Massengenauigkeit, -auflösung und -reproduzierbarkeit. Es ist eines der genauesten Verfahren zur Bestimmung der Molekulargewichte für Substanzen mit einem Dispersitätsgrad unter 1,2 [Bahr et al. 1992, Montaudo et al. 1995, Schriemer und Li 1996]. Für die Analyse von Chitooligosacchariden wurde dieses Verfahren zum ersten Mal 1995 von Akiyama et al. eingesetzt. Die Detektionsgrenze lag bei einem Polymerisationsgrad von 11. Eine Aussage über das mittlere Molekulargewicht konnte jedoch nicht getroffen werden, da kein linearer Zusammenhang zwischen den relativen Ionenintensitäten und den Massenanteilen gefunden werden konnte. Martin et al. [1996] untersuchten diese Ungenauigkeiten für eine quantitative Auswertung von polydispersen Systemen mit breitverteilten Polystyrol- und Polymethylmethacrylatstandards. Sie fanden heraus, dass langkettigere Moleküle zur Desorption und Ionisation eine höhere Laserleistung erfordern. Dies verursahe bei breit verteilten Proben kleinere Peakflächen bei höheren Molekulargewichten und könne auch zu einer Fragmentierung von den kurzkettigeren Komponenten führen. Weitere Untersuchungen zeigten einen Einfluss der Probenbereitung, der Ionenfokussierung und Transmission, sowie der Detektorart auf die Massendiskriminierung [Schriemer und Li 1997a, 1997b, Byrd 2000]. Shimada et al. [2001] versuchte die Diskriminierung zu quantifizieren. Sie fanden heraus, dass im Gegensatz zu Molekulargewichten über 1.000 g/mol im Bereich der niedrigen Molekulargewichte von Polystyrol (DP = 2 – 5) die Diskriminierung nicht von der Laserleistung abhängig ist und schlossen daraus, dass hier keine Fragmentierung, sondern eine Verdampfung der niedrig siedenden Bestandteile im

Hochvakuum stattfindet.

Zhang et al. [1999] und Tømmeraas et al. [2001] benutzten MALDI-TOF-MS zur Massenanalyse der Fragmente nach der enzymatischen und chemischen Depolymerisation von Chitosan. Zhang et al. gelang es erstmals, Chitosane bis zu einem Polymerisationsgrad von 17 zu analysieren. Letzel et al. [2000] untersuchten in Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder Trihydroxyacetophenon (THAP) eingebettete Chitooligosaccharide ausschließlich im Reflektormodus und konnten nach einer Trennung durch Größenausschlusschromatographie zwei Fraktionen getrennt bis zu einem Molekulargewicht von ca. 7,5 kDa detektieren. Eine Methode für ein Gesamtspektrum wurde nicht gezeigt.

2.3.2 Bestimmung des Deacetylierungsgrades

Der Deacetylierungsgrad von Chitosan wird definiert als das Anzahlverhältnis der Glucosamineinheiten zur Gesamtmenge der N-Acetylglucosamin- und Glucosaminmonomere. Er beeinflusst eine Reihe von Eigenschaften wie zum Beispiel die Löslichkeit bei verschiedenen pH-Werten, die Quellfähigkeit in Wasser, die Bioabbaubarkeit, die Biokompatibilität und die Wirksamkeit in biologischen Systemen. Deshalb ist dieser Größe bei jeder Verwendung von Chitosan eine erhöhte Aufmerksamkeit geboten. Der Deacetylierungsgrad kann entweder direkt durch die quantitative Bestimmung der freien Aminogruppe oder indirekt über die Bestimmung der Amidgruppe bzw. des Acetylrestes erhalten werden. Eine Auflistung und Beschreibung von 16 möglichen Methoden lieferte Roberts [1992c]. Am häufigsten angewendeten werden titrimetrische Verfahren wie die Säure-Base- oder die Kolloidtitration, sowie die Infrarotspektroskopie (IR) und die Kernresonanzspektroskopie (NMR).

2.3.2.1 UV-Spektroskopie

Das Europäische Arzneibuch schlägt in der 2002 erstmals erschienenen Monographie „Chitosanhydrochlorid“ die UV-Spektroskopie als einfach durchzufüh-

rende Methode vor, die auf einer Arbeit von Muzzarelli und Rocchetti aus den Jahre 1985 basiert. Es wird eine Kalibrationsgerade mit verschiedenen N-Acetylglucosaminkonzentrationen erstellt und die Chitosanhydrochloridprobe unter Berücksichtigung des sich einstellenden pH-Wertes bei 200 oder 205 nm vermessen. Aiba [1986] fand unterschiedliche Absorptionskoeffizienten für vollständig acetylierte Chitooligosaccharide verschiedener Kettenlänge und stellte die UV-Methode der IR-Spektroskopie und der Kolloidtitration gegenüber. Bei zwei Proben lagen die ermittelten DD um bis zu 30 % auseinander, was die Anfälligkeit dieser Verfahren widerspiegelte. Tan et al. [1998] verglichen dieses Verfahren mit der NMR-Spektroskopie [Hiral et al. 1991], der Ninhydrinmethode [Curotto und Aros 1993] und der linearen Potentiometrie [Ke und Chen 1990]. Es wurden nur drei Proben miteinander verglichen und nur eine wurde mit Hilfe der Protonen-Kernresonanzspektroskopie vermessen. Deacetylierungsgrade von 55,4 bis 98,1 % wurden für ein und dieselbe Probe gefunden. Khan et al. [2002] fanden ebenso starke Diskrepanzen zwischen der Hydrobromidtitration, der IR- und der UV-Spektroskopie und unterstrichen die Abhängigkeit des Ergebnisses von der angewendeten Methode.

2.3.2.2 IR-Spektroskopie

Eine häufig verwendete Vergleichsmethode ist die IR-Spektroskopie. Ihr Vorteil liegt in der Möglichkeit der einfachen Vermessung der schwer löslichen Polymere mit einem DD unter 45 %. Allerdings unterliegen die Auswertungsmöglichkeiten der Spektren mit den damit verbundenen unterschiedlichen Ergebnissen einer starken Diskussion. Es werden je nach Autor verschiedene Absorptionsbanden herangezogen und ins Verhältnis gesetzt. Die Amidbande I (zwischen 1650 und 1660 cm^{-1}) und die Amidbande II (zwischen 1550 und 1560 cm^{-1}) dienen als analytische Banden, während für die Referenzbanden die OH-Valenzschwingung (3450 cm^{-1}), die CH-Valenzschwingung (zwischen 2867 und 2890 cm^{-1}) oder die CO-Schwingung (zwischen 1025 und 1074 cm^{-1}) her-

angezogen werden [Sannan et al. 1978, Moore und Roberts 1980, Miya et al. 1980, Domszy und Roberts 1985, Duarte et al. 2000]. Jede Methode hat Vor- und Nachteile und ist nicht für den gesamten Messbereich geeignet. So wird die Amidbande II stark von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und somit von der Anzahl der Acetylgruppen beeinflusst, sodass keine linearen Verhältnisse vorliegen [Moore und Roberts 1980]. Die Amidbande I interferiert stark mit den OH-Gruppen des Moleküls und reagiert sehr empfindlich auf die Restfeuchte, sodass die Probe als Pressling sehr sorgfältig vorbereitet werden muss [Miya et al. 1980, Duarte et al. 2000]. Duarte et al. wiesen auch auf mögliche Interferenzen und die Anfälligkeit gegenüber der Restfeuchte der OH-Bande bei 3450 cm^{-1} hin. Die CH-Referenzbande variiert mit der Kettenlänge des Polymers und ist unbeständig bei verschiedenen Acetylierungsgraden [Domszy und Roberts 1985], während Duarte et al. ebenfalls eine Verschiebung der Carbonylbande mit steigender Acetylierung beobachten konnten. Die Wahl der Basislinie spielt eine entscheidende Rolle sowie die Vorbereitung der Probe als KBr-Pressling oder als Film [Baxter et al. 1992, Struszczyk 2000]. So überrascht es nicht, dass bei dieser Relativmethode die Korrelation zu anderen Methoden oft nicht ausreichend ist [Struszczyk 2000, Khan et al. 2002] und dieses Verfahren großer Sorgfalt bei der Kalibration und Probenbereitung bedarf [Sabnis und Block 1997, Duarte et al. 2000].

2.3.2.3 Kernresonanzspektroskopie

Eine sehr genaue aber auch kostenintensive Methode ist die Kernresonanzspektroskopie. Der Deacetylierungsgrad von verschiedenen Chitosanen wurde mit Hilfe der Flüssig- ^1H -NMR- und Festkörper- ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Spektroskopie untersucht. Ausgenutzt wird die Tatsache, dass die Flächen unter den Resonanzsignalen proportional zu der Zahl der in Resonanz befindlichen Atome sind. Zu berücksichtigen sind die jeweils notwendigen Relaxations- und Kontaktzeiten, um eine quantitative Auswertbarkeit durch den Vergleich unterschiedlich ver-

schobener Peaks zu erhalten [Duarte et al. 2001]. Die natürlichen Häufigkeiten der durch die Kernresonanz erfassbaren Kerne bzw. Isotope sind: 99,99 % (^1H); 1,10 % (^{13}C) und 0,37 % (^{15}N). Die relativen Empfindlichkeiten im NMR-Experiment betragen 1,000 (^1H); 0,016 (^{13}C) und 0,001 (^{15}N). So verhalten sich die daraus resultierenden Empfindlichkeiten der Kerne von ^1H , ^{13}C und ^{15}N wie $1,00 : 1,76 \cdot 10^{-4} : 3,85 \cdot 10^{-6}$ zueinander [Hesse et al. 1995]. Diese Unterschiede gestalten die C-NMR- und N-NMR-Analytik schwieriger im Vergleich zur H-NMR-Spektroskopie, da hier aufwendigere und kostenintensivere Messtechniken (Cross Polarization Magic Angel Spinning – CP/MAS) und wesentlich längere Messzeiten erforderlich sind.

Varum et al. [1991a] nutzten zum ersten Mal die Protonenresonanzspektroskopie für die Untersuchung des Deacetylierungsgrades von Chitosan und beschrieben sie als schnell und einfach durchführbare Methode für die Routineanalytik. Um eine ausreichende Peakauflösung im 500 MHz-Spektrometer zu erhalten, mussten die Proben vorher jedoch zur Verringerung der Viskosität in salpetriger Säure bis zu einem Polymerisationsgrad von 15 bis 30 gespalten werden. Die Chitosanmoleküle erfahren hierbei die in Kapitel 2.2 beschriebenen Veränderungen. Die anschließend lyophilisierten Chitosane wurden in D_2O gelöst und bei $90\text{ }^\circ\text{C}$ vermessen. Ebenfalls untersuchten sie Chitosane mit der C-NMR-Spektroskopie und fanden eine zufällige Verteilung der N-Acetylglucosamineinheiten im Polymer [Varum et al. 1991b]. Rinaudo et al. [1992] stellten zur Untersuchung die Chitosanacetate durch Lyophilisation einer essigsauren Lösung her und bestimmten die Genauigkeiten der Methoden mit $\pm 5\%$ für die Protonenresonanzspektroskopie und $\pm 10\%$ für die C-NMR-Spektroskopie. Ottøy et al. [1996b] verglichen ^1H -NMR- mit der CP/MAS ^{13}C -NMR-Methode und fanden übereinstimmende Ergebnisse der beiden Kernresonanzuntersuchungen. Sie stellten die bessere Auflösung, die leichtere und präzisere Auswertbarkeit und die nicht notwendige Berücksichtigung des Wassergehaltes gegenüber der IR-Spektroskopie in den Vordergrund.

Die Auswertung mit Hilfe der Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektroskopie wurde erst in den letzten Jahren möglich. Die Peakauftrennung ist aufgrund der im Vergleich zu den Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen weniger vorkommenden Stickstoffatome besser, sodass die Spektrenauswertung vor allem bei quervernetzten Derivaten einfacher und robuster wird. Yu et al. [1999] bestimmten die Genauigkeit mit $\pm 10\%$, wiesen aber auch auf die notwendigen langen Messzeiten bei einer Signalakkumulation von 50.000 bis 80.000 Scans hin – ungefähr die tausendfache Anzahl an Scans, die für die quantitative Analyse mit Hilfe der Protonenresonanz nötig ist. Heux et al. [2000] verglichen alle drei Kernresonanzverfahren miteinander. Zusammen mit einer Arbeit von Brugnerotto et al. [2001] zeigten sie die hohe Empfindlichkeit der H-NMR und die Vorteile von Festkörper-C-NMR für säureunlösliche Chitosane bzw. Chitine und schlugen diese Verfahren für die Standardanalytik vor.

2.3.2.4 Titrationsverfahren

Der Anschaffungspreis eines Kernresonanzspektrometers ist sehr hoch, weshalb viele Labore der Chitosanhersteller auf eine kostengünstigere Alternative wie die Titration zurückgreifen. Verwendet wird entweder die Säure-Base-Titration oder die Kolloid- bzw. Polyelektrolyttitration. Beide Verfahren sind relativ einfach und schnell durchführbar. Der Titrationsendpunkt wird visuell mit Hilfe eines Farbindikators, potentiometrisch oder konduktometrisch bestimmt. Bei der Säure-Base-Titration nach Broussignac [1968] wird Chitosan in einer bekannten Menge Säure gelöst und mit Natronlauge potentiometrisch titriert. Das Volumen, das zwischen den beiden Krümmungspunkten verbraucht wird, entspricht der Menge, die notwendig ist, um die Aminogruppen zu protonieren. Durch die Präzipitation des Chitosans kurz vor dem Neutralpunkt ab circa pH 6,5 ist die Präzision des Verfahrens nicht sehr hoch. Sannan et al. [1976] führten die Titrationen durch, indem sie gelöstes Chitosan mit Natronlauge fällten und mit Salzsäure potentiometrisch zurücktitrierten. Die Bestimmung der verbrauchten Säure

über die Krümmungspunkte ist aber auch hier nicht einfach durchzuführen, so dass Domard und Rimaudo [1983] die konduktometrische Endpunktbestimmung vorschlugen. Raymond et al. [1993] verglichen die konduktometrische Titration von Chitosan mit Natronlauge mit den Ergebnissen der Festkörper-C-NMR-Spektroskopie und fanden gute Übereinstimmungen. Aber auch hier muss wegen der eintretenden Fällung des Chitosans die Auswertung sehr sorgfältig durchgeführt werden.

Die Kolloidtitration wurde 1952 von Terayama zur Analyse von Polyelektrolyten im wässrigem Medium entwickelt. Sie basiert auf einer Reaktion zwischen kationischen und anionischen Polyelektrolyten, bei der die Neutralisation der elektrischen Ladungen in sehr verdünnten Lösungen schnell und stöchiometrisch verläuft (Abb. 2.4).

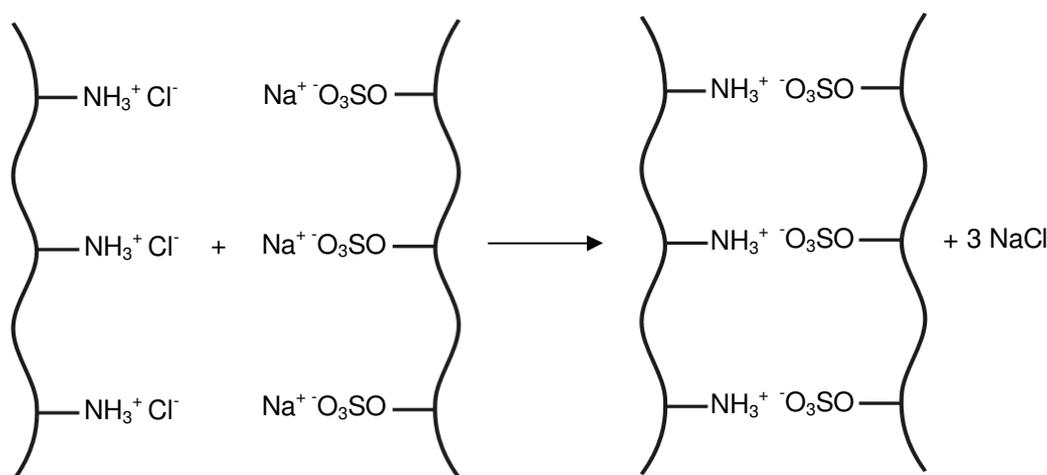


Abb. 2.4 Stöchiometrischer Verlauf der Kolloidtitration

Bei bekannter Ladungsmenge des einen Partners ist die des anderen durch die verbrauchte Menge am Endpunkt errechenbar. Chitosan liegt in saurer Lösung als expandiertes, durchspültes, zufälliges Knäuel vor und kann mit einem starken, negativen Polyelektrolyten im Verhältnis 1:1 reagieren [Fredheim und Christensen 2003]. Als Maßlösung eignet sich das Kalium- oder Natriumsalz von Polyvinylalkoholsulfat, das seine negativen Ladungen über den gesamten pH-Bereich behält [Ueno und Kina 1985]. Der Endpunkt kann durch die Zugabe

eines kationischen Farbstoffes wie Toluidinblau bestimmt werden, der solange in der freien Form verbleibt, bis er nach dem Äquivalenzpunkt mit dem ersten Überschuss des Titranten einen Komplex bildet und dadurch eine Farbänderung von Blau nach Rot-Violett vollführt – eine Methode, die Chitosanhersteller zur Angabe der Acetylierungsgrade ihrer Produkte sehr häufig anwenden. Die Voraussetzungen für diese Methode sind nach Hattori et al. [1999]:

- eine niedrige Polymerenkonzentration, die den stöchiometrischen Verlauf der Reaktion sicherstellt
- die vollständige Ionisierung der reaktiven Gruppen, was bei Chitosan durch einen niedrigen pH-Wert gewährleistet wird
- eine niedrige Konzentration an Fremdionen, die zu einer metachromatischen Intensitätsverschiebung des Farbstoffes führen oder im Falle von Schwermetallionen mit den Polymeren selbst Komplexe bilden könnten.

Bei sorgfältiger Ausführung liegt die Genauigkeit dieser Methode unter 5 % [Terayama 1952]. Ein Hauptnachteil ist wie bei allen visuellen Methoden die zum Teil schwierige Beurteilung des Umschlagpunktes, der nicht immer schnell und eindeutig zu erkennen ist. Die photoelektrische Endpunktbestimmung ist aufwendiger und kann nur durchgeführt werden, wenn metachromatische Verschiebungen ausgeschlossen oder kompensiert werden können, und die konduktometrische Ermittlung des Äquivalenzpunktes unterliegt den schon oben genannten Schwierigkeiten der exakten Festlegung der Krümmungspunkte. Oligosaccharide sind mit einem Indikatorfarbstoff ebenfalls nur schwer bis gar nicht auswertbar, da hier die Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen Polyanion-Polykation und Polyanion-Farbstoff sich immer ähnlicher werden und die Reaktionen nebeneinander und nicht mehr hintereinander ablaufen [Horn 1978].

2.3.2.5 Partikelladungsdetektor

Eine bisher noch nicht genannte Möglichkeit der Endpunktsbestimmung bei der Polyelektrolyttitration von Chitosan ist die Detektion des Ladungsneutralpunktes mit Hilfe des Partikelladungsdetektors (**P**article **C**harge **D**etektor - PCD). Dieses Gerät wird hauptsächlich bei der Papierherstellung, der Abwasserbehandlung und der Füllstoff- und Pigmentverarbeitung zur Bestimmung von Oberflächenladungen eingesetzt. Der Aufbau der Messzelle und die Funktion des Systems sind in der Abb. 2.5 und Abb. 2.6 dargestellt.

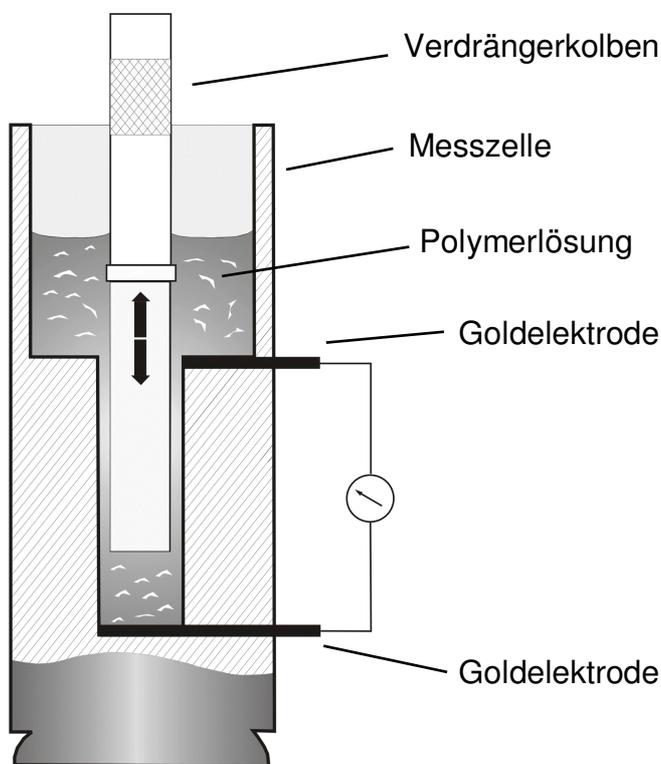


Abb. 2.5 Messzelle des Partikelladungsdetektors

In der zylindrischen Messzelle befindet sich ein eingepasster Messkolben, der sich mit konstanter Frequenz auf und ab bewegt. Wird eine kolloidale Lösung höhermolekularer Ladungsträger eingefüllt, adsorbieren diese durch Van-der-Waals-Kräfte zum Teil an der Teflonoberfläche der Messzelle und des Kolbens. Die oszillierende Bewegung des Kolbens verursacht ein Strömen der fluiden Phase der Probe zwischen Kolben und Gefäßwand.

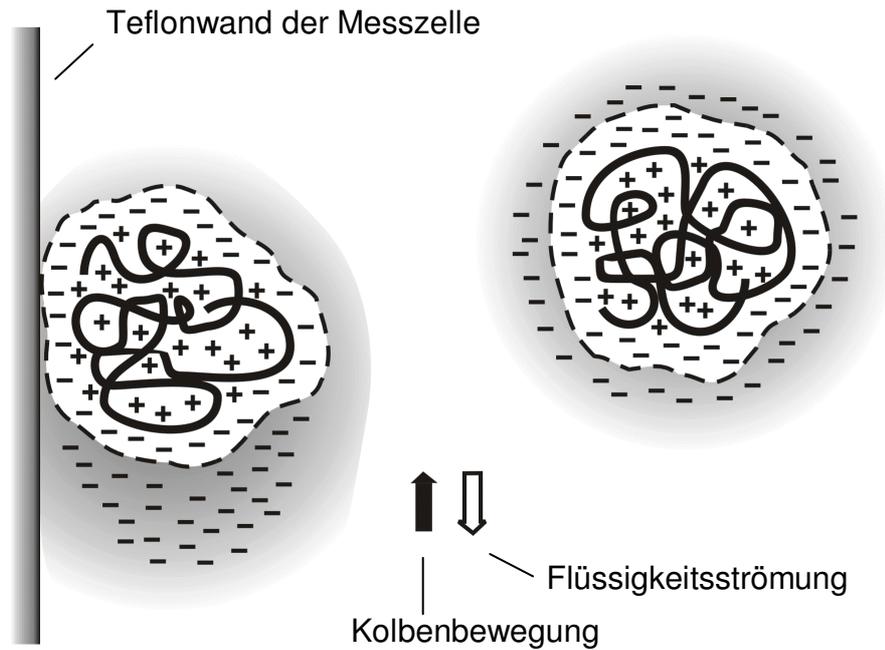


Abb. 2.6 Ladungswolken der adsorbierten und nicht adsorbierten Polymere

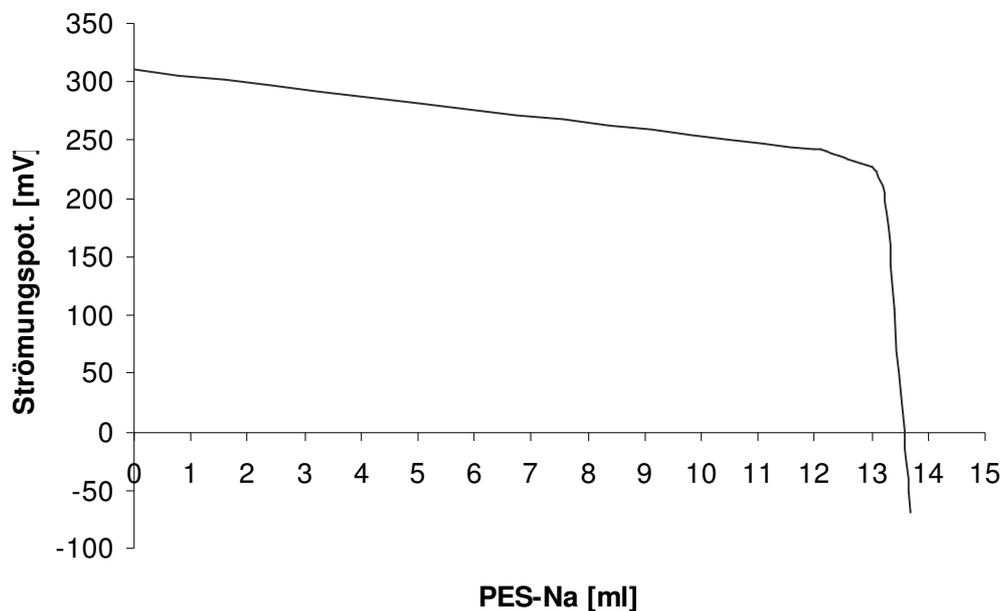


Abb. 2.7 Potentialverlauf bei der Titration von Chitosan mit PES-Na

Von den adsorbierten Makromolekülen, die die stationäre Phase bilden, wird infolge dieser Bewegung die diffuse Gegenionenwolke der elektrochemischen Doppelschicht abgeschert. Das führt zu einer partiellen Ladungsseparation, die

als Strömungspotential an den Goldelektroden abgegriffen werden kann (Abb. 2.6). Bei der Zuführung eines gegenseitig geladenen Polyelektrolyten werden zunächst die frei in der Lösung befindlichen Moleküle komplexiert, sodass das Messsignal nur sehr langsam sinkt. Sind alle frei beweglichen Ladungen neutralisiert, reagieren die an der Wand adsorbierten Moleküle, und ein steiler Signalabfall ist zu beobachten (Abb. 2.7). Aus dem Verbrauch an Titrationsmittel bis zum Ladungsneutralpunkt lässt sich die Ladungsmenge der Messprobe errechnen. Das System erfasst Polymere ab einem Molekulargewicht von circa 300 g/mol, sodass sich der Deacetylierungsgrad über die Bestimmung der freien Aminogruppen von Chitooligomeren und -polymeren mit diesem Verfahren einfach, schnell und eindeutig bestimmen lassen sollte.

2.4 Chitosan-Mikro- und Nanopartikel

Chitosanmikropartikel wurden bisher in vielfältiger Weise als Arzneitransportsystem vor allem für orale Applikationen verwendet. Arzneistoffe verschiedener Art wie zum Beispiel Antibiotika, Antihypertensiva, Zytostatika, Proteine und Peptide und Vakzine wurden inkorporiert [Paul und Sharma 2000, Singla und Chawla 2001]. Die gute Biokompatibilität und die Bioabbaubarkeit führen aber auch zu einem großen Interesse für den Einsatz des Hilfsstoffes für parenterale Zwecke.

2.4.1 Herstellungstechniken

Zur Herstellung von Mikro- und Nanopartikel aus Chitosan wurden bislang verschiedenste Techniken angewendet. Bei der *ionischen Gelierung* wird eine essigsäure Chitosanlösung durch eine Nadel tropfenweise und unter Rühren in eine wässrige Tripolyphosphatlösung gegeben. Die Partikel werden abgetrennt, mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Kawashima et al. [1985] und Bodmeier et al. [1989] stellten so durch die Umhüllung von Arzneistoffpartikeln Mikrokapseln bis zu einer Größe von 1 mm her. Calvo et al. [1997b] tropften die Polyphosphatlösung unter Rühren in eine Chitosanhydrochloridlösung und erhielten Nanopartikel mit einem Durchmesser von 300 – 400 nm. Durch Lösen von Insulin in der Phosphatlösung konnte dieses bis zu 55 % in die Partikel inkorporiert werden [Fernández-Urrunso et al. 1999].

Bei der *Lösungsmittelverdampfungsmethode* wird eine essigsäure Chitosanlösung mit Aceton versetzt unter Ultraschallbehandlung in Paraffinöl gegeben. Durch Zugabe von Sorbitansesquioleat wurde eine W/O-Emulsion erzeugt und die flüchtigen Bestandteile unter Stickstoffatmosphäre und Unterdruck bei 70 °C verdampft. Die Mikropartikelsuspension wurde mit Hexan verdünnt, zentrifugiert, mehrfach mit Hexan gewaschen und getrocknet [Gallo und Hassan 1988].

Thanoo et al. [1992] emulgierten die Chitosanlösung in Paraffin und Dioctylsulfosuccinat und fügten in Toluol gelöstes Glutaraldehyd zu. Die Partikel wurden mit Hexan, Methanol und Wasser gewaschen. Lim und Wan [1998] tauschten Glutaraldehyd durch Tripolyphosphat aus, wodurch die hergestellten Mikropartikel vermehrt aggregierten. Durch Zusatz von Magnesiumstearat konnte dieser Effekt minimiert werden, und sie erhielten Mikropartikel mit einem Durchmesser zwischen 150 und 250 μm . Eine modifizierte Lösungsmittelverdampfungs-methode ist die „*Dry-in-Oil*“-Methode, bei der die essigsäure Chitosanlösung unter Rühren in ein Paraffinöl-Span 20-Gemisch getropft und das Lösungsmittel bei 60 °C und vermindertem Druck über 19 Stunden verdampft wird. Die 2,8 bis 4,5 μm großen Partikel werden mit organischem Lösungsmittel und Wasser gewaschen, abzentrifugiert und getrocknet [Genta et al. 1998].

Durch einen dreistufigen Emulsionsprozess erzeugten Pavenetto et al. [1996] eine *multiple Emulsion* vom Typ O/W/O. Zuerst wurde aus Dichlormethan, in Essigsäure gelöstem Chitosan und Polysorbat 80 eine O/W-Emulsion erzeugt, die unter Rühren in Paraffinöl gegeben wurde. In die entstandene O/W/O-Emulsion wurde zur Quervernetzung Glutaraldehyd zugetropft und das Dichlormethan unter Vakuum verdampft. Die zwischen 3 und 6 μm großen Partikel wurden mit Petrolether gewaschen und getrocknet.

Genta et al. [1994] stellten aus einer Lösung von Chitosan in Eisessig, Wasser und Aceton säurelösliche Mikropartikel mittels *Sprühtrocknung* her. Durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd wurden sehr runde, unlösliche Partikel zwischen 2 und 10 μm erhalten [He et al. 1999].

Tropft man eine wässrige Natriumsulfatlösung in eine Polysorbat 80 enthaltende, essigsäure Chitosanlösung, fällt das schwerlösliche Chitosansulfat aus. Unter Ultraschallbehandlung und Rühren können nach Zentrifugation und mehrmaligem Waschen mit Wasser Mikropartikel mit einer Größe von durchschnittlich 2 μm erhalten werden [Berthold et al. 1996]. Der Vorteil von diesem *Präzipitationsverfahren* liegt in der Vermeidbarkeit von organischen Lösungsmitteln und

dem häufig zur Quervernetzung eingesetzten Glutaraldehyd.

Mit Hilfe der *komplexen Koazervation* wurden mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten unter sehr milden Bedingungen meist größere Mikropartikel hergestellt. Natriumalginat, Natriumcarboxymethylcellulose, Carrageen, Gelatine und Polyacrylsäure stellten sich als gute Komplexpartner heraus. Remunán-López und Bodmeier [1996] untersuchten die Prozessvariablen der Fällung von Chitosan mit Gelatine B. Die bestmögliche Koazervatbildung wurde bei einem pH-Wert zwischen 5,25 und 5,5 und einem Mischungsverhältnis von 1:10 bis 1:20 (Chitosan:Gelatine) beobachtet. Chitosan-Alginat-Partikel werden auf zwei verschiedene Weisen hergestellt. Bei der 2-Stufen-Methode wird im ersten Schritt eine wässrige Alginatlösung in eine Calciumlösung getropft, in der sich die Partikel ausformen. Im zweiten Schritt werden diese in einer Chitosanlösung verkapselt. Durch die Chitosanmenge kann die Freisetzung eines inkorporierten Arzneistoffes kontrolliert werden [Heller et al. 1996]. Im 1-Schritt-Verfahren wird die Chitosanlösung direkt in die Alginatlösung getropft oder umgekehrt. Die Porosität kann durch die Zugabe von Calcium in die Chitosanlösung vergrößert werden. Kurzkettige Chitosane mit einem hohen Deacetylierungsgrad führen zu einer schnelleren und besseren Bindung [Gaserod et al. 1998]. Die Durchmesser der so hergestellten Chitosane liegen meist zwischen 500 und 1500 μm .

2.4.2 DNA-Vakzinierung

Die meisten derzeit eingesetzten Virusimpfstoffe bestehen aus replikationsfähigen, attenuierten (abgeschwächten) oder aus inaktivierten Viren. Impfungen mit attenuierten Viren sind im allgemeinen wirksamer als die mit inaktivierten. Ihr Vorteil besteht darin, dass sie im Gegensatz zu den inaktivierten Vakzinen nicht nur eine effektive humorale, sondern auch die cytotoxische, zelluläre Abwehr aktivieren. Durch die Produktion von Proteinen im Cytosol können letztendlich Peptide aus viralen Antigenen durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert wer-

den, was zur Bildung von cytotoxischen CD8-T-Zellen führt. Allerdings besteht die Gefahr, dass jeder Lebendimpfstoff bei immunsupprimierten Personen tödliche, systemische Infektionen hervorrufen kann. Attenuierte Polioviren können aber auch bei Kindern mit einem angeborenem Mangel an Immunglobulin gefährlich werden, die die Vakzine nicht aus dem Darm beseitigen können. Weil sich das Virus auch beim immunkompetenten Impfling wochenlang in der Darmschleimhaut repliziert, kann es zu Mutarotationen in dem Virus kommen, welche diesem wieder seine Virulenz zurückverleihen. Durch einen gentechnischen Eingriff, die In-vitro-Mutagenese spezifisch viraler Gene, kann diese Risiko theoretisch minimiert werden [Janeway und Travers 1997].

Vakzine gegen viele intrazelluläre Organismen, für deren Abwehr die zelluläre Immunantwort notwendig ist, beispielsweise Tuberculose, Malaria oder HIV, sind noch nicht erhältlich oder noch recht uneffektiv. Eine Hoffnung bietet die Vakzinierung mit Hilfe von DNA, die spezielle Gene des Virus kodiert und sowohl die humorale als auch die zelluläre Abwehr aktivieren kann. Ein typischer Aufbau einer Plasmid-DNA ist in der Abb 2.8 dargestellt. Sie ist für eine optimale Expression in eukaryonten Zellen zusammengestellt.

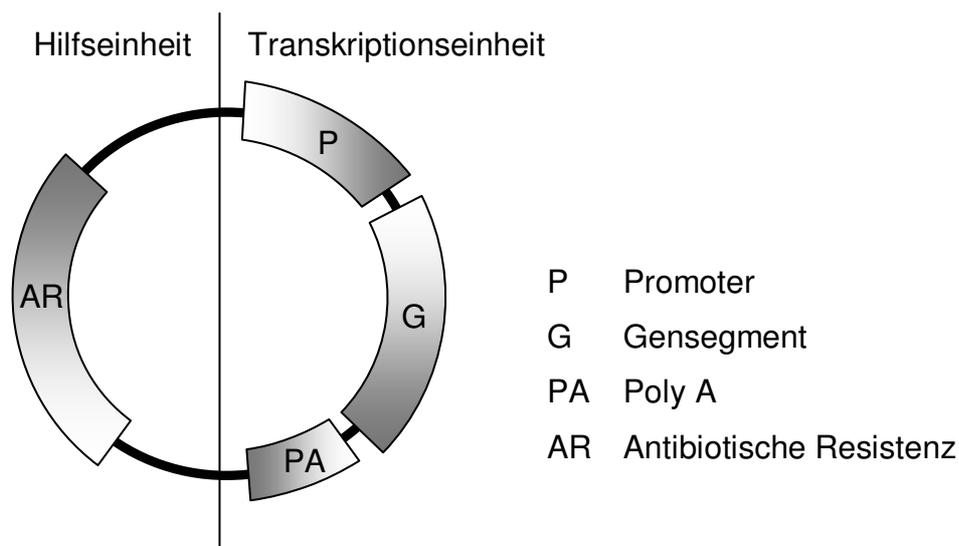


Abb. 2.8 Schematische Darstellung eines Plasmid-DNA-Vektors

Die Transkriptionseinheit setzt sich aus einem starken Promoter, dem Gen, das die Information der relevanten Virusbestandteile enthält und dem Poly A-Segment zusammen, das hauptsächlich für den Transport aus dem Zellkern und die Bindung an den Ribosomen verantwortlich ist und die Transkription terminiert. Auf der Hilfseinheit findet man das Segment, das bei der Produktion der Plasmid-DNA eine antibiotische Resistenz gewährleistet. Zusätzlich sind dort auch spezifische Nukleotide, sogenannte Cytidin-Phosphat-Guanosin-Motive (CpG) eingefügt, die die Immunabwehr durch Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen unterstützen [Gurunathan et al. 2000]. Bei den in der Entwicklung befindlichen Miniplasmiden wird die Hilfseinheit herausgeschnitten und die freien Enden zum Schutz und zur Erhaltung der Lesbarkeit kovalent verschlossen [Wittig 2002].

Das Prinzip der DNA-Vakzinierung beruht auf dem, dass in ein Bakterioplasmid ein Genabschnitt eingeführt wird, der das Antigen kodiert. Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die zu einer Produktion und Präsentation der gewünschten Antigene und letztendlich zu einer Immunantwort führen (Abb. 2.9). Wird die Plasmid-DNA von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, wie zum Beispiel von dendritischen Zellen, führt dies nach der Einführung in das Zellgenom zu einer Produktion des kodierten Proteins im Zytoplasma. Ein Teil des Proteins wird durch zytoplasmatische Proteasen, vor allem durch das Proteasom fragmentiert. Die Peptidfragmente werden in das endosomatische Reticulum (ER) transportiert, wo sie an MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) des Typs I binden. Diese werden an die Zelloberfläche transportiert, wo die an das MHC-I-Molekül gebundenen Peptidfragmente cytotoxische CD8-T-Zelle aktivieren (endogener Weg ①). Die Beladung der MHC-II-Moleküle mit endogenen Peptiden im ER ist dagegen durch ein Protein (die „invariante Kette“) blockiert und nur in Ausnahmefällen möglich [Zinkernagel 2002]. Werden die Proteine hingegen über einen exogenen Weg aufgenommen, können sie nach Degradation in sauren, proteasenreichen

Vesikeln MHC-II-Moleküle binden und sich nach Wanderung an die Zellmembran den CD4-T-Zellen präsentieren ②. Diese wiederum aktivieren Makrophagen und B-Zellen und vermitteln damit die Produktion von Antikörpern.

Bei der subcutanen oder intramuskulären Injektion von Plasmid-DNA wird diese von den somatischen Zellen (z.B. Myozyten oder Keratinozyten) aufgenommen. Nach der Produktion der Proteine werden diese ausschließlich an MHC-I-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche den CD8-T-Zellen präsentiert ③.

Die von den somatischen Zellen produzierten Proteine können auch über den extrazellulären Weg von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden und so den CD4-T-Zellen präsentiert werden. Eine MHC-I restingierte T-Zell-Aktivierung, das sogenannte Cross-Priming ④, ist umstritten [Zinkernagel 2002].

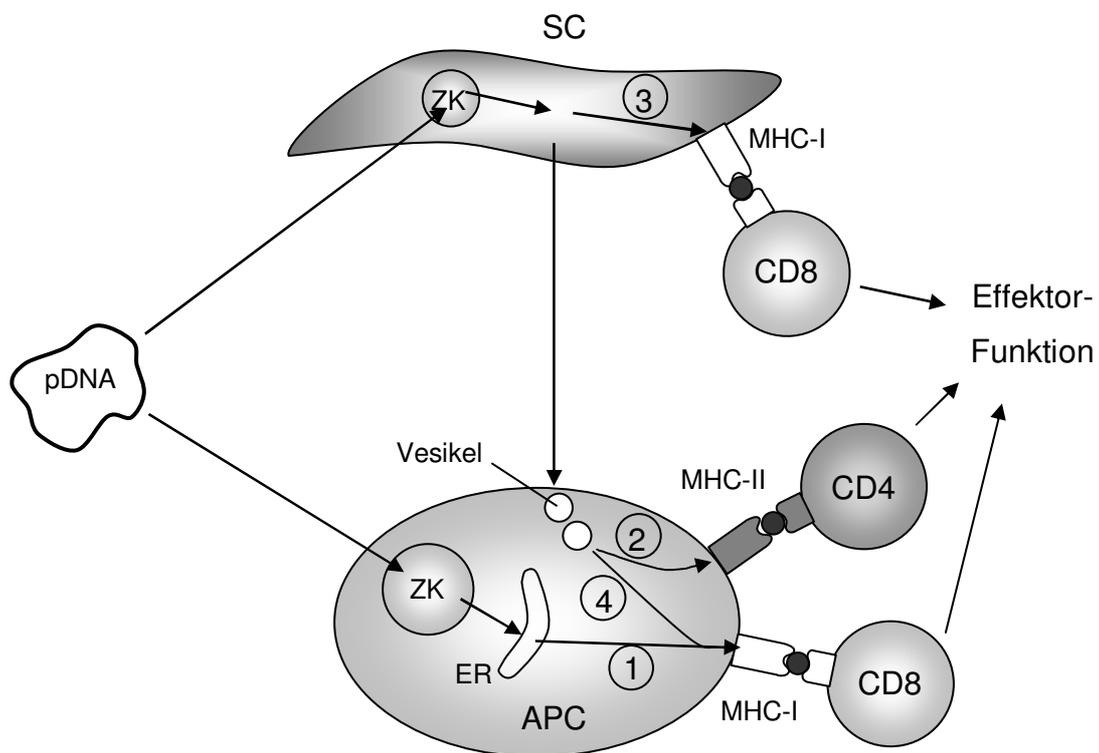


Abb. 2.9 Mechanismen der Antigenpräsentation nach einer DNA-Immunisierung

Eine Übersicht der Vor- und Nachteile der klassischen Vakzinierungsprinzipien und der DNA-Vakzinierung ist in der Tab. 2.1 zusammengestellt worden. Die Hauptvorteile der DNA-Vakzinierung liegen zum einen in der zellulären Immunantwort über CD4- und CD8-T-Zellen und einer sehr hohen Sicherheit bei der Anwendung. Zum anderen können diese Vakzine relativ einfach und kostengünstig produziert werden. Eine Kühlung während der Lagerung und des Transportes ist nicht unbedingt notwendig.

Tab. 2.1 Vergleich verschiedener Vakzinierungsprinzipien (nach Gurunathan et al. 2000)

	DNA-Vakzine	Lebendimpfstoff	Totimpfstoff, Proteine
Immunantwort			
humoral (B-Zellen)	+++	+++	+++
zellulär (CD4 ⁺)	+++	+/-	+/-
zellulär (CD8 ⁺)	++	+++	-
Antigenpräsentation	MHC-I, -II	MHC-I, -II	MHC-II
Immun. Gedächtnis			
humoral	+++	+++	+++
zellulär	++	+++	+/-
Herstellung			
einfache Entwicklung und Produktion	++++	+	++
Kosten	+++	+	+
Transport / Lagerung	+++	+	+++
Sicherheit	+++	++	++++

Die benötigten Mengen für einen ausreichenden Immunschutz sind bei der Verwendung von nackter DNA relativ hoch. Bei Mäusen sind mindestens 2 bis 3 Dosen à 25 bis 100 µg nötig. Bei Versuchen am Menschen mit einer DNA, die

ein Malria-Antigen codierte, wurden für eine ausreichende Immunantwort Dosen zwischen 500 – 2500 µg benötigt [Wang et al. 1998]. Ein Grund für die hohen notwendigen Dosen ist der schnelle Abbau von DNA durch extrazelluläre Desoxyribonukleasen und die schlechtere Aufnahme in Zellen aufgrund der hohen negativen Ladung [Perez et al. 2001]. Durch den Einsatz von partikulären Transportsystemen konnte die Effektivität der DNA-Vakzinierung gesteigert werden [O'Hagan 2002]. Partikel mit inkorporierter oder auf der Oberfläche adsorbierter DNA unter 10 µm bieten zum einen Schutz gegen Nukleasen und werden zum anderen von immunkompetenten Zellen gut aufgenommen [Hedley 2002]. Dabei binden die mit DNA beladenen, positiven Partikel an membrangebundenen Proteoglycane und werden über Endozytose in die Zelle transportiert. Ein Teil der DNA gelangt in den Zellkern und wird dort transkribiert [Mislick und Baldeschieler 1996, Labat-Moleur et al. 1996]. Singh et al. [2000] beobachteten bessere Immunantworten bei der Verwendung von positiv geladenen Polylactid-co-glycolid-Nanopartikeln als bei Mikropartikeln. Die Effekte von oberflächenadsorbierter DNA waren signifikant besser als die von inkorporierter DNA, die schon bei der Partikelbereitung zugeführt werden musste. Die angewandte Lösungsmittelverdampfungsmethode in Methylenchlorid führte zu einem Verlust von superhelikaler DNA [O'Hagan et al. 2001].

Chitosanpartikel sind einfach und unter milden Bedingungen herzustellen. Auf ihrer positiv geladenen Oberfläche lässt sich Plasmid-DNA gut komplex binden. Für die parenterale Applikation eignen sich Verfahren, bei denen auf toxische Quervernetzer wie Glutaraldehyd oder organische Lösungsmittel verzichtet werden kann. Eine einfache Methode ohne organische Lösungsmittel benutzten Mao et al. [1996]. Sie mischten eine essigsäure Lösung von langkettigem Chitosan mit einer Lösung aus DNA und Natriumsulfat und stellten so Nanopartikel mit einem Durchmesser zwischen 200 und 500 nm her. In einer In-vitro-Untersuchung an Nierenepithelzellen vom Typ 293 fanden sie im Vergleich zur reinen DNA eine um vier Logarithmenstufen höhere Luciferaseaktivität. Lösli-

che Komplexe aus Chitosan und DNA blieben hingegen ineffektiv. 1997 modifizierten Mao et al. die Nanosphären mit Transferrin und Polyethylenglycol, was jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung der Transfektion führte. Allerdings konnte durch den Polyethylenglycol-Zusatz eine Aggregation der Partikel verhindert werden. Mac Laughlin et al. [1998] stellten mit salpetriger Säure kurzkettige Chitosane bis minimal 7 kDa her und komplexierten diese mit Plasmid-DNA. Bei der In-vitro-Transfektion von Cos-1-Zellen beobachteten sie bei den langkettigen Chitosanen eine bessere Luciferaseaktivität. Die kurzkettigen Chitosane bildeten bei dieser Herstellungsmethode keine stabilen Komplexe, sodass sich deren Ergebnis von dem der freien DNA nicht unterschied. Cui und Mumper [2001] stellten durch eine komplexe Koazervation von Chitosan mit Carboxymethylcellulose Nanopartikel für eine topische Immunisierung her. Kurzkettiges und langkettiges Chitosan eigneten sich hierbei für die Herstellung stabiler Träger. Plasmid-DNA wurde entweder mit den Partikeln gefällt oder nachträglich an der Oberfläche adsorbiert. Nach topischer Applikation an Mäusen wurde eine sehr starke Streuung der Ergebnisse beobachtet. Einige Hautzellen zeigten gar keine Reaktion. Im Mittel führten sie jedoch zu einer gleich hohen Luciferaseexpression.

Weiterhin ist die Suche nach einem geeignetem Transportsystem für die Vakzination mittels Plasmid-DNA nicht abgeschlossen. Kurzkettige Chitosane wurden bisher kaum als Träger eines solchen Vakzinierungsprinzips untersucht. Sie bieten im Vergleich zu den langkettigen Chitosanen eine sehr hohe Biokompatibilität und eine gute Abbaubarkeit. Einige Herstellungsmethoden der Mikro- und Nanopartikel kommen im Gegensatz zu den bisher gut untersuchten Polylactid-co-glycolidpartikeln ohne toxische Lösungsmittel und kationische Tenside aus, sodass kurzkettige Chitosane interessante Perspektiven bieten können.

3 Experimenteller Teil

3.1 Herstellung von kurzkettigen Chitosanen

3.1.1 Einleitung

Tierversuche haben die Vorteile von kurzkettigen Chitosanen bei der parenteralen Applikationen hinsichtlich ihrer besseren Verträglichkeit und Bioabbaubarkeit gegenüber den langkettigen Chitosanen gezeigt [Richardson et al. 1997]. Es ist daher von großem Interesse, für die Herstellung und Untersuchung von parenteralen Systemen, die Chitosan als Hilfsstoff enthalten sollen, Chitosane mit unterschiedlichen Molekulargewichten aus handelsüblichem Material möglichst einfach und gezielt herzustellen. Die bisher einfachste und kostengünstigste Methode ist die saure Hydrolyse [Hwang et al. 2002]. Die Depolymerisation mit Hilfe von Salzsäure bietet sich hierfür an, da im Gegensatz zu der weit verbreiteten Methode mit salpetriger Säure keine störenden Nebenprodukte entstehen, und das Chitosanmolekül auch am reduzierenden Ende erhalten bleibt (vgl. Abb. 3.19, S. 73). Die hierbei mögliche Deacetylierung, ist für den Einsatz als Träger für Plasmid-DNA sehr hilfreich, da mehr positive Ladungen für eine ionische Bindung zur Verfügung stehen und durch ein höheres Zetapotential stabilere Partikelsuspensionen zu erwarten sind, die von Zellen besser phagozytiert werden können [Tabata und Ikada 1988].

Bei der sauren Hydrolyse sind die Größen Zeit, Temperatur und Säurekonzentration zu berücksichtigen, die die Spaltung maßgeblich beeinflussen. Eine genaue statistische Auswertung über den Einfluss aller Variablen auf das entstehende Molekulargewicht, wie auch sinnvolle Grenzwerte der Größen wurden bisher noch nicht gezeigt. Ebenfalls wurden die Molekulargewichtsverteilungen meist außer acht gelassen. Eine enge Distribution ist jedoch für die Beurteilung von Auswirkungen wichtig, die mit der Molmasse in Zusammenhang gebracht

werden sollen, da sonst nicht mit Sicherheit geklärt werden kann, welcher Anteil für die beobachteten Effekte tatsächlich verantwortlich ist. Eine nachträgliche Auftrennung von stark polydispersen Systemen, die meist säulenchromatographisch erfolgt, wäre sehr aufwendig und kostenintensiv.

3.1.2 Methode 1

Üblicherweise wird das Chitosan, das in konzentrierter Salzsäure unlöslich ist, in der gewünschten Säurekonzentration dispergiert und eine bestimmte Zeit bei einer gewählten Temperatur meist unter Rückfluss hydrolysiert. Danach wird die Suspension schnell abgekühlt und mit einer Base wie zum Beispiel Natronlauge neutralisiert, filtriert und der Filterkuchen mehrfach mit deionisiertem Wasser gewaschen, um die entstandenen Salze zu entfernen. Die Trocknung wird entweder bei 60 °C durchgeführt, wodurch eine zähe Masse entsteht, die wiederum zerkleinert und gesiebt werden muss [Rege und Block 1999] oder mit Hilfe der Gefriertrocknung [Varum et al. 1994]. Die Ausbeute gaben Rege und Block mit durchschnittlich 65 % an.

In der ersten Versuchsreihe wurde nach dieser Methode Chitosan hydrolytisch gespalten. Hierfür wurde genau 1,0 g Chitosanbase der Charge TD127 eingewogen und in 100 ml vortemperierter Salzsäure unter Rückfluss hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach Ablauf der gewünschten Zeit unter Kühlung mit Ammoniumcarbonat neutralisiert und mit einem Polycarbonatfilter filtriert. Da durch das Waschen mit Wasser das gefällte Chitosan quoll, den Filter schnell verstopfte und bei der Trocknung einen zähen Film ergab, wurde stattdessen mehrfach mit Ethanol gewaschen. Außerdem sollte so ein Fortspülen von kurzkettigen, wasserlöslichen Chitooligomeren verhindert werden. Das gereinigte Pulver wurde anschließend bis zur Gewichtskonstanz bei 70 °C getrocknet und im Exsiccator abgekühlt.

Die Molekulargewichtsverteilungen wurden mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie gekoppelten Lichtstremethode (Kap. 6.2.2) bestimmt. Als Aus-

gangsmaterial wurde eine handelsübliche, feinpulvrige Chitosanqualität (Charge TD127) der Firma Primex gewählt, deren Molekulargewicht mit 90 kDa und Deacetylierungsgrad mit 97 % bestimmt wurde. Der Deacetylierungsgrad, der bei besseren Qualitäten generell sehr hoch liegt [Paul und Sharna 2000], wurde in diesem Kapitel nicht berücksichtigt, da sich dieser nur noch unwesentlich nach oben hin veränderte und somit keinen Einfluss auf die beobachteten Größen ausüben konnte.

3.1.3 Ergebnis der Methode 1

In den Abb. 3.1 und Abb. 3.2 sind beispielhaft zwei Molekulargewichtsverteilungen von hydrolysierten Chitosanen dargestellt worden. Die Kurven zeigen das Signal des konzentrations sensitiven Differentialrefraktometers in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Darüber verläuft diagonal der Plot der dazugehörigen Molmassen, ermittelt durch den Lichtstreuendetektor.

Die Charge C18 wurde durch eine einstündige Hydrolyse mit 18 %-iger Salzsäure bei 85 °C hergestellt. Das Ergebnis war eine linksschiefe, bimodale Verteilung des Produktes, dessen mittleres Molekulargewicht bei 15.260 g/mol lag. Die Charge C14 wurde vierzehn Stunden mit einer 18 %-igen Salzsäure bei 85 °C gespalten. Ebenfalls ist eine bimodale Verteilung zu erkennen, deren rechte Schulter höher und linke Schulter niedriger liegt als die der Charge C18. Das mittlere Molekulargewicht wurde mit 8.610 g/mol bestimmt, und Chitosane unter 3.000 g/mol konnten mit Hilfe dieser Methode nicht gewonnen werden. Bei Spaltungen mit konzentrierter Salzsäure und verschiedenen Hydrolysezeiten bis zu 3 Stunden wurden ähnliche Verteilungen wie bei den Chargen C14 und C18 beobachtet. Das mittlere Molekulargewicht von 8.600 g/mol wurde nicht unterschritten. Allerdings fiel nach dem Waschen mit Ethanol weiteres Chitosan im Filtrat aus, dessen mittleres Molekulargewicht mit 2.460 g/mol bestimmt werden konnte.

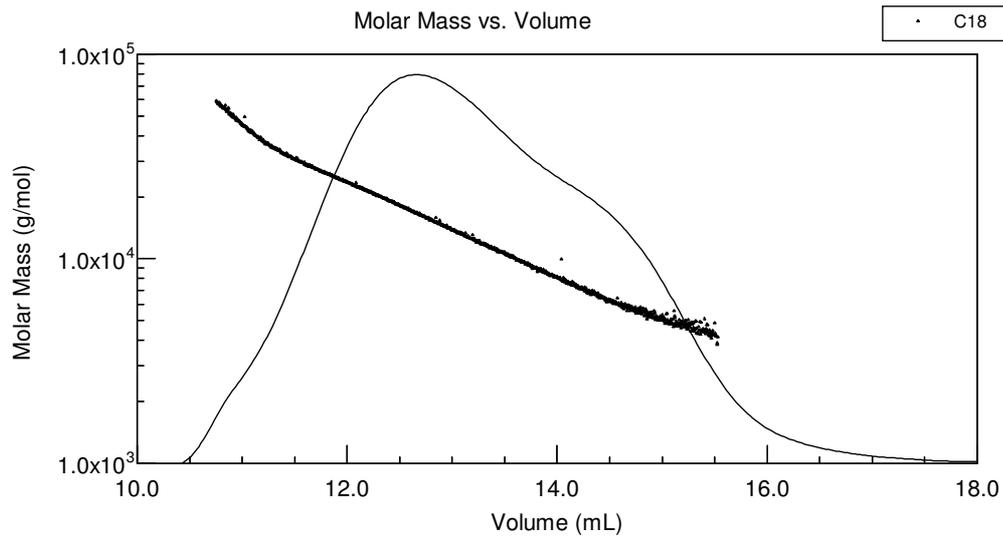


Abb. 3.1 Molekulargewichtsverteilung der Chitosancharge C18

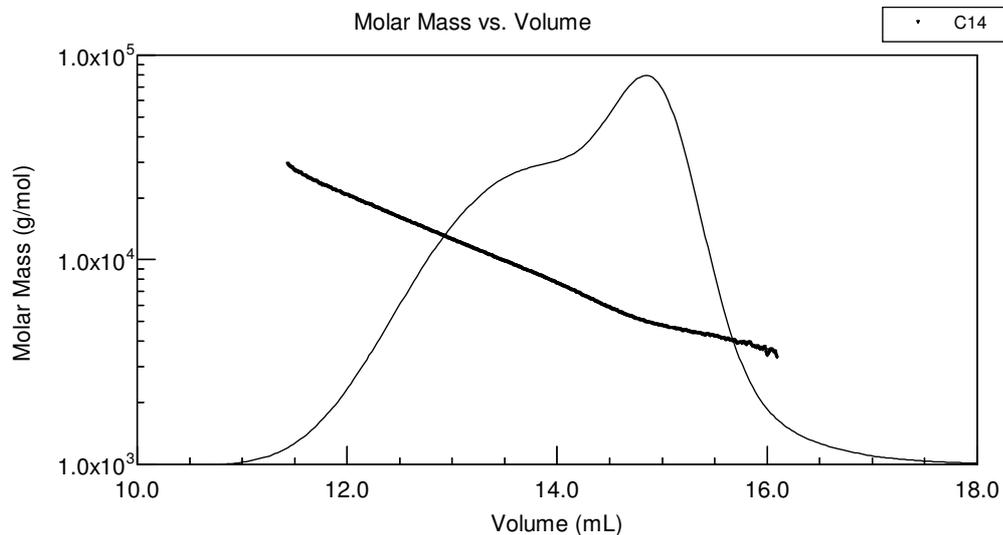


Abb. 3.2 Molekulargewichtsverteilung der Chitosancharge C14

Chitosane werden ab einer bestimmten Kettenlänge abhängig von der Temperatur in konzentrierter Salzsäure löslich. Dies führte dazu, dass nach kurzer Zeit sowohl suspendiertes Chitosan neben gelöstem vorlag. Beide wurden durch die Säure hydrolysiert. Die lösliche Fraktion fiel nach der Neutralisation neben der suspendierten aus, sodass bimodale Verteilungen beobachtet wurden. Chitosane unter 3.000 g/mol blieben selbst nach der Neutralisation noch in Lösung und ließen sich erst durch die Zugabe von Ethanol fällen. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde das Herstellungsverfahren geändert, um engverteilte, kurz-

kettige Chitosane zu erhalten. Zusätzlich sollten die Effekte von Säurekonzentration, Hydrolysezeit und Reaktionstemperatur untersucht werden.

3.1.4 Methode 2

Die zweite Methode unterscheidet sich von den bisherigen Verfahren. Da die Rührgeschwindigkeit auf die Hydrolyse nach Rege und Block und nach eigenen, hier nicht gezeigten Vorversuchen keinen Einfluss auf das Molekulargewicht hat, wurde auf eine Rückflussapparatur mit Rührer verzichtet. Stattdessen wurden jeweils genau 1,000 g der Chitosanbase TD127 in 100,0 ml entsprechend vortemperierter Salzsäure in ein druckfestes Duran[®]-Laborglas gegeben, das Gefäß fest verschlossen und nach Umschwenken in den Wärmeschrank gestellt. Nach Ablauf der Hydrolysezeit wurde die Suspension sofort zentrifugiert, das Zentrifugat über einen Polycarbonatfilter mehrfach mit Ethanol gewaschen, im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet und im Exsikkator abgekühlt (1. Fraktion). Der Überstand wurde mit dem Waschethanol des Filtrates versetzt, worauf kurzkettigeres, in konzentrierten Säuren lösliches Chitosan in feinen Flocken ausfiel. Dieses wurde filtriert, ebenfalls mit Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet (2. Fraktion) (Abb. 3.3). Die Ausbeuten wurden nach dem Trocknen gravimetrisch bestimmt.

Das Verfahren hat zu den üblichen den Vorteil, dass kein Neutralisationsschritt notwendig ist, der bei den angewendeten Konzentrationen stark exotherm verläuft. Die Probe wurde nicht unnötig verdünnt, was sonst den Verlust von leicht löslichen Chitosankomponenten bei der Filtration zur Folge hat, und zu der Entstehung von Salzen führt, die aus dem gefällten Material wieder entfernt werden müssen. Die entwickelte Methode beinhaltet weder einen Zerkleinerungsschritt, noch einen zeit- und energieaufwendigen Gefriertrocknungsprozess. Des Weiteren wurde schon im Vorfeld das in starken Säuren lösliche Chitosan von dem unlöslichen, langkettigerem getrennt, was einen guten Dispersitätsgrad der Produkte erwarten ließ.

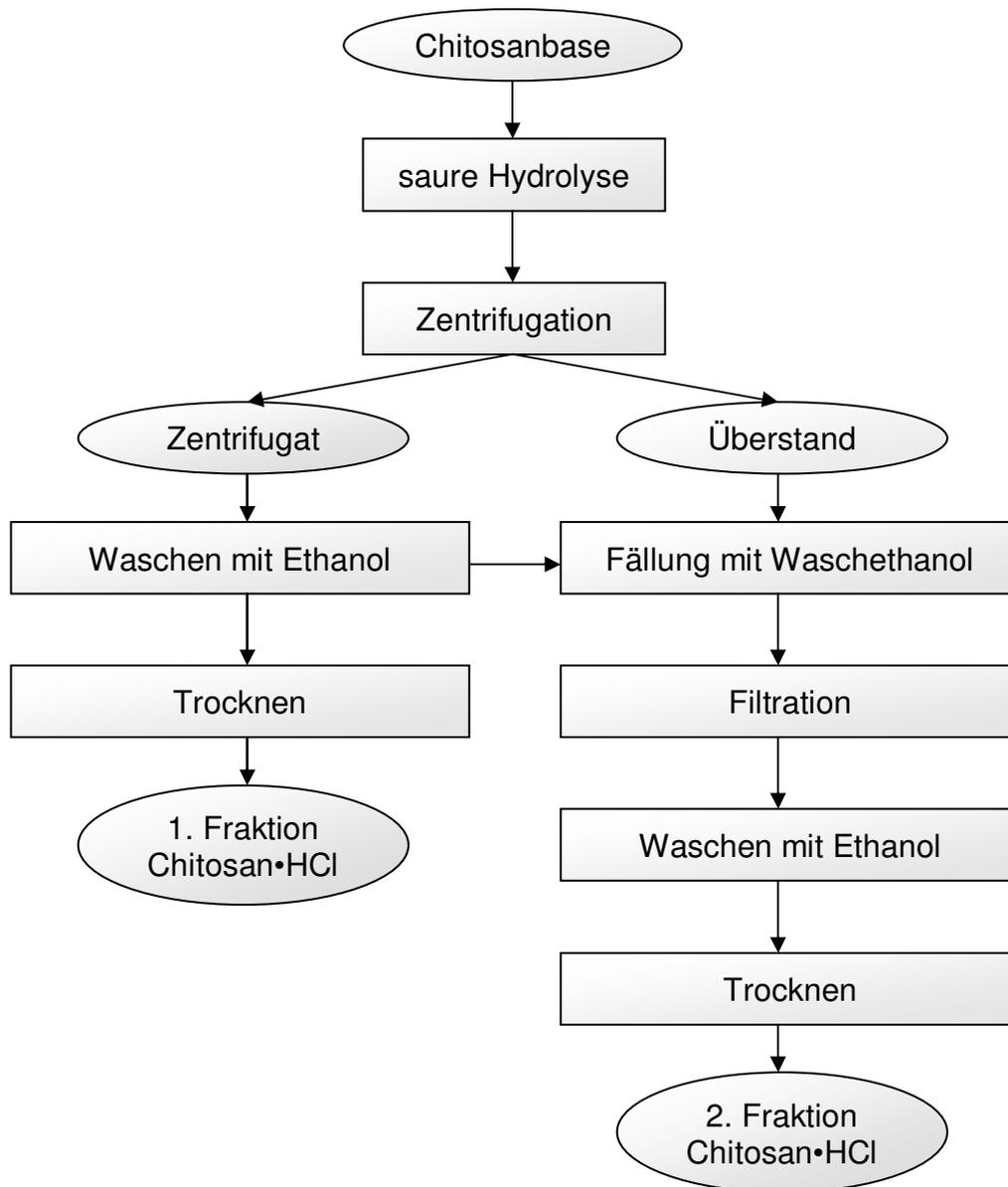


Abb. 3.3 Hydrolyseschema der Methode 2

3.1.5 Statistischer Versuchsplan

Für die Untersuchung der sauren Hydrolyse von Chitosan nach der Methode 2 wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan mit drei Faktoren gewählt, um sowohl die linearen als auch die eventuell vorhandenen quadratischen Beziehungen der Variablen erkennen zu können. Die Säurekonzentration $c(\text{HCl})$, die Temperatur T und die Hydrolysezeit t stellten die unabhängigen Variablen dar. Das massenmittlere Molekulargewicht des säureunlöslichen Anteils $M_w(\text{U})$,

des säurelöslichen Anteils $M_w(L)$, die jeweiligen Massen der Fraktionen $m(U)$ und $m(L)$ und die Polydispersitätsgrade $PD(U)$ und $PD(L)$ wurden als abhängige Beobachtungsgrößen herangezogen. Das Versuchsdesign (Tab. 3.1) enthielt 17 Versuchseinstellungen, welche eine Dreifachwiederholung des Zentralpunktes beinhalteten.

Tab. 3.1 Versuchsdesign zur Hydrolyse von Chitosan

Versuch Nr.	c(HCl) [%]	T [°C]	t [h]
1	18,0	30,0	2,00
2	18,0	30,0	6,00
3	18,0	70,0	2,00
4	18,0	70,0	6,00
5	33,0	30,0	2,00
6	33,0	30,0	6,00
7	33,0	70,0	2,00
8	33,0	70,0	6,00
9	11,4	55,0	4,00
10	36,6	55,0	4,00
11	24,0	21,4	4,00
12	24,0	88,6	4,00
13	24,0	55,0	0,64
14	24,0	55,0	7,36
15 (C)	24,0	55,0	4,00
16 (C)	24,0	55,0	4,00
17 (C)	24,0	55,0	4,00

Die Durchführung der Punkte geschah in nicht geordneter Reihenfolge. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass die Würfelpunkte im Bereich von üblichen Einstellungen lagen und die Sternpunkte (absolute Minima und Maxima) noch sinnvoll ausführbar blieben.

3.1.6 Ergebnisse des Versuchsplanes nach Methode 2

Tab. 3.2 Ergebnisse des Versuchsplanes

Versuch Nr.	$M_w(U)$ [g/mol]	$m(U)$ [mg]	$PD(U)$ M_w/M_n	$M_w(L)$ [g/mol]	$m(L)$ [mg]	$PD(L)$ M_w/M_n	$m(Ges)$ [mg]
1	81.890	1.212	1,81	-	0	-	1.212
2	74.930	1.221	1,85	-	0	-	1.221
3	31.775	1.142	1,65	3.641	5	1,10	1.147
4	21.340	1.160	1,87	2.712	16	1,10	1.176
5	50.465	1.157	1,88	10.140	39	1,91	1.195
6	35.883	1.198	1,54	5.905	25	1,35	1.223
7	10.665	797	1,39	2.709	230	1,26	1.026
8	8.873	672	1,39	2.365	47	1,29	719
9	27.045	1.133	1,57	4.025	22	1,24	1.155
10	10.135	767	1,40	3.378	251	1,38	1.019
11	85.555	1.217	1,84	-	0	-	1.217
12	8.554	929	1,36	2.088	33	1,16	962
13	54.130	1.172	1,72	6.896	13	1,40	1.184
14	22.710	1.180	1,56	3.275	18	1,16	1.197
15 (C)	27.685	1.153	1,52	3.563	17	1,16	1.169
16 (C)	27.410	1.157	1,48	3.603	17	1,18	1.174
17 (C)	25.875	1.168	1,56	3.676	15	1,18	1.183

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tab. 3.2 zusammengefasst worden. Der Polydispersitätsgrad der Ausgangsqualität TD127 betrug 1,76. Durch die Behandlung des Chitosans mit Salzsäure und die Art der Aufbereitung musste bei der maximal erreichbaren Gesamtmasse, entsprechend einer theoretischen Ausbeute von 100 %, die Zunahme des Molekulargewichtes durch die Umwandlung in das Hydrochlorid berücksichtigt werden. Aus 1 g der Chitosanbase TD127 konnten so maximal 1,224 g Chitosanhydrochlorid entstehen.

Man kann erkennen, dass der säureunlösliche Anteil ein minimales Molekulargewicht von rund 8.500 g/mol erreichte. Alle kurzkettigeren Moleküle waren in den benutzten Säurekonzentrationen löslich und fielen erst nach der Zugabe von Ethanol aus. Eine bessere Übersicht erhält man, wenn die Tabellenwerte nach dem Molekulargewicht der unlöslichen Fraktion sortiert und die Wiederholungsversuche 16 und 17 außer acht gelassen werden (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Versuchsergebnisse nach $M_w(U)$ sortiert

Versuch Nr.	$M_w(U)$ [g/mol]	m(U) [mg]	PD(U) M_w/M_n	$M_w(L)$ [g/mol]	m(L) [mg]	PD(L) M_w/M_n	m(Ges) [mg]
11	85.555	1.217	1,84	-	0	-	1.217
1	81.890	1.212	1,81	-	0	-	1.212
2	74.930	1.221	1,85	-	0	-	1.221
13	54.130	1.172	1,72	6.896	13	1,40	1.184
5	50.465	1.157	1,88	10.140	39	1,91	1.195
6	35.883	1.198	1,54	5.905	25	1,35	1.223
3	31.775	1.142	1,65	3.641	5	1,10	1.147
15 (C)	27.685	1.153	1,52	3.563	17	1,16	1.169
9	27.045	1.133	1,57	4.025	22	1,24	1.155
14	22.710	1.180	1,56	3.275	18	1,16	1.197
4	21.340	1.160	1,87	2.712	16	1,10	1.176
7	10.665	797	1,39	2.709	230	1,26	1.026
10	10.135	767	1,40	3.378	251	1,38	1.019
8	8.873	672	1,39	2.365	47	1,29	719
12	8.554	929	1,36	2.088	33	1,16	962

Es wird deutlich, dass mit abnehmendem Molekulargewicht des unlöslichen Anteils der Dispersitätsgrad zuerst im Vergleich zum Ausgangsmaterial leicht ansteigt, was durch das Einsetzen der Hydrolyse zu erklären ist. Hier liegt wenig gespaltenes neben dem noch ungespaltenen Chitosan vor. Dies ist erkennbar in

den leicht linksschiefen Verteilungskurven von V11 und V2 in Abb. 3.4.

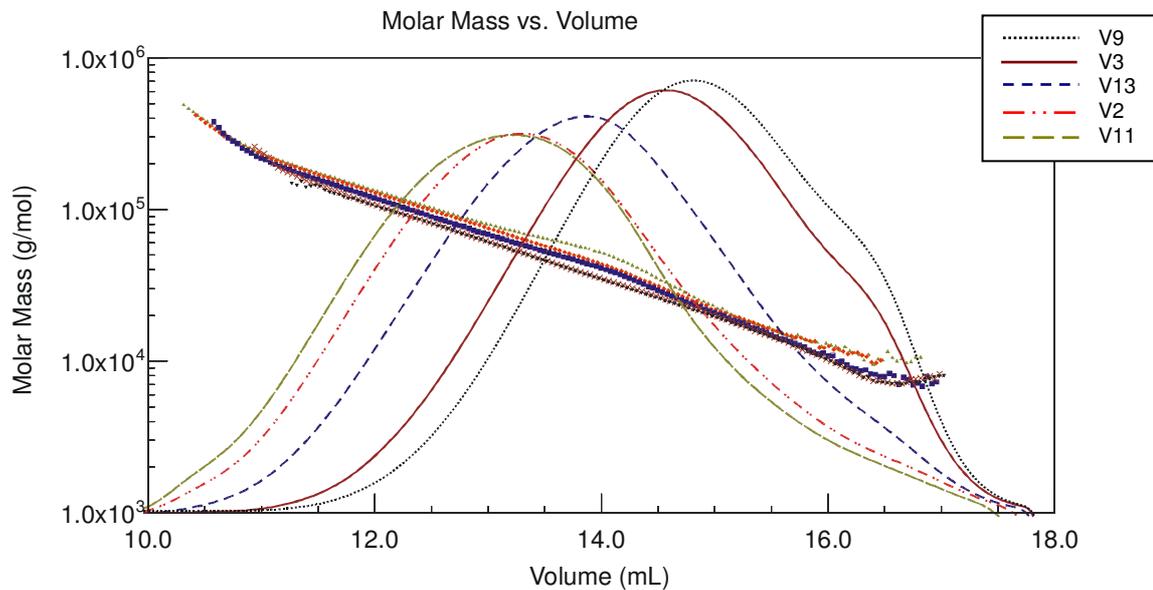


Abb. 3.4 Molekulargewichtsverteilungen der Säure unlöslichen Fraktionen

Bei weiterer Depolymerisation verschieben sich die Maxima nach rechts, und die Polydispersitätsgrade sinken, während sich die minimal erreichbaren Molmassen nicht ändern, da die kurzkettigeren Chitosane in Lösung bleiben und erst in der zweiten, ethanolischen Fraktion ausfallen.

In Abb. 3.5, der kumulativen Auftragung der Molmassen, sieht man bei weiterer Abnahme des Molekulargewichtes auch bei der mit Ethanol gefällten Fraktion einen sinkenden Dispersitätsgrad. Jedoch ist nur bei den Versuchen 7 und 10 eine annehmbare Ausbeute an kurzkettigen Chitosanen bei einer leicht breiteren Molmassenverteilung entstanden (Tab. 3.3). Chitosane unter 1.000 g/mol wurden mit dieser Methode nicht erhalten und blieben auch nach der zweiten Fällung in Lösung. Wie an den Gesamtausbeuten gut erkennbar ist, entstanden sie nur in geringem Maße, und sind auch aufgrund ihrer geringen Neigung zur Bildung unlöslicher Komplexe für die Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln und zum Transport von Plasmiden weniger geeignet.

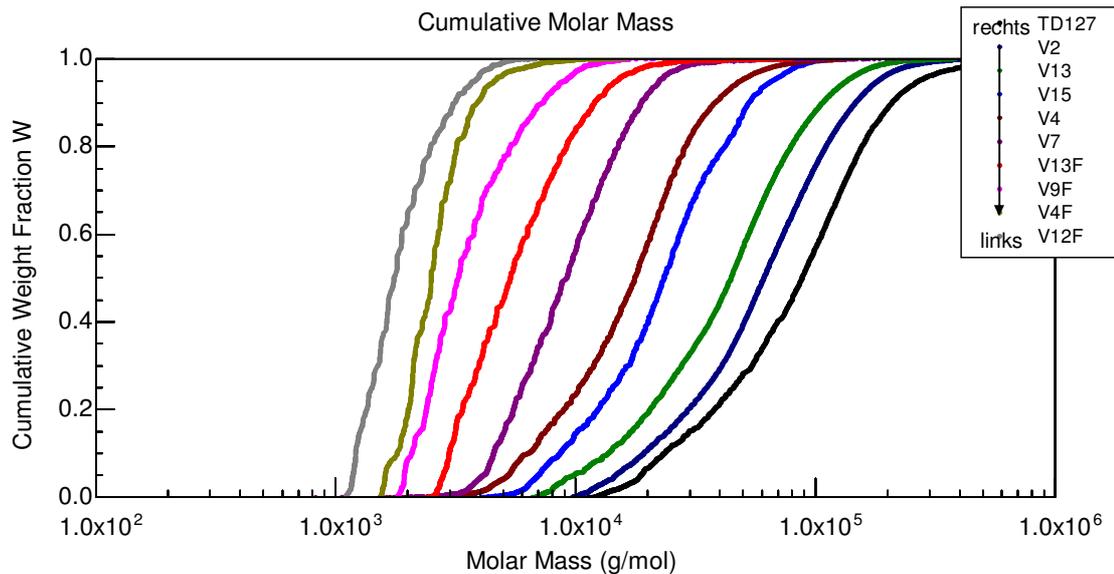


Abb. 3.5 Kumulative Molekulargewichte beider Fraktionen

3.1.6.1 Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf das Molekulargewicht der ersten Fraktion

Um die Einflüsse der Variablen genauer betrachten zu können, war eine statistische Auswertung notwendig. Zuallererst wurde die Verteilung der Residuen untersucht. Sie stellen die Differenz zwischen den durch das Modell prognostizierten Werten und den beobachteten Werten dar. Nur wenn die Werte des Residuenplots bzw. Normalverteilungsplots auf einer Geraden liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die Residuen normalverteilt sind und weitere statistische Betrachtungen vorgenommen werden können. Die Auswertung der Molekulargewichte der säureunlöslichen Fraktion in Abhängigkeit von der Zeit, der Temperatur und der Konzentration der eingesetzten Salzsäure ergab ein Bestimmtheitsmaß von 0,972 und einen mit den Freiheitsgraden korrigierten Wert von 0,937. Für eine noch bessere Korrelation wurde eine Box-Cox-Transformation durchgeführt, um möglichst fehlerfrei die weiteren Auswertverfahren für normalverteilte Grundgesamtheiten ausführen zu können. Mit einem Lambda-Wert von -0,44 wurden die neuen Werte nach der Gleichung 3.1 transformiert:

$$M_w(U)Trans = \frac{1}{\sqrt{M_w(U)}} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

In der Abb. 3.6 wurde der Residuenplot der transformierten Werte ($M_w(U)Trans$) dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,988, der korrigierte Korrelationskoeffizient 0,973, Ausreißer waren nicht zu verzeichnen, sodass mit hoher Genauigkeit die Effekte ermittelt werden konnten.

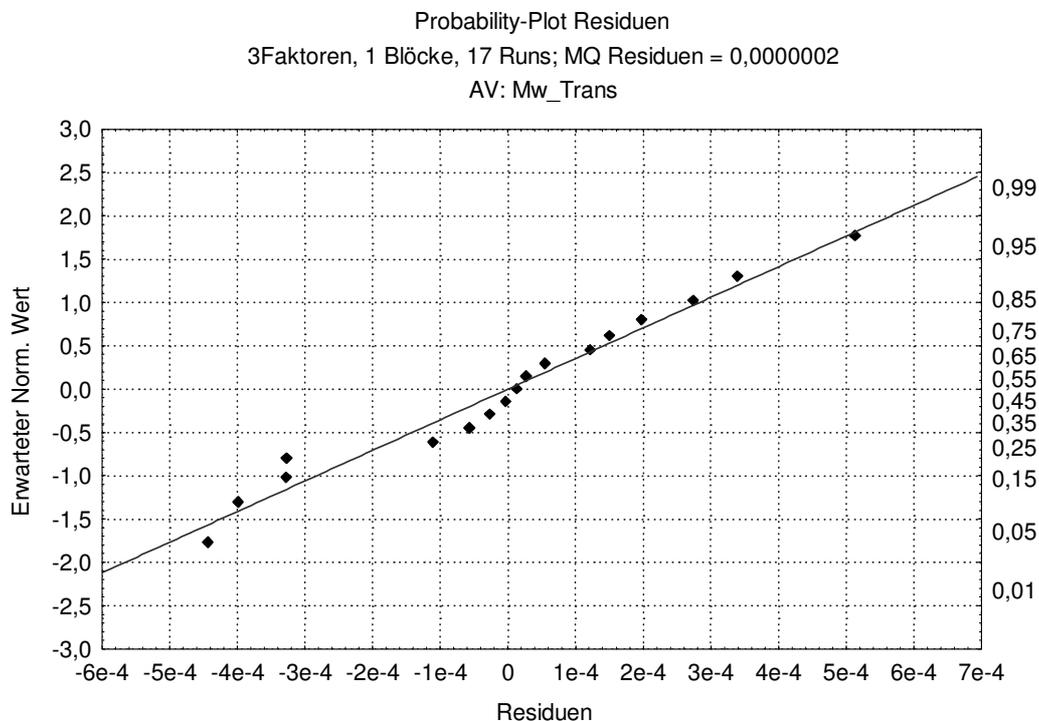


Abb. 3.6 Residuenplot der transformierten Molmassen $M_w(U)Trans$

Im Paretdiagramm (Abb. 3.7) sind alle linearen (L) und quadratischen (Q) Haupteffekte und deren Produkte dargestellt. Das p-Niveau wurde auf 0,01 gesetzt. Alle Effekte, die über das p-Niveau herausragen haben mit 99%-iger Wahrscheinlichkeit einen signifikanten Einfluss auf das Molekulargewicht der ersten Fraktion.

Die Temperatur zeigt den größten, signifikanten, linearen Effekt auf die Ketten-

länge bei der Spaltung von Chitosan in der ersten Fraktion. Darauf folgt ein linearer aber auch ein quadratischer Zusammenhang der Salzsäurekonzentration. Die Zeit hingegen hat zwar unter Rücksichtnahme der Grenze für einen p-Wert von 0,005 bei 4,03 sogar einen hoch signifikanten, aber nur sehr geringen, linearen Effekt auf das Molekulargewicht des Hydrolyseproduktes.

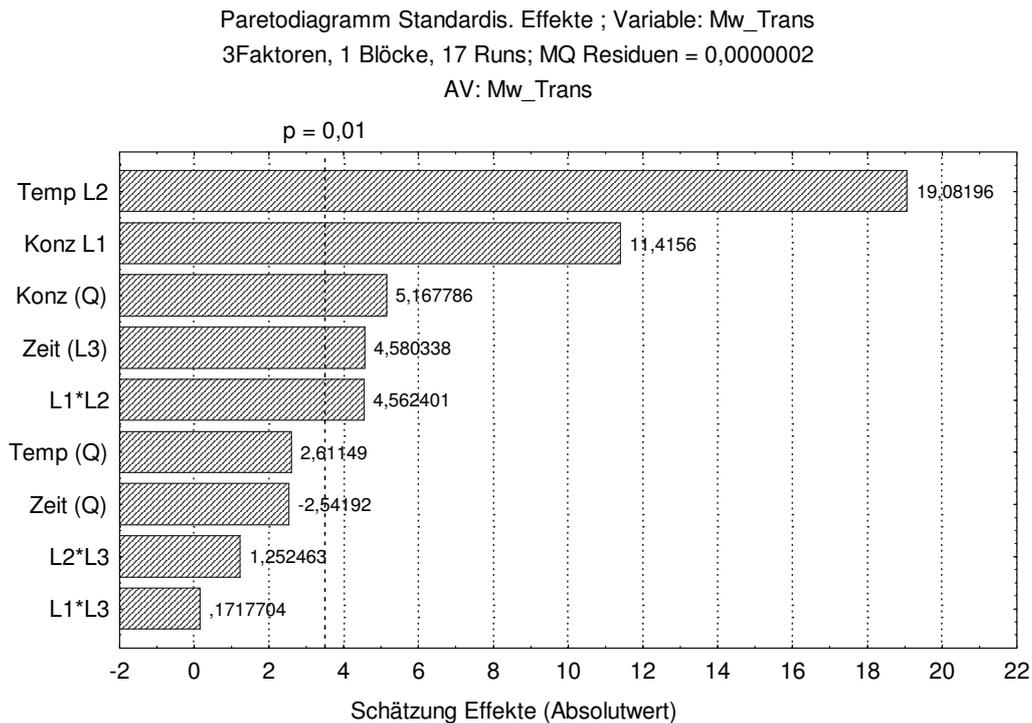


Abb. 3.7 Paretdiagramm der Effekte für $M_w(U)Trans$

Da zum Teil auch quadratische Effekte einen Einfluss haben, ist es von Interesse, sich die Profile der Prognosewerte anzuschauen. In Abb. 3.8 sind diese für die zentralen Werte dargestellt. Jede Grafik zeigt den Einfluss einer unabhängigen Variablen auf die reziproke Quadratwurzel des Molekulargewichtes ($M_w(U)Trans$) bei feststehenden Zentralwerten der anderen beiden unabhängigen. In der mittleren Grafik ist der nahezu lineare Zusammenhang der Temperatur sehr gut erkennbar. In der linken Grafik sieht man den sowohl linearen als auch den quadratischen Anteil der Säurekonzentration. Es wird deutlich, dass bei diesen Einstellungen erst ab einer Konzentration von rund 25 % HCl das

Molekulargewicht signifikant beeinflusst wird. Aus der rechten Grafik kann man entnehmen, dass eine Hydrolysezeit von mehr als 4 Stunden das mittlere Molekulargewicht in der ersten Fraktion nicht signifikant weiter senkt. Ein Hinweis dafür, dass zu diesem Zeitpunkt bei einer Temperatur von 52,6 °C und einer Säurekonzentration von 24,7 % das Minimum von säureunlöslichem Chitosan entstanden ist und nur noch säurelösliches entsteht, das in der zweiten Fraktion ausfällt.

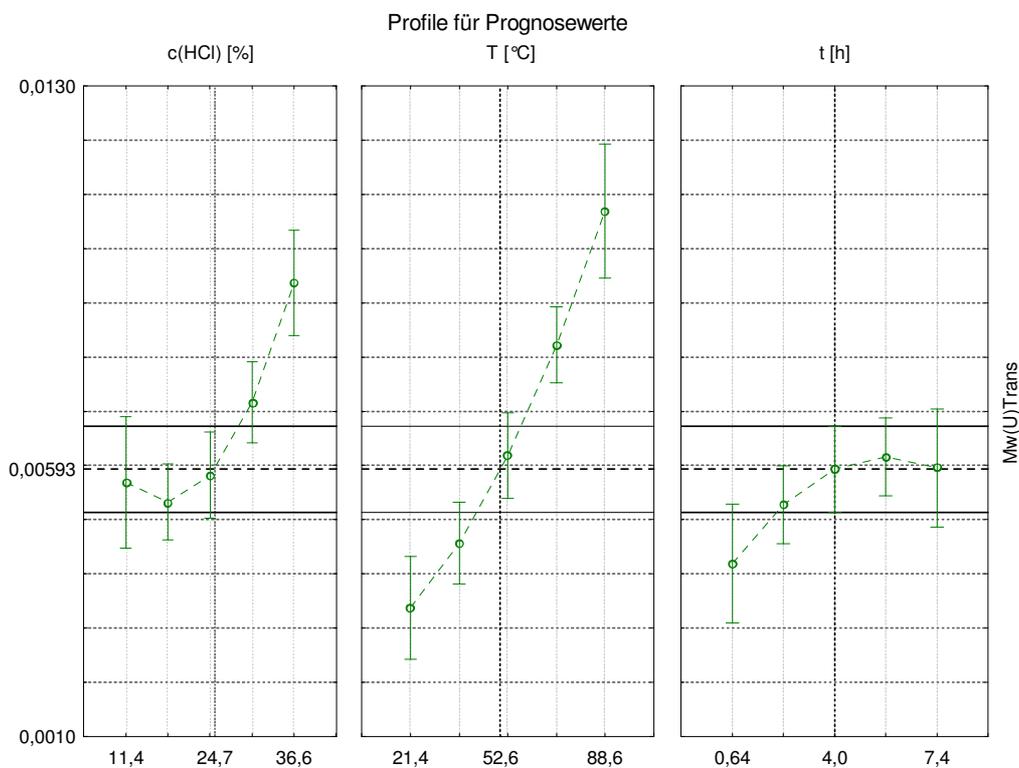


Abb. 3.8 Profile für Prognosewerte von $M_w(U)_{Trans}$ für die Zenralpunkte

Für die Hydrolyse von Chitosan scheint es also sinnvoll, eine möglichst hohe Säurekonzentration von mehr als 24,6 % bei gleichzeitig hoher Temperatur zu benutzen. Diese gegenseitige, positive Beeinflussung beider Faktoren wird durch die Signifikanz deren Produkt in Abb. 3.7 und in der dreidimensionalen Darstellung (Abb. 3.9) deutlich.

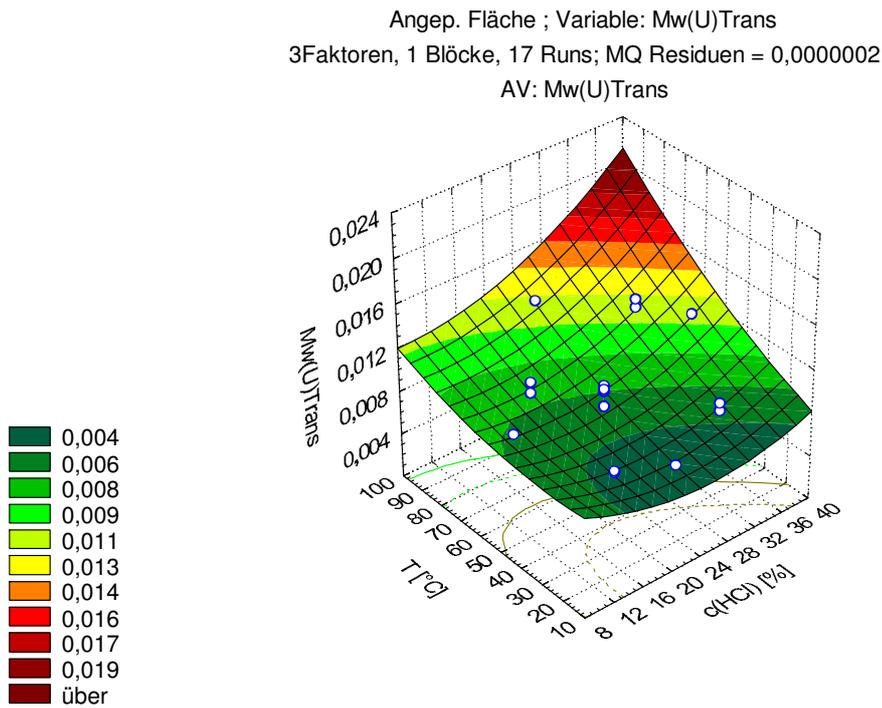


Abb. 3.9 Einfluss von Temperatur und Konzentration auf $M_w(U)Trans$ bei einer Hydrolysezeit von 4 Stunden

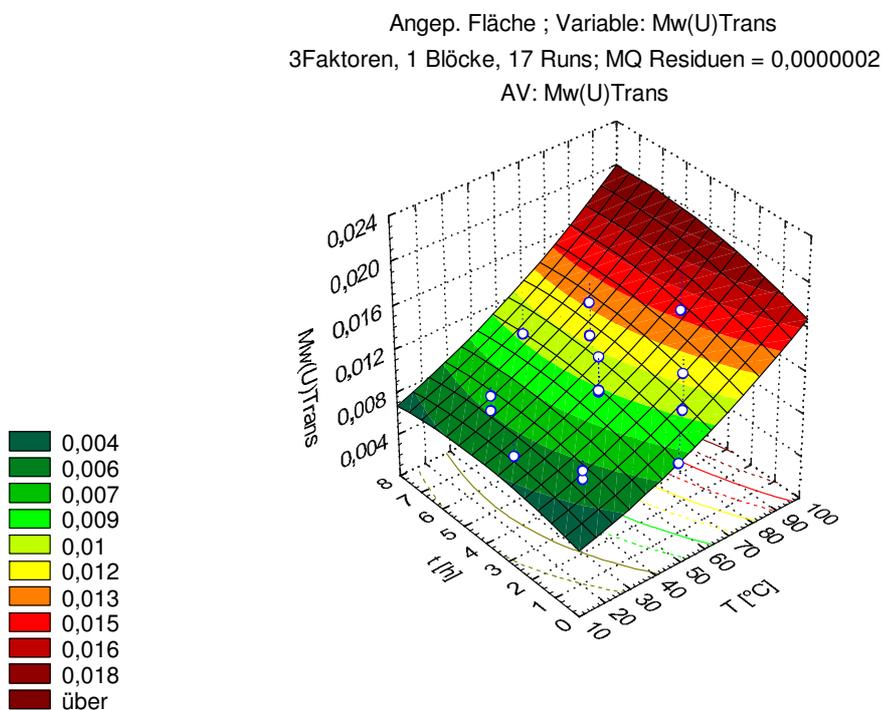


Abb. 3.10 Einfluss von Temperatur und Zeit auf $M_w(U)Trans$ bei einer Säurekonzentration von 36,6 %

Es ist jedoch nicht sinnvoll, zur Herstellung von kurzkettigen Chitosanen der ersten Fraktion eine Hydrolyse von mehr als 4 Stunden durchzuführen. Dies ändert sich auch nicht bei maximaler Säurekonzentration durch den Einfluss der Temperatur (Abb. 3.10). Die Hydrolyse ist folglich ein sehr schneller Prozess, sodass in kürzester Zeit Chitosane mit einem mittleren Molekulargewicht von über 8.500 Dalton hergestellt werden können.

Auf der anderen Seite geht aus der Abb. 3.10 hervor, dass Chitosan bei Raumtemperatur relativ stabil bleibt und selbst in konzentrierter Säure hydrolytisch kaum zersetzt wird.

Die Molmassenverteilung nimmt, wie in Abb. 3.5 gut erkennbar, mit der mittleren Molmasse ab und ist so wie diese von der Temperatur und der Säurekonzentration abhängig. Allerdings sind hier die Streuungen etwas höher, sodass besser von Trends als von signifikanten Auswirkungen gesprochen werden sollte.

3.1.6.2 Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf die Ausbeute der ersten Fraktion

Für die Ausbeute der Säure unlöslichen Fraktion ($m(U)$) wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,982, ein korrigierter Wert von 0,960 und ein Lamda-Wert von 1,999 gefunden, sodass von einer Normalverteilung auszugehen ist, und die Massen nicht transformiert werden müssen. Die Konzentration zeigt zusammen mit der Temperatur die größten negativen, linearen, signifikanten Effekte. Bei der Konzentration sind wie schon bei der Betrachtung der entstehenden Molmassen zusätzlich signifikante, quadratische Anteile entscheidend. Diese Parallelität lässt sich durch das rasche Entstehen von kurzkettigeren Chitosanen bei hoher Temperatur in konzentrierter Salzsäure erklären, die erst in der zweiten Fraktion ausfallen. Die Zeit hat demnach ebenfalls in dem betrachteten Zeitrahmen von 38,4 Minuten bis 7,4 Stunden so gut wie keinen Einfluss.

3.1.6.3 Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf das Molekulargewicht der Säure löslichen Fraktion

Das Bestimmtheitsmaß und der korrigierte Wert für die Molekulargewichte der zweiten Fraktion ($M_w(L)$) betragen 0,995 und 0,984. Die Residuen liegen hier normalverteilt vor und müssen nicht umgewandelt werden. Das Paretdiagramm (Abb. 3.11) zeigt wie für die erste Fraktion einen starken, linearen Einfluss der Temperatur. Die Zeit und das Produkt aus Zeit und Temperatur üben jedoch im Gegensatz dazu auch große signifikante Effekte auf das Molekulargewicht der mit Ethanol gefällten Chitosane aus. Die Konzentration hat offensichtlich keinen signifikanten Einfluss mehr, nur eine kleine Tendenz ist bei hohen Temperaturen zu erkennen (Abb. 3.12). Die Kettenlänge der Fragmente wird somit bei der Hydrolyse der gelösten, kurzkettigen Chitosane nur durch die von der Temperatur verursachten Molekülbewegungen maßgeblich beeinflusst.

Akzeptable Ausbeuten sind jedoch nur bei höheren Säurekonzentrationen zu beobachten, sodass eine Betrachtung der Einflüsse auf diese Größe für die Herstellung von größeren Fraktionen für die Wahl der einzustellenden Parameter von großer Bedeutung ist.

3.1.6.4 Statistische Betrachtung der Einflüsse der Variablen auf die Ausbeute der zweiten Fraktion

Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes des Residuenplots für die Ausbeuten der mit Ethanol gefällten Chitosane ergab 0,9799 und korrigiert 0,9348 bei einem Lambda-Wert von 0,044. Durch eine Box-Cox-Transformation nach der Gleichung 3.2 konnte die Linearität des Plots auf 0,9821 bzw. 0,9417 verbessert werden.

$$m(L)Trans = \ln(m(L))$$

Gleichung 3.2

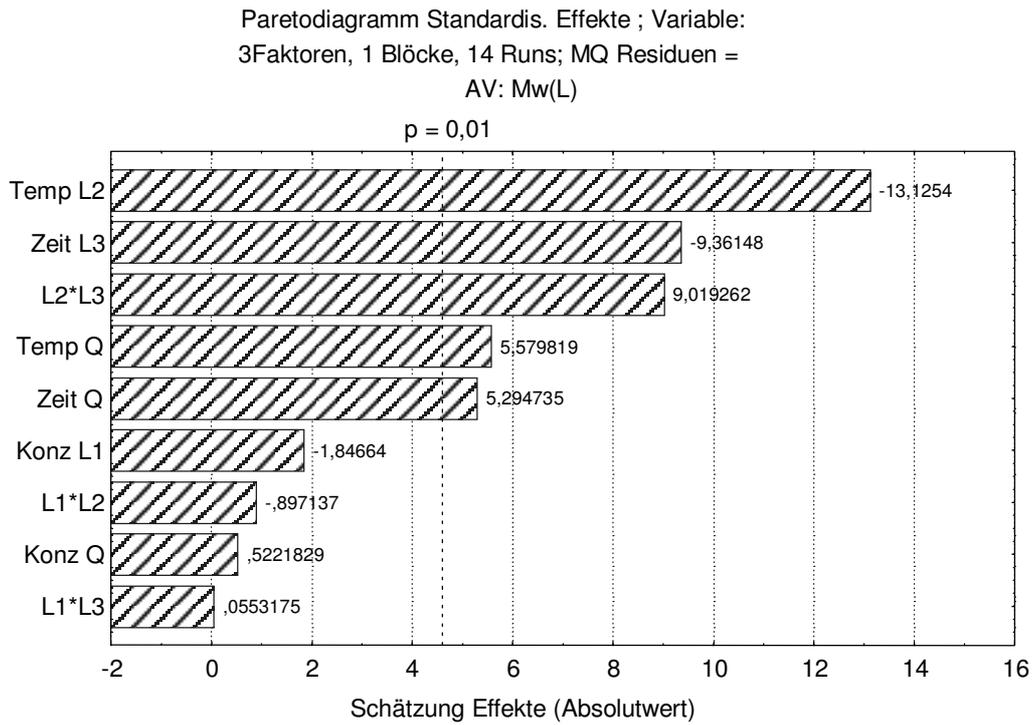


Abb. 3.11 Paretdiagramm der Effekte für $M_w(L)$

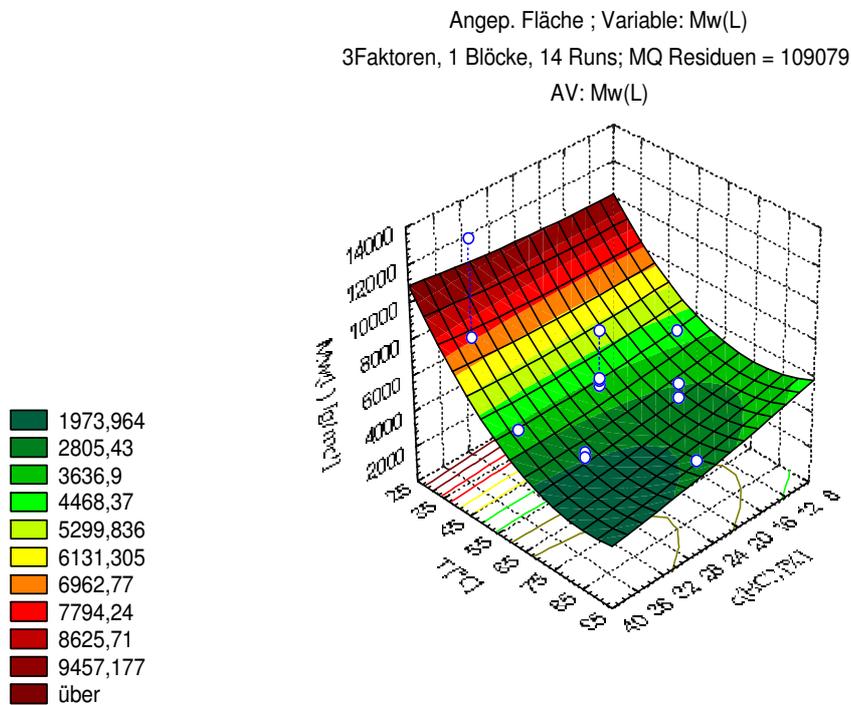


Abb. 3.12 Einfluss von Temperatur und Konzentration auf $M_w(L)$ bei einer Hydrolysezeit von 4h

Mit den transformierten Werten wurden die signifikanten Einflüsse überprüft. Sowohl die Temperatur als auch die Konzentration üben positive, lineare Effekte auf die Ausbeute der zweiten Fraktion aus. Die Reihenfolge dieser Einflüsse ähnelt der der ersten Fraktion, nur mit dem Unterschied, dass sie hier erwartungsgemäß ein positives Vorzeichen besitzen, da die Fragmente, die durch die Hydrolyse säurelöslich wurden, durch die Fällung mit Ethanol in der zweiten Fraktion wiedergefunden werden konnten. In der Abb. 3.13 ist zu erkennen, dass erst ab einer Säurekonzentration von mehr als 24 % die Ausbeute merkbar steigt.

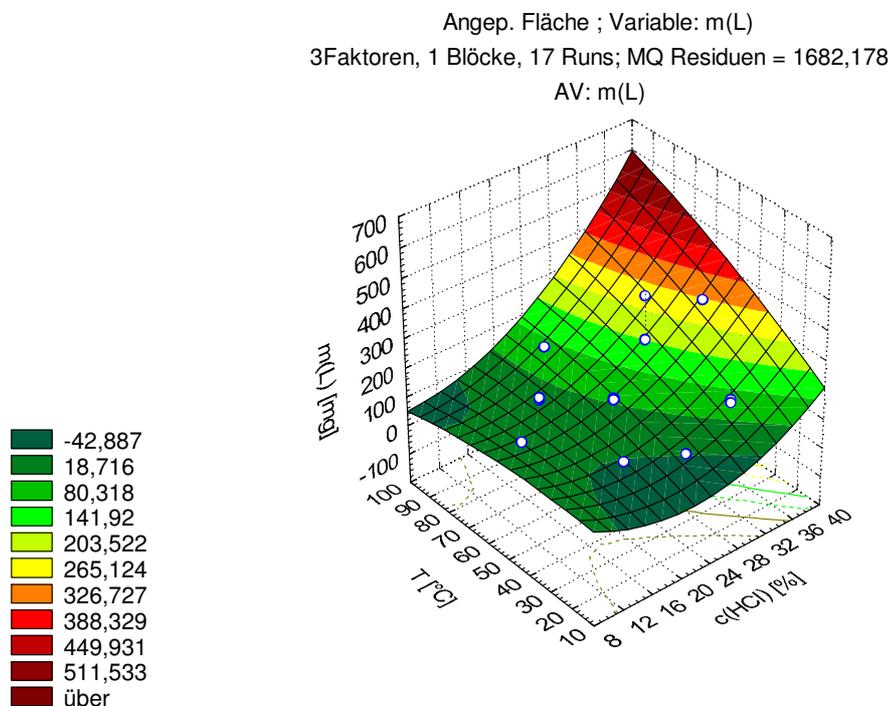


Abb. 3.13 Einfluss von Temperatur und Konzentration auf die Ausbeute der Säure löslichen Fraktion

Die linearen und quadratischen Effekte der Zeit liegen mit $-0,030$ und $-0,014$ weit unter der Signifikanzschwelle von 3,5. Die Zeit ist in diesem Rahmen folglich statistisch gesehen nicht für die Menge der entstehenden kurzkettigen Chitosane entscheidend. So ist nach Abb. 3.13 im Bereich der gewählten Versuchsgrenzen auch nicht durch Variation der Hydrolysezeit mit einer Ausbeute über 500 mg zu rechnen.

3.1.7 Prognosen

Mit den gesammelten Daten des zentral zusammen gesetzten Versuchplanes ist es möglich, optimale Versuchsbedingungen für ein gewünschtes Produkt, charakterisiert durch die unabhängigen Variablen, zu berechnen. Ein Ziel war die Herstellung von Chitosanen mit definierter Kettenlänge und möglichst hoher Ausbeute. Welche maximalen Ausbeuten mit dieser Hydrolysenmethode für bestimmte Molekulargewichte zu erwarten sind, kann durch die Eingabe der erwünschten Werte in die Prognosematrize von Statistica ermittelt werden. Die Spannweiten der unabhängigen Variablen wurden hierfür in 50 Teile gerastert, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Die ermittelten Versuchseinstellungen können dann dazu verwendet werden, Prognosen für weitere abhängige Größen, wie zum Beispiel dem zu erwartenden Polydispersitätsgrad, zu berechnen.

Die Tab. 3.4 zeigt die Ergebnisse der Prognosen in Hinblick auf eine optimale Ausbeute bei Hydrolysezeiten unter 2 Stunden und die entsprechenden Polydispersitätsgrade für verschiedene Zielmolekulargewichte. Alle Molekulargewichte zwischen 10 und 80 kDa sind mit dem Datensatz der ersten Fraktion und die darunter mit dem der zweiten ermittelt worden. Die Standardabweichungen wurden zu Gunsten der besseren Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass in relativ kurzer Zeit sehr hohe Ausbeuten an Chitosan mit einem mittleren Molekulargewicht über 10.000 g/mol zu erhalten sind. Der Polydispersitätsgrad sinkt mit abnehmender Kettenlänge sowohl in der ersten als auch in der zweiten Fraktion. Die maximalen Ausbeuten der mit Ethanol gefällten Chitosane liegen im Rahmen der gewählten Versuchsgrenzwerte unter 35 %. Es ist aber vorstellbar, dass diese relativ einfach zu erhöhen sind. Hierzu müsste der säurelösliche Anteil wie gehabt nach Ablauf der gewählten Versuchszeit von den suspendierten Chitosanpartikeln durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und mit Ethanol gefällt werden. Die vom kurzkettigem Chitosan befreite Säure könnte der ersten Fraktion wieder zugeführt werden, sodass die langkettigeren Polymere weiter bis zum gewünschten Produkt abgebaut werden. Das

Molekulargewicht wäre mit Hilfe der Brechungsindex-gekoppelten Lichtstreuung online überwachbar.

Tab. 3.4 Prognosewerte für die Säurehydrolyse von Chitosan

Soll	Prognosewerte			unabhängige Größen		
M_w [g/mol]	M_w [g/mol]	PD	m [mg]	c(HCl) [%]	T [°C]	t [h]
80.000	79.798	1,95	1.232	29,6	26,8	1,86
60.000	60.073	1,72	1.211	23,5	42,9	1,95
40.000	40.000	1,57	1.196	14,9	71,1	0,80
20.000	20.350	1,56	1.186	11,4	88,6	1,56
10.000	10.000	1,39	874	26,2	88,6	2,00
8.000	7.998	1,75	254	35,6	45,2	0,91
6.000	6.001	1,61	335	36,6	53,5	1,04
4.000	3.982	1,45	399	36,6	66,4	0,77
2.000	1.991	1,34	426	36,6	81,6	0,77

3.1.8 Zusammenfassung

Chitosan wurde als Suspension mit Hilfe der salzsauren Hydrolyse depolymerisiert. Die entstandenden löslichen Oligomere wurden nach der Methode 2 von den noch längerkettigeren unlöslichen Chitosanen abgetrennt und mit Ethanol gefällt. Die Untergrenze der unlöslichen Chitosane lag bei einem Molekulargewicht von rund 8.500 g/mol. In der zweiten Fraktion wurden so gut wie keine Chitosane mit einem Molekulargewicht über 10.000 g/mol gefunden. Da Richardson [1999] bei der intravenösen Gabe von Chitosanen über 10 kDa eine vermehrte Anreicherung in Organen, vor allem in der Leber, gefunden hat, erweist sich diese Fraktionierung als sehr vorteilhaft in Hinblick auf die Bereitstellung eines biopolymeren Trägermaterials für die parenterale Anwendung. Durch die angewendete Methode 2 konnten in nur wenigen Schritten sehr schnell rela-

tiv hohe Ausbeuten von fein gepulvertem Chitosanhydrochlorid unterschiedlicher Kettenlänge hergestellt werden. Die Trennung von säurelöslichen und nicht löslichen Chitosananteilen führte im Gegensatz zu der herkömmlichen Methode 1 zu guten Polydispersitätsgraden. Die Chitosanfraktionen zeigten nahezu monomodale Verteilungen, deren Breite mit abnehmendem Molekulargewicht der betrachteten Fraktion abnahm – eine Auswirkung der statistisch zufälligen Spaltung von suspendiertem und gelöstem Chitosan durch Salzsäure. Den größten signifikanten und auch linearen Einfluss zur Verringerung des Molekulargewichtes übte in beiden Fraktionen die Temperatur aus. Bei der ersten Fraktion folgte der lineare Effekt der Konzentration und in der zweiten der der Zeit. Die Ausbeuten wurden nahezu ausschließlich von der Temperatur und der Konzentration signifikant beeinflusst. Die Zeit spielte hier eine eher untergeordnete Rolle. Die statistische Auswertung des zentral zusammengesetzten Versuchsplanes ermöglichte neben der Untersuchung der Effekte auch die Ermittlung von Prognosewerten für verschiedenste Einstellungen im Bereich des Versuchsplanes. Ebenfalls konnten optimierte Bedingungen der unabhängigen Variablen, Temperatur, Konzentration und Zeit, für die Zielgrößen, gewünschtes Molekulargewicht und hohe Ausbeute, ermittelt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass definierte Molekulargewichte bis 20 kDa verlustfrei und bis 10 kDa nahezu verlustfrei hergestellt werden können. Die Prognosen für die Ausbeute von kurzkettigen, säurelöslichen Chitosanen lagen bei maximal 35 % bei relativ enger Molekulargewichtsverteilung.

3.2 Charakterisierung von kurzkettigen Chitosanen mittels MALDI-TOF

3.2.1 Einleitung

Für die Ermittlung der massen- und zahlenmittleren Molmassen M_w und M_n und der Molmassenverteilung von Polymeren ist die Gelpermeationschromatographie, gekoppelt mit einem Mehrwinkelstreulichtdetektor und einem Brechungsindexdetektor die zur Zeit genaueste Methode. Nur durch die Kopplung von leistungsstarken Lasern mit einer hochpräzisen Optik ist eine Routineanalytik von Molekülen unter 10.000 g/mol möglich geworden. Oligomere unter 1.000 g/mol können jedoch aufgrund ihrer schwachen Streuintensität nur sehr schwer mit Hilfe der Lichtstreuung detektiert werden. MALDI-TOF MS ist als noch sehr junge Absolutmethode hervorragend für die Aufklärung einzelner Molmassen geeignet und ist gerade im Bereich der Oligomerencharakterisierung ein sehr interessantes und aussichtsreiches Instrument. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Lichtstreuung ist die präzise Auftrennung von polydispersen Systemen in die einzelnen, massenverschiedenen Bestandteile. Die benötigte Probenmenge liegt unter 1 μg . Die Nachteile im Zusammenhang mit der Chitosanalytik sind die schwierige Ermittlung von mittleren Molekulargewichten bei Polydispersitäten über 1,2 aufgrund der Massendiskriminierung größerer Molekulargewichte [Motaudo et al. 1995, Shimada et al. 2001] und die bisher sehr niedrige Detektionsobergrenze. Letzel et al. [2000] bestimmten diese mit circa 7.500 g/mol im Reflektormodus. Allerdings wurden die breit verteilten Chitosanproben vorher mit Hilfe der präparativen Gelfiltration aufgetrennt und in zwei Fraktionen unterteilt, deren gemeinsame Grenze bei 2.000 Dalton lag. Die kurzkettige Fraktion wurde mit einer Matrix aus Dihydroxybenzoesäure (DHB) und die langkettige Fraktion mit einer Matrix aus Trihydroxyacetophenon (THAP) im Reflektormodus vermessen. Ein Gesamtspektrum wurde bisher nicht

gezeigt. Eine genauere Untersuchung von kurzkettigen Chitosanen im linearen und im Reflektormodus in Hinblick auf ein einfach zu erhaltendes Gesamtspektrum und deren Aussagekraft in Vergleich zu Ergebnissen der Gelpermeation könnten somit die Möglichkeiten der Flugzeitspektroskopie für die Chitosananalytik besser aufzeigen.

3.2.2 Methode

Das in Wasser gelöste Chitosanhydrochlorid wurde wie in Kap. 6.2.2.2 beschrieben auf das Proben target pipettiert und dort mit der Matrixlösung gemischt. Zur Förderung der Bildung stabilerer Addukte und der damit besseren Ionisierung wurde Natriumchlorid zugegeben. Die beobachteten Molmassen spiegelten die gebildeten Addukte $[M+Kation]^+$ wider. Die nach dem Trocknen entstandenen groben Kristalle wurden auf dem Target mit Methanol in einen feinen Kristallteppich umkristallisiert. Nur so konnten ausreichend scharfe Peaks erhalten werden. Die Proben wurden daraufhin sowohl im Linear- als auch im Reflektormodus vermessen.

Bei der Verwendung von Dihydroxybenzoesäure als Matrixsubstanz wurde in Vorversuchen ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis gefunden. Daher wurde für alle gezeigten Auswertungen THAP zur Herstellung der Matrix benutzt.

3.2.3 Ergebnisse

Zunächst wurde das Spektrum einer Chitooligosaccharidmischung der Firma Seikagaku im Reflektormodus untersucht. Die Probe setzte sich aus ungefähr gleichgroßen Anteilen an Oligosacchariden mit Polymerisationsgraden zwischen 2 und 6 zusammen (Abb. 3.14). Unter den angewendeten Analysenbedingungen sind alle Bestandteile bei einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis in hoher Intensität abbildbar. Unter 500 g/mol sind Bestandteile der Matrix als Störpeaks zu erkennen, die für die Auswertung nicht von Bedeutung sind. Die Molmassen

der Peaks entsprechen mit sehr hoher Genauigkeit den einfach positiv geladenen Addukten des jeweiligen Oligosaccharides mit einem Natriumion. Das Spektrum zeigt nur vollständig deacetylierte Oligosaccharide im angegebenen Polymerisationsbereich. Der Verlauf der absoluten Intensitäten (a.i.) zeigt ein recht charakteristisches Bild der Analyse von polydispersen Systemen. Die nahezu gleichen Anteile der Di- bis Hexamere sind nicht zu erkennen. Das Trimer zeigt unter den gewählten Bedingungen die höchste Intensität. Die langkettigeren Moleküle werden schlechter desorbiert, während die Intensität des Dimeres nach einer Theorie von Shimada et al. [2001] im angelegtem Hochvakuum durch Verflüchtigung verringert wird.

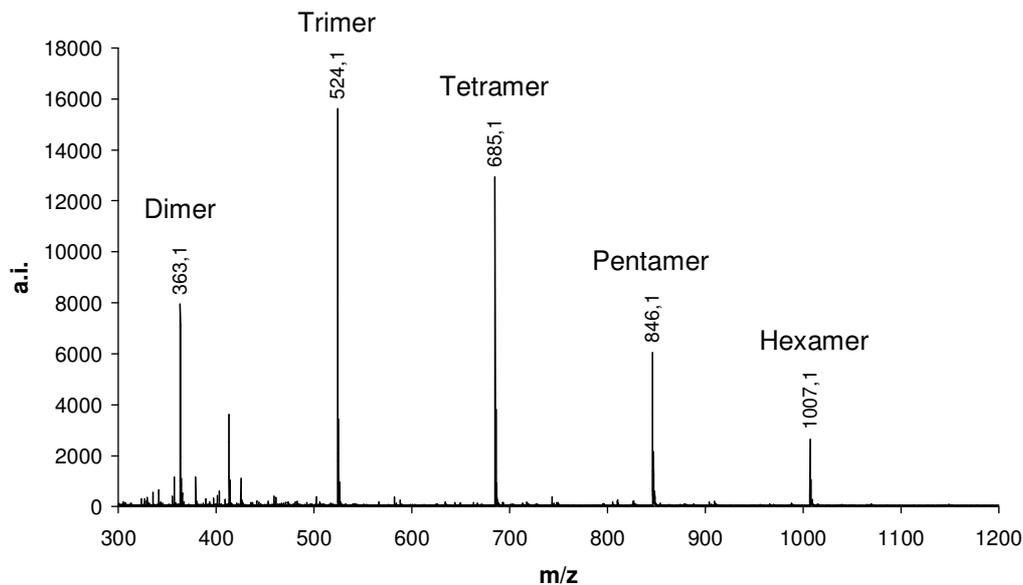


Abb. 3.14 Chito-oligosaccharide im Reflektormodus

Da engverteilte Chitosanstandards kommerziell nicht erhältlich sind, wurde zur weiteren Untersuchung Pullulan (P3) vermessen, ein aus Maltotriosen zusammengesetzter Polysaccharidstandard, der als sehr gut definierte Kalibriersubstanz erhältlich ist. Das mittlere Molekulargewicht betrug laut Hersteller 2.930 g/mol bei einem Polydispersitätsgrad M_w/M_n von 1,00. Die Abb. 3.15 zeigt das Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse gemessen im linearen und im Reflektormodus im Vergleich zur GFC/MALLS-Messung.

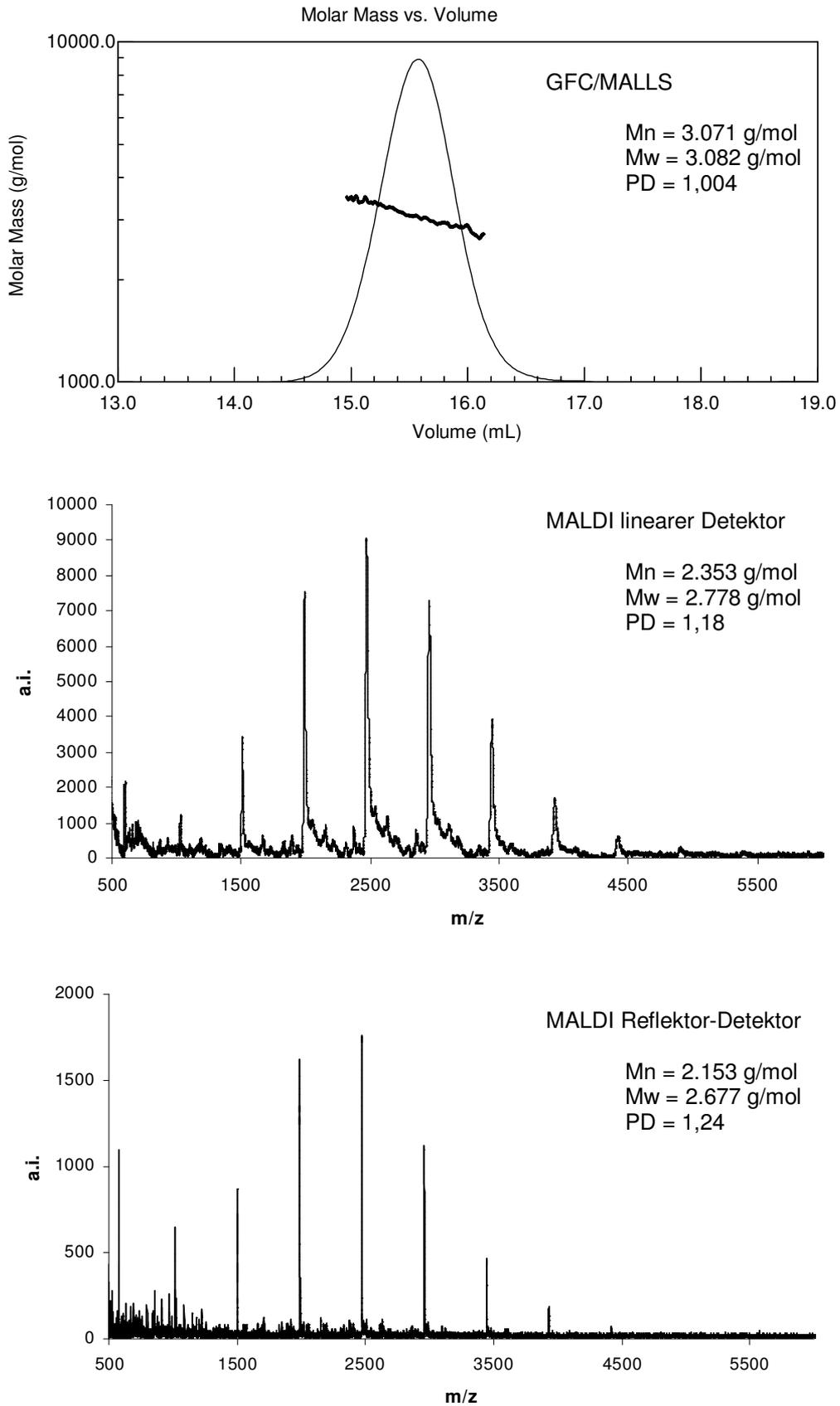


Abb. 3.15 Vergleich der Molmassenbestimmung des Pullulanstandards P3

Aus allen Abbildungen ist ersichtlich, dass der Standard nicht vollständig monodispers ist. Die GFC-Untersuchung ergab ein mittleres Molekulargewicht von 3.080 g/mol bei einer Polydispersität von 1,00. Aus den MALDI-TOF-Analysen geht hervor, dass die Probe sowohl langkettigere als auch kurzkettigere Pullulane enthält, deren Molekulargewichte sich jeweils erwartungsgemäß um eine Maltotrioseeinheit von 486 g/mol unterscheiden. Durch die Integration der Peakflächen erhielt man im linearen Modus ein Molekulargewicht von 2.778 und im Reflektormodus 2.677 g/mol. Beide Ergebnisse liegen aufgrund der Massendiskriminierung der höhermolekularen Anteile unter dem erwarteten Wert von 2.930 g/mol. Die Diskriminierung im Reflektormodus fällt bedingt durch das bauliche Prinzip des Reflektorflugrohres höher aus als im Linearmodus, was sich dort ebenfalls im höheren Polydispersitätsgrad widerspiegelt. Obwohl der PD im Linearmodus unter 1,2 liegt, ist noch ein Diskriminierungseffekt zu erkennen, durch den die ermittelte Molmasse rund 5 % unter dem Sollwert liegt. Hierdurch wird die besondere Schwierigkeit der quantitativen Auswertung von Oligosacchariden mit Hilfe der MALDI-TOF MS deutlich.

Die Molmassenspektren einer breit verteilten Chitosanprobe mit einem massenmittleren Molekulargewicht von 3.880 g/mol und einem Polydispersitätsgrad von 1,58 sind in Abb. 3.16 dargestellt. Der Deacetylierungsgrad wurde mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt und betrug 86,2 %. Die Massendiskriminierung der langkettigeren Polymere fällt bei diesen Chitosanproben stärker aus als bei den Pullulanen und ist im linearen Modus nicht so ausgeprägt wie im Reflektormodus. Der Vorteil des Reflektor-Detektors ist dagegen das sehr gute Signal-Rausch-Verhältnis. So kann man zum Teil bei einer Dehnung der y-Achse trotz der geringen absoluten Intensitäten noch Chitosane mit höherem Molekulargewicht erkennen als mit dem linearem Detektor – bei der abgebildeten Probe bis circa 3.900 g/mol. Durch die sehr hohe Auflösung des Verfahrens können mit Hilfe der Spektren Aussagen über die chemische Komposition der einzelnen Bestandteile getroffen werden. Bei nicht vollständig deacetylierten

Oligomeren ist pro Acetylgruppe jeweils eine Peakverschiebung um 42 g/mol zu beobachten.

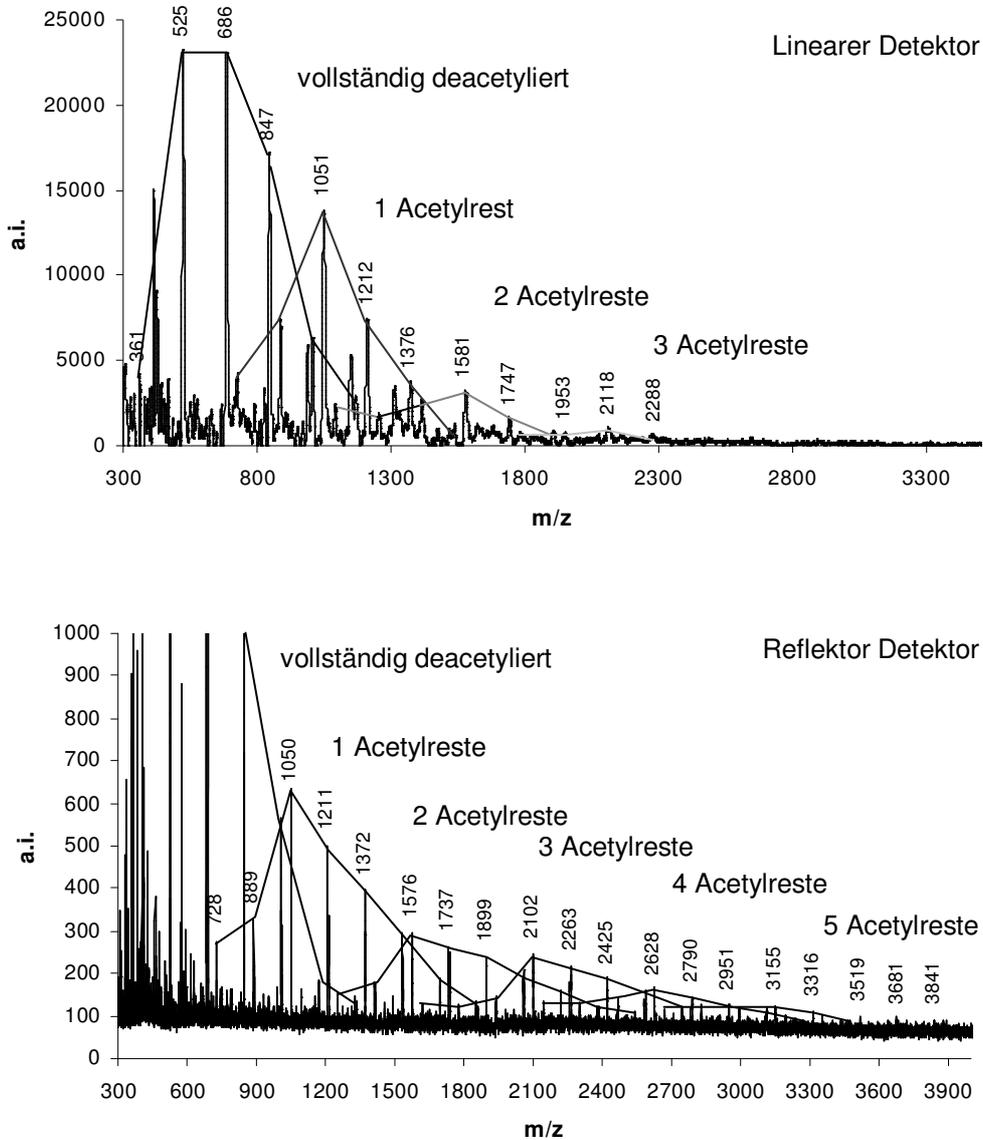


Abb. 3.16 Molmassenverteilung einer acetylierten Chitosanprobe

Bei der abgebildeten Probe ist ab dem Trimer mit der Zunahme des Oligomergewichtes um jeweils rund 526 g/mol ein Acetylrest zusätzlich zu finden. Umgerechnet entspricht das ab dem Trimer einer Acetylierung auf 3,28 Monomere oder einem Deacetylierungsgrad von 70 %.

In der Abb. 3.17 ist das Spektrum einer stark deacetylierten Chitosanprobe mit

einem massenmittleren Molekulargewicht von 2.357 g/mol, bestimmt mit GFC/MALLS, und einem über $^1\text{H-NMR}$ ermittelten Deacetylierungsgrad von 99,6 % gezeigt. Trotz der sehr geringen Acetylierung von nur 0,4 % sind Peaks von Chitosanoligomeren mit einer Acetylgruppe pro Gesamtmolekül eindeutig erkennbar und täuschen im MALDI-TOF Spektrum einen höheren Acetylierungsgrad vor. Eine mögliche Erklärung ist eine bessere Ionisierbarkeit und Desorption von acetylierten Polymeren.

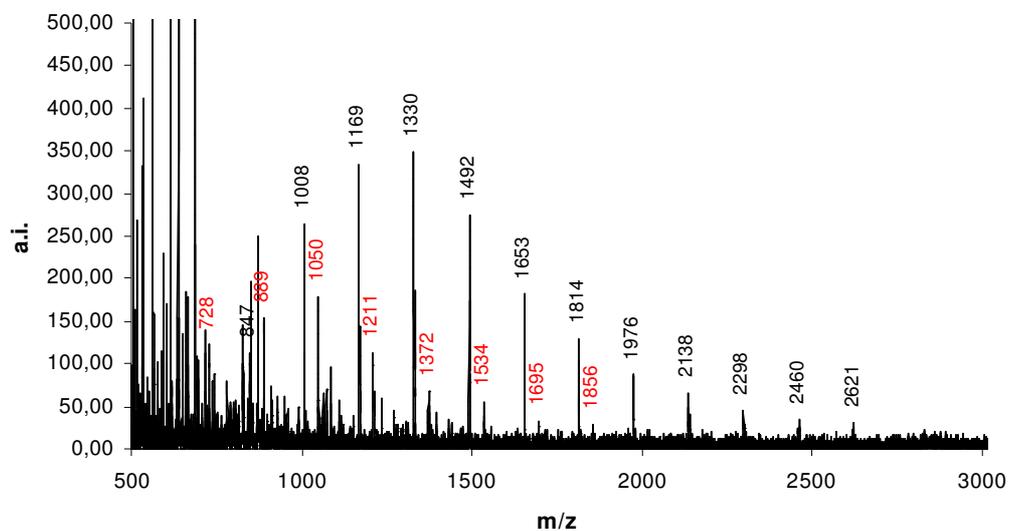


Abb. 3.17 Molmassenverteilung einer stark deacetylierten Chitosanprobe im linearen Modus

Aufgrund der starken Diskriminierung im Bereich der höheren Molekulargewichte von Chitosan ist die Anwendung der MALDI-TOF MS sehr eingeschränkt. Das höchste, gezeigte Molekulargewicht betrug bisher rund 7.000 Da nach Fraktionierung der Probe und Unterteilung der Spektren [Letzel et al. 2001]. Die Abb. 3.18 zeigt in den oberen beiden Spektren das Ergebnis der Messung einer nicht weiter aufgearbeiteten Chitosanprobe C14 mit einem massenmittleren Molekulargewicht von 8.610 g/mol bei einer Polydispersität von 1,24 im linearen und im Reflektormodus und im unteren Spektrum die Probe C18 mit $M_w = 15.260$ g/mol und $PD = 1,42$.

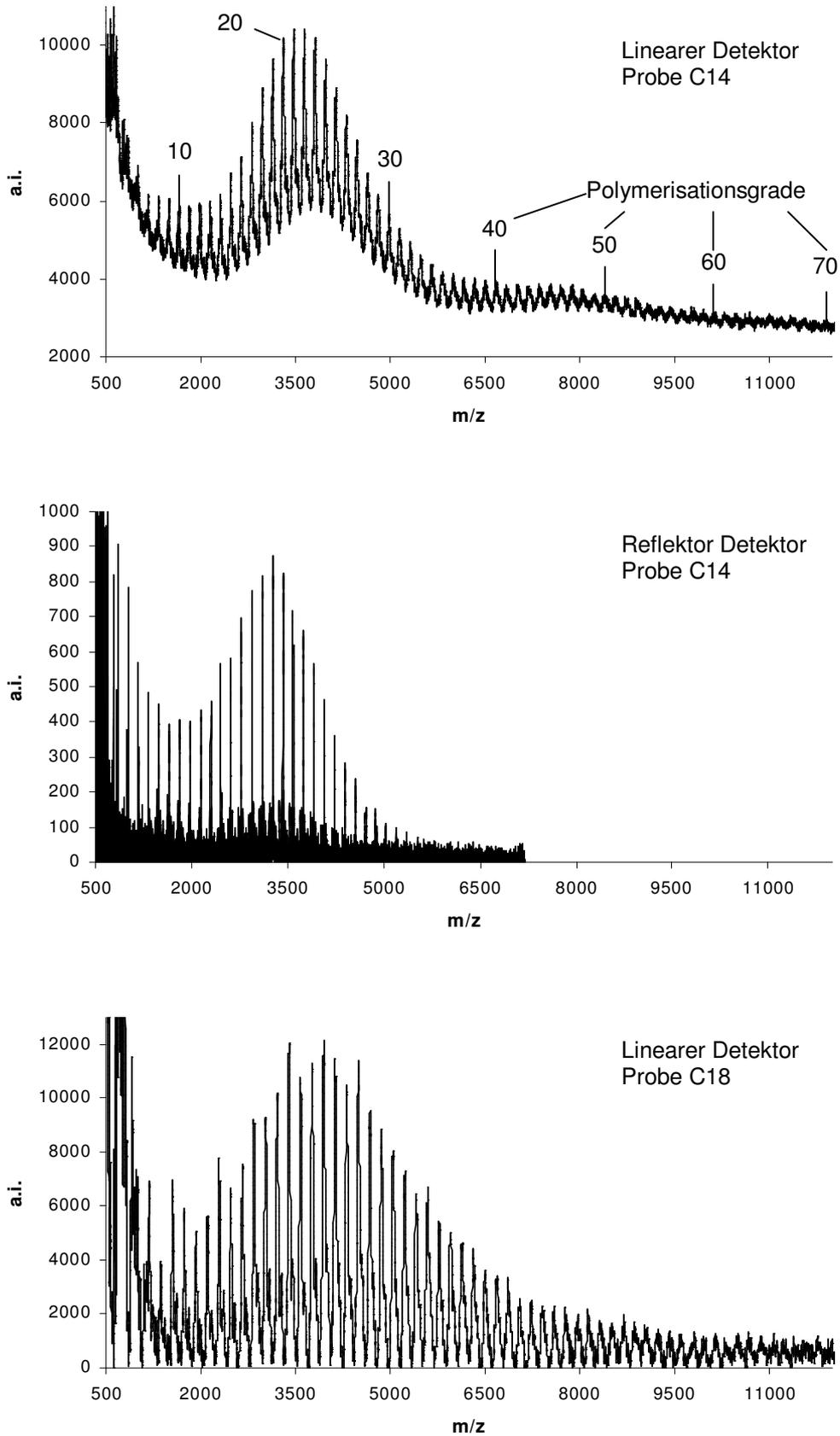


Abb. 3.18 Maximal abbildbare Molekulargewichte von Chitooligosacchariden

Die erste Datenkurve wurde nicht Basislinien korrigiert und lässt in einem Gesamtspektrum Chitooligomere mit einem Polymerisationsgrad von bis zu 70 (> 11.000 Da) erkennen. Im Reflektormodus hoben sich ab circa 7.000 g/mol keine klaren Oligomerenpeaks mehr ab. Die Daten wurden aus diesem Grund nicht weiter aufgenommen. Von der Probe C18 sind trotz des höheren mittleren Molekulargewichtes die einzelnen polymeren Bestandteile nur bis zu einem Molekulargewicht von knapp über 11.000 g/mol unterscheidbar. Hier scheint die Obergrenze der mit dieser Methode maximal detektierbaren Chitooligomere erreicht zu sein.

3.2.4 Zusammenfassung

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie eignet sich als Absolutmethode zur Untersuchung der Molekulargewichte von geringsten Mengen Chitosan. Man erhält hochauflösende Spektren, die mit sehr hoher Genauigkeit die exakten Molekulargewichte der Bestandteile zeigen. Die massenmittleren und zahlenmittleren Molekulargewichte sind aufgrund der Massendiskriminierung der langkettigeren Bestandteile auch unter einem Polydispersitätsgrad von 1,2 nicht exakt bestimmbar und liegen unterhalb der erwarteten Werte. Dabei fällt die Diskriminierung im Reflektormodus stärker aus als im linearen Modus, sodass dort die mittleren Molekulargewichte geringer und die Polydispersitäten höher ausfallen als die Werte, die mit dem linearen Detektor oder mittels GFC/MALLS ermittelt wurden. Trotzdem sind durch die wesentlich bessere Auflösung und das bessere Signal-Rausch-Verhältnis im Reflektormodus langkettigere Chitosane zum Teil auch im gleichen Bereich wie im linearen Modus erkennbar. Die Acetylgruppen pro Oligomer sind qualitativ eindeutig, quantitativ jedoch nicht auswertbar. Acetylierte Chitosane scheinen besser desorbierbar zu sein als die deacetylierten, sodass deren Intensitäten höher als erwartet ausfallen und einen zu niedrigen Deacetylierungsgrad vortäuschen. Die höchsten Molekulargewichte sind mit einer etwas geringeren Auflösung als im Reflektormodus im linearen Modus

detektierbar. Es können aus der THAP-Matrix Gesamtspektren von Chitosanen bis über 11.000 g/mol dargestellt werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse wurde in der Tab. 3.5 zusammengefasst.

Tab. 3.5 Vergleich der Verfahren zur Molmassenbestimmung

	GFC/MALLS	MALDI linear	MALDI Reflektor
Probenmengen	+	○○	○○
Messdauer	○	○○	○○
Auflösung	○	++	+++
Richtigkeit M_w	+++	+	○
Diskriminierung	-	+	++
max. detektierbares Molgewicht	+++	+	○
Auswertbarkeit der Acetylierung	-	○	+

+++ sehr hoch, ++ hoch, + mittel, ○ gering, ○○ sehr gering, - keine

3.3 Bestimmung des Deacetylierungsgrades von Chitosan

3.3.1 Einführung

Bis heute werden die verschiedensten Verfahren für die Ermittlung des Deacetylierungsgrades von Chitosan angewendet. Beim Vergleich der am meisten angewendeten Methoden wie die IR-, UV- und NMR-Spektroskopie sowie die titrimetrischen Verfahren sind zum Teil erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen beobachtet worden [Roberts 1992c, Tan et al. 1998, Khan et al. 2002]. Als sehr nützliche und richtige Methoden kristallisieren sich die ^1H -NMR und die ^{13}C -NMR-Spektroskopie heraus. Die Protonenresonanzspektroskopie wird meist für die Untersuchung von gelösten Chitosanproben herangezogen, während mit der Festkörper-C-NMR vor allem die in herkömmlichen Lösungsmitteln unlöslichen Chitine oder Chitosanderivate vermessen werden. Beide Methoden werden für die Standardanalytik vorgeschlagen [Heux et al. 2000, Brugnerotto et al. 2001, Hwang et al. 2001].

Ein Komitee der ASTM (F04.42) erarbeitet zur Zeit eine Methode für die Standardanalytik von Chitosan und Chitosanchlorid mit Hilfe der hochauflösenden Protonenkernresonanzspektroskopie. Diese basiert auf einer Arbeit von Varum et al. aus dem Jahre 1991, die die erste Routineuntersuchung für gelöste Chitosane durch ^1H -NMR darstellte. Die Chitosane sollten bei der Probenmessung einen anzahlmittleren Polymerisationsgrad von 15 bis 30, entsprechend einem Molekulargewicht von rund 2.500 bis 5.000 g/mol, besitzen. Durch die niedrige Viskosität der Probe und erhöhte Mobilität der Moleküle, soll eine ausreichend hohe Peakauflösung zur Spektreenauswertung im 500 MHz-Spektrometer erhalten werden. Hierfür wird vor der Analyse eine saure Hydrolyse der Polymere durchgeführt. Als zweckmäßig soll sich in diesem Fall die Spaltung mit salpetriger Säure nach Allan und Peyron [1995] erwiesen haben, da diese bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann und den Deacetylierungsgrad von Chito-

sanen mit einem DD > 60 % nur geringfügig verändert. Allerdings entstehen nach der Spaltung an den neuen reduzierenden Enden 2,5-Anhydro-D-mannose-Einheiten, deren Peaks im NMR-Spektrum bei der Auswertung berücksichtigt werden müssen (vgl. Kap. 2.2) (Abb. 3.19).

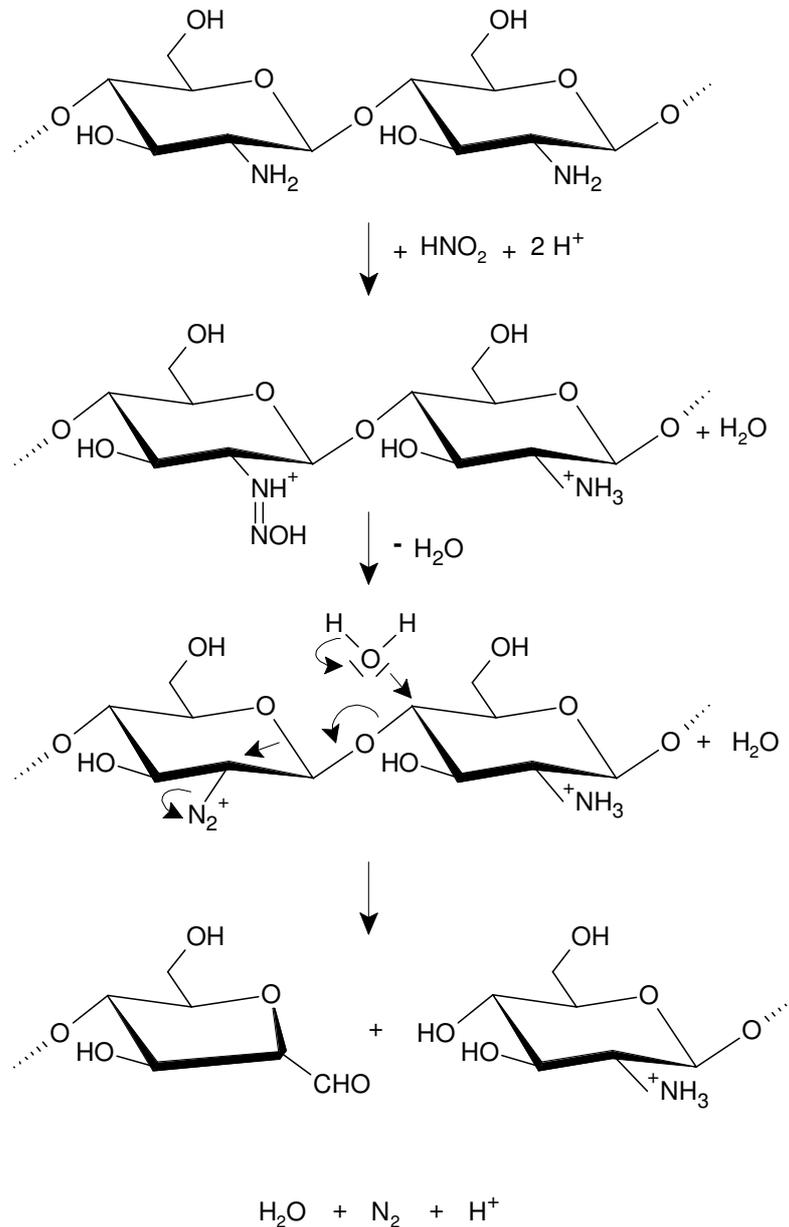


Abb. 3.19 Saure Hydrolyse von Chitosan mit salpetriger Säure

Die Hydrolyse wird bei Raumtemperatur in deuterierter Salzsäure und Natriumnitrit durchgeführt und nach 4 Stunden durch Zugabe von deuterierter Natronlauge gestoppt.

Der pH-Wert der Lösung beträgt während der Hydrolyse 1, sodass eine Deacetylierung nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Es ist fraglich, ob dieser chemische Eingriff vor der Vermessung tatsächlich notwendig ist und ob eine direkte Messung von handelsüblichen Chitosanen nicht Zeit und Aufwand sparen kann.

Die NMR-Spektroskopie ist für die Bestimmung des Deacetylierungsgrades ein sehr genaues und schnell durchzuführendes Verfahren. Ein Blick auf die Analysezertifikate von Chitosanen verschiedener Hersteller, in diesem Falle Primex, Pronova, Dalwoo-chitoSan und Fish Contract zeigt jedoch, dass dieses Verfahren nicht genutzt wird, sondern stattdessen kostengünstigere Methoden wie die Titration zur Charakterisierung der Produkte herangezogen werden. Vor diesem Hintergrund soll der Partikelladungsdetektor als eine neue Alternative zur Endpunktbestimmung bei der Kolloidtitration von Chitosanen untersucht werden. Zum Vergleich werden die mit Hilfe der ^1H -NMR- und der ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermittelten Deacetylierungsgrade herangezogen.

3.3.2 Bestimmung des Deacetylierungsgrades mittels ^1H -NMR und ^{13}C -NMR

3.3.2.1 Probenbereitung ^1H -NMR

Eine 2 %-ige Chitosanlösung in 1 % DCI in D_2O (0,28 N) wird im Probenröhrchen im Wasserbad auf die gewählte Temperatur vorgewärmt und danach im Ultraschallbad entgast. Nach weiteren 5 Minuten Temperierung im Gerät wurde die Probe im 300 MHz-Kernresonanzspektrometer vermessen. Bei hochmolekularen Chitosanen ab einem Molekulargewicht von 500 kDa kann zur Reduktion der Viskosität und der daraus resultierenden höheren Peakauflösung auch eine 1 %-ige Lösung verwendet werden. Alle weiteren Details sind im Anhang unter 6.2.3.1 beschrieben. Ein wichtiger Punkt dieser Methode ist die Ultraschallentgasung der Probenlösung vor der Vermessung. Durch die Entfernung von Luft-

bläschen und damit von störenden Sauerstoff-Diradikalen konnte, wie am Beispiel des Monomers Glucosaminhydrochlorid (Abb. 3.20) gezeigt, eine verbesserte Auflösung und Peaktrennung erreicht werden.

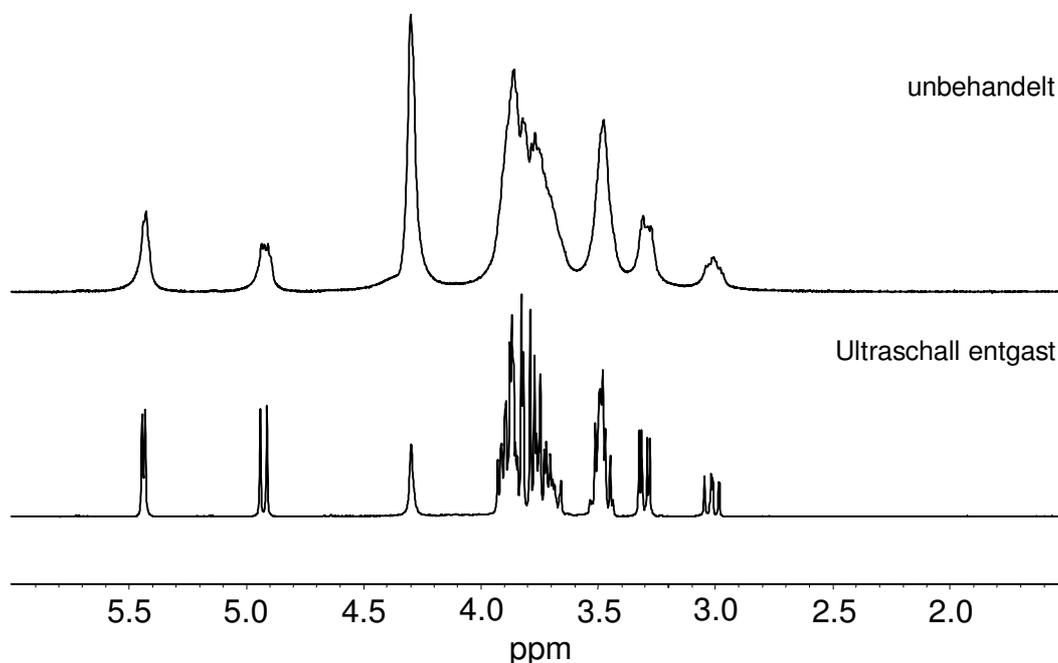


Abb. 3.20 ^1H -NMR-Spektrum von Glucosamin-HCl vor und nach Ultraschallbehandlung

3.3.2.2 Spektrenauswertung ^1H -NMR

In Abb. 3.21 ist das Kernresonanzspektrum der kurzkettingen Chitosanprobe DALW mit einem Molekulargewicht von 3.880 g/mol und einem bei 330 K ermittelten Deacetylierungsgrad von 86,2 % dargestellt worden. Durch den D_2O -Austausch sind nur die Signale der Wasserstoffatome der CH-Gruppen und von HDO zu erkennen. Man erhält ein sehr hochaufgelöstes Spektrum, das sich bei höhermolekularen Polymeren wegen einer geringeren Molekülbewegung verbreitert. Die chemischen Verschiebungen δ sind in der Tab. 3.6 aufgeführt. Es wurde ein Pulsprogramm mit Vorsättigung zur Reduzierung des HDO-Signals benutzt, dessen Intensität nicht angegeben wurde.

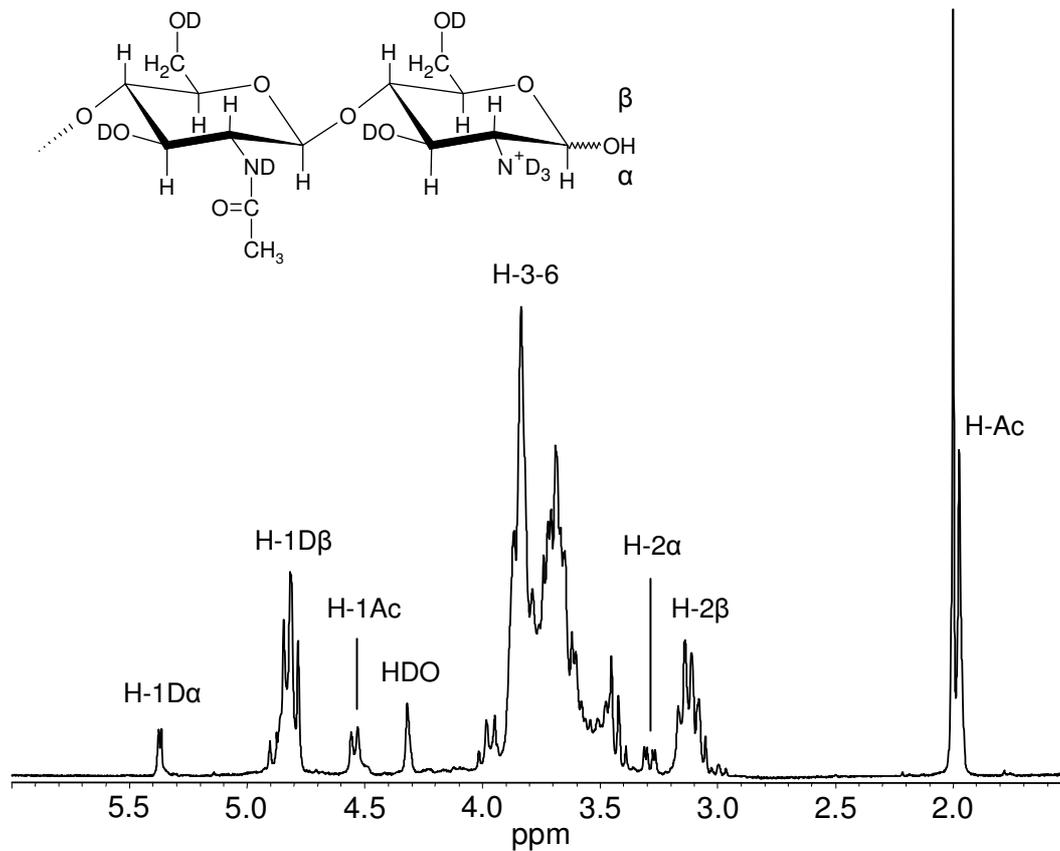


Abb. 3.21 ^1H -NMR-Spektrum der kurzkettingen Chitosanprobe DALW

Tab. 3.6 Chemische Verschiebungen der Protonenresonanzen in 1 % DCI

Proton	chem. Verschiebung δ [ppm]	Intensität
H-Ac	2,00	0,580
H-2 β	2,99 – 3,22	0,806
H-2 α	3,30	0,111
H-3-6	3,40 – 4,06	7,171
HDO	4,32	-
H-1Ac	4,56	0,196
H-1D β	4,80 – 4,96	1,000
H-1D α	5,40	0,076

Das am stärksten abgeschirmte Singulett-Signal der Acetylprotonen (H-Ac) befindet sich im höherem Feld bei 2,00 ppm. Direkt daneben zeigt sich bei 2,03 ppm die Bande des Acetatanions. Die Peaks liegen nicht vollständig basisliniengetreunt vor, was zu einer aufwendigen Auswertung des Chitosanacetatsalzes allein mit Hilfe dieser Bande führt. Die meisten Chitosane werden jedoch als Base oder Hydrochlorid auf den Markt gebracht, sodass dies im allgemeinen kein Problem darstellt. Es folgen im Bereich von 3 bis 3,36 ppm mehrere Quartette des Protons am C₂-Atom. Da mit abnehmender Kettenlänge die Anzahl an endständigen Glucosamineinheiten steigt, sind bei kurzkettigen Chitosanen die Auswirkungen der Anomerie zunehmend erkennbar. Sie äußern sich in einer Auftrennung der Signale der Protonen am C₁- (H-1D) und C₂-Atom (H-2) je nach Konfiguration der OH-Gruppe am anomeren C₁-Atom. Die jeweiligen Peaks verschieben sich bei einer Änderung von der β- in die α-Position durch die größere Entschirmung in das tiefere Feld und dürfen bei der Berechnung des Deacetylierungsgrades nicht außer acht gelassen werden. Bei einer Acetylierung der Aminogruppe ist aufgrund der dort höheren Elektronendichte eine diamagnetische Verschiebung des Protons am C₁-Atom zu beobachten (H-1Ac). Da die Signalintensität nur von einem Proton verursacht wird, entspricht das Integral einem Drittel des H-Ac-Signals. Die restlichen Protonen der Kohlenstoffatome C₃ – C₆ geben die sehr komplexen Resonanzsignale zwischen 3,4 und 4,1 ppm. Der Einfluss der Temperatur auf das Spektrum wurde in der Abb. 3.22 untersucht. Bei der Chitosanprobe MD4 mit einem Molekulargewicht von 188 kDa und einem DD von 92,2 % ist durch Temperaturerhöhung vor allem eine diamagnetische Verschiebung des HDO-Signals in das hohe Feld zu verzeichnen. Dieses verschiebt sich von 4,78 ppm bei 300 K nach 4,32 ppm bei 330 K. Dabei wird der H-1Dβ-Peak bei 4,85 ppm sichtbar, der vorher durch das HDO-Signal verdeckt und mit unterdrückt wurde. Die recht schwache H-1Ac-Bande bei 4,59 ppm zeigt sich bei 330 K basisliniengetreunt und kann so mit zur Auswertung herangezogen werden.

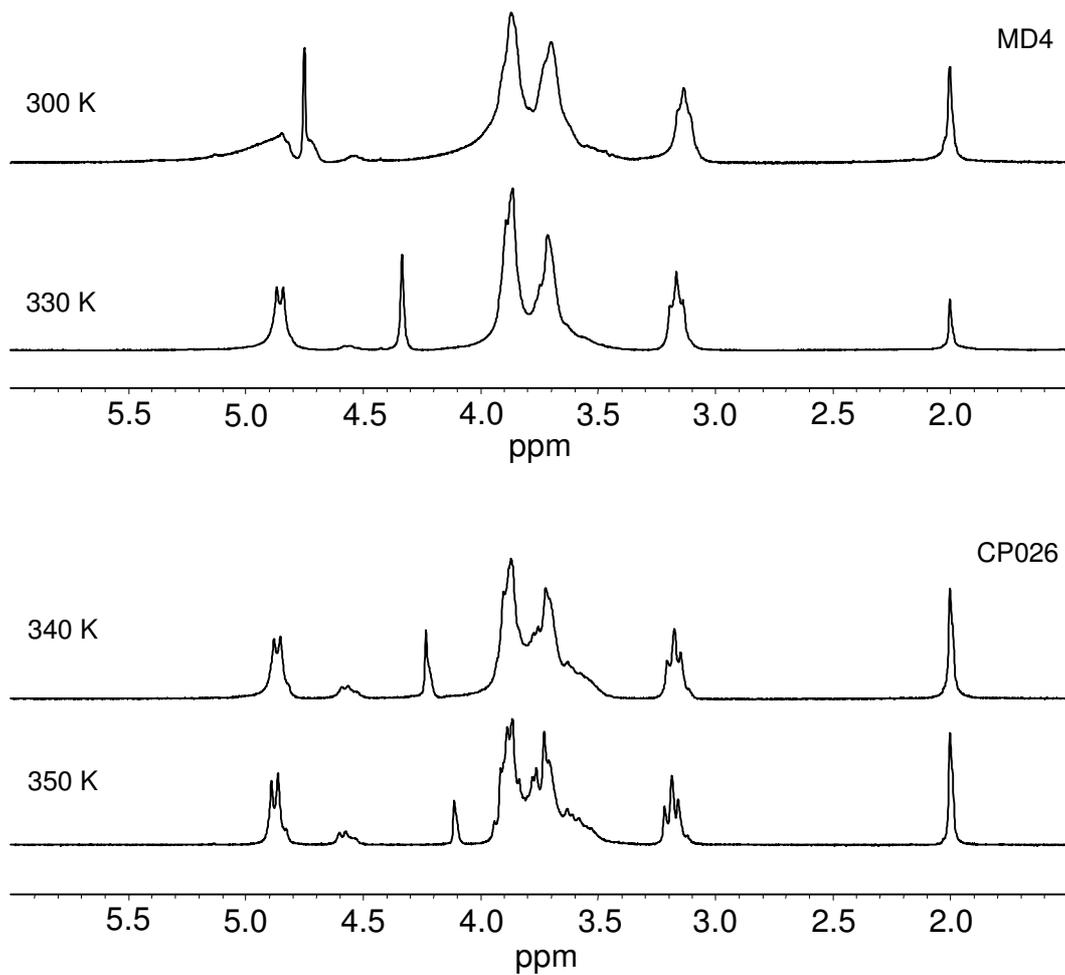


Abb. 3.22 Einfluss der Analysentemperatur auf das Spektrum der hochmolekularen Chitosanproben MD4 und CP026

In der unteren Grafik ist der Einfluss höherer Temperaturen an einem sehr langkettigen Chitosan CP026 mit einem mittleren Molekulargewicht von 530.000 g/mol und einem Deacetylierungsgrad von 78,9 % dargestellt worden. Man erkennt eine verbesserte Peakauflösung mit einer Erhöhung der Temperatur von 340 K auf 350 K, bedingt durch die abnehmende Viskosität der Probe. Es ist allerdings auch eine weitere Verschiebung des HDO-Signals in Richtung des Peakkomplexes der Protonen H-3 bis H-5 zu verzeichnen. Der Deacetylierungsgrad der 350 K-Probe wurde mit 80,5 % bestimmt. Die Erhöhung des Wertes kann eine Folge der hohen Temperatur sein, bei der das Polymer schon in der verdünnten Säure deacetyliert werden kann. Bei 330 K ist bei keiner Probe ein

höherer Deacetylierungsgrad im Vergleich zu 300 K festgestellt worden.

Die ASTM lässt die Chitosanlösungen bei einem pD-Wert von 4 bei einer Temperatur von 363 K messen, um möglichst scharfe Peaks zu erhalten. Allerdings verläuft die basische Deacetylierung wesentlich schneller als die saure, sodass bei diesen Temperaturen ebenfalls mit einer Abspaltung der Acetylgruppen gerechnet werden muss. Hinzu kommt die etwas schlechtere Signalaufspaltung bei pD-Werten über 2,7 [Domard et al. 1991], sodass mildere Temperaturen bei einem niedrigeren pD-Wert vorteilhafter sein können.

Eine Untersuchung, ob die Lagerung der Probe in der Messlösung bei Raumtemperatur einen Einfluss auf das Ergebnis hat, ergab, dass sich selbst 4 Tage nach der Probenvorbereitung das Ergebnis nicht verändert hat und die Probe hinsichtlich des Deacetylierungsgrades stabil bleibt. Auch die Ultraschallbehandlung führte in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Wang et al. [1991] unter den gewählten Bedingungen nicht zu einer Veränderung der Probe, sondern ausschließlich zu einer Verbesserung der Spektrenauflösung.

Mit der hier beschriebenen Methode wurden unterschiedlichste Chitosane in einem Bereich von 2 bis 530 kDa vermessen. Eine Übersicht von vier Beispielen ist in der Abb. 3.23 wiedergegeben. Von oben nach unten sind Chitosane mit einem Molekulargewicht von 2,7; 90; 188 und 530 kDa mit zunehmender Acetylierung gezeigt. Alle Peaks die zur Auswertung herangezogen wurden, wurden durch die Messung mit dem 300 MHz-Spektrometer ausreichend getrennt. Es wird die dipolare Verbreiterung der Resonanzsignale der hochmolekularen Biopolymere nach unten hin deutlich, wobei die Basislinientrennung der entscheidenden Peaks erhalten bleibt. Bei Molekulargewichten über 30 kDa wird die Rotationskorrelationszeit, die Dauer einer Reorientierung der Moleküle, so lang, dass die Spins eine gewisse Orientierungsabhängigkeit im Magnetfeld spüren und es zur Bandenverbreiterung kommt. Mit abnehmendem Molekulargewicht ist ebenfalls die zunehmende Bedeutung der Konfigurationsänderung der OH-Gruppe am endständigen C₁-Atom zu erkennen. Durch die steigende Anzahl an

neuen Kettenenden erhöhen sich die Intensitäten der tieffeldverschobenen Signale der Protonen an C₁ und C₂, die durch die α-Position der OH-Gruppe am anomeren Kohlenstoff hervorgerufen werden (H-1Dα und H-2α bei 5,4 und 3,3 ppm).

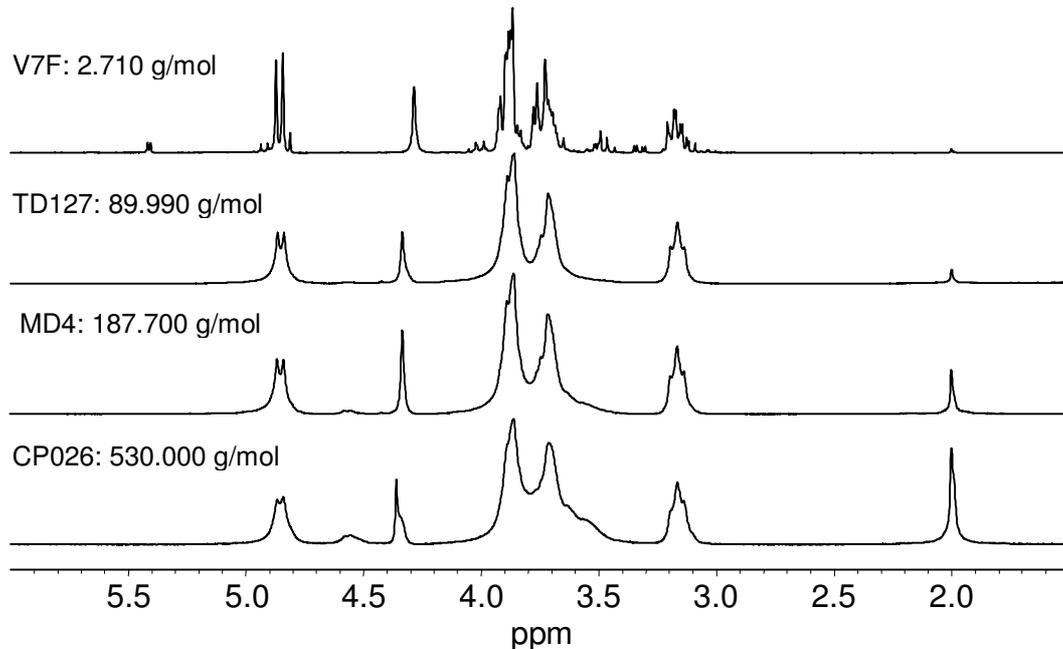


Abb. 3.23 ¹H-NMR-Spektren von Chitosanen mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Deacetylierungsgraden

Für die Berechnung des Deacetylierungsgrades schlugen Varum et al. [1991] die Einbeziehung möglichst vieler Resonanzsignale zur Fehlerminimierung vor.

Es sei:

$$f = \frac{\text{Gesamtfläche der Resonanzen}}{\text{Summe der durch die Acetylierung hervorgerufenen Resonanzen}} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Dann folgt für die in der Tab. 3.6 angegebenen Intensitäten (Bei der Darstellung der Formeln wurden die Bindestriche in den Signalabkürzungen wegen der Verwechslungsgefahr mit einem Subtraktionszeichen weggelassen):

$$f = \frac{(H1D) + (H1Ac) + (H3_6) + (H2) + (HAc)}{(H1Ac) + (HAc)} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Das Signal H-1D wird nur durch die deacetylierten Einheiten, und die Signale H-1Ac und H-Ac werden nur durch die acetylierten Einheiten hervorgerufen. Die Intensitäten für H-1D und H-1Ac entsprechen jeweils einem und die für H-Ac drei Protonen. Die Kernresonanzen von H-3-6 und H-2 entsprechen mit insgesamt 6 Protonen den Intensitäten beider Monomere. Mit der Molenfraktion der N-acetylierten Einheiten (F_A) und der Molenfraktion der deaceylierten Einheiten ($1-F_A$) folgt für f :

$$f = \frac{1 - F_A + F_A + 6 + 3F_A}{F_A + 3F_A} = \frac{7 + 3F_A}{4F_A} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Durch Gleichsetzen der Gleichung 3.4 mit der Gleichung 3.5 erhält man:

$$\frac{7 + 3F_A}{4F_A} = \frac{(H1D) + (H1Ac) + (H3_6) + (H2) + (HAc)}{(H1Ac) + (HAc)} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Und durch Auflösung nach F_A :

$$F_A = \frac{7 [(H1Ac) + (HAc)]}{4 [(H1D) + (H3_6) + (H2)] + [(H1Ac) + (HAc)]} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Der prozentuale Deacetylierungsgrad berechnet sich dann nach:

$$DD(H - NMR_1) = (1 - F_A) \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Die durch die Anomerie hervorgerufenen zusätzlichen Signale wurden bei dieser Berechnung jedoch nicht mit einbezogen. Gerade bei der Analyse von kurzketti-

gen Chitosanen sollten diese jedoch mit berücksichtigt werden, da sonst falsch niedrige Deacetylierungsgrade erhalten werden. H-1D bildet dann die Summe aus H-1D α und H-1D β , sowie H-2 aus H-2 α und H-2 β .

Die ASTM verwendet im Entwurf nicht die komplexen H-3-6-Resonanzen für die Berechnung des Deacetylierungsgrades. Bei der hohen Messtemperatur von 363 K liegt das HDO-Signal zu dicht an diesen Peaks, sodass eine Basislinientrennung nicht mehr gewährleistet ist. Die resultierende Berechnungsformel lautet:

$$DD(\text{H-NMR}_2) = \frac{H1D\alpha + (H1D\beta + H2D)/2}{H1\alpha + (H1D\beta + H2D)/2 + (H1Ac + (HAc/3))/2} \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 3.9}$$

In den folgenden Abschnitten wurden beide Berechnungsmethoden zum Vergleich mit herangezogen.

3.3.2.3 Probenbereitung und -vermessung ^{13}C CP/MAS NMR

Alle Proben wurden direkt in pulverisierter Form ohne weitere Vorbehandlung im Kernresonanzspektrometer bei 100 MHz mit Hilfe der Probenrotation unter dem magischen Winkel (magic angle spinning - MAS) und der Kreuzpolarisation (cross polarisation - CP) vermessen. Bei der Festkörper-NMR liegen die Moleküle unterschiedlich ortsgebunden im Raum. Die dadurch bedingte Anisotropie und die zusätzlichen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen im Festkörper führen zu einer starken Bandenverbreiterung. Durch eine extrem schnelle Rotation (bis zu 15 kHz) um den magischen Winkel von $54^\circ 44'$ zur z-Richtung des Magnetfeldes können diese Effekte minimiert werden, sodass sich die Probe im Magnetfeld ähnlich einer Flüssigkeit verhält und hoch aufgelöste isotrope Signale erhalten werden können. Die hier angewendete Rotationsfrequenz betrug 6 kHz.

Zur Verbesserung der Signalintensität und Verringerung der Zeitspanne zweier

aufeinanderfolgender Experimente (recycle delay) ist die Kreuzpolarisation die Technik der Wahl. In der in Abb. 3.24 angegebenen Pulssequenz wird zunächst für die Protonen ein 90° -Puls angewandt, welcher dann direkt nach einer Phasenverschiebung von 90° fortgesetzt wird. In dieser Kreuzpolarisationsphase oder auch Kontaktzeit (CT) geraten die Protonen in eine sogenannte Spin-Lock-Situation. Wendet man während dieser Zeit einen definierten ^{13}C -Puls an, sodass ^{13}C und ^1H gleiche Präzessionsfrequenzen um ihre jeweiligen effektiven Radiofrequenzfelder erhalten, können diese Energie miteinander austauschen. Es findet ein Polarisationstransfer von dem Spinsystem hoher relativer Häufigkeit und hoher Polarisierung (^1H) zu dem Spinsystem niedriger relativer Häufigkeit (^{13}C) statt. Da die Protonen wesentlich schneller relaxieren können als die ^{13}C -Kerne, sind sie in der Lage, die „heißen“ ^{13}C -Spins abzukühlen, sodass das Pulsexperiment schon nach kürzerer Zeit wiederholt werden kann. Während der Akquisitionszeit und Hochleistungsentkopplung (HP-Entkopplung) werden die Spektren aufgezeichnet. Durch Fourier-Transformation erhält man die charakteristischen NMR-Signale, deren Lage und Intensitäten Aussagen über die Nahumgebung der untersuchten Kerne erlauben.

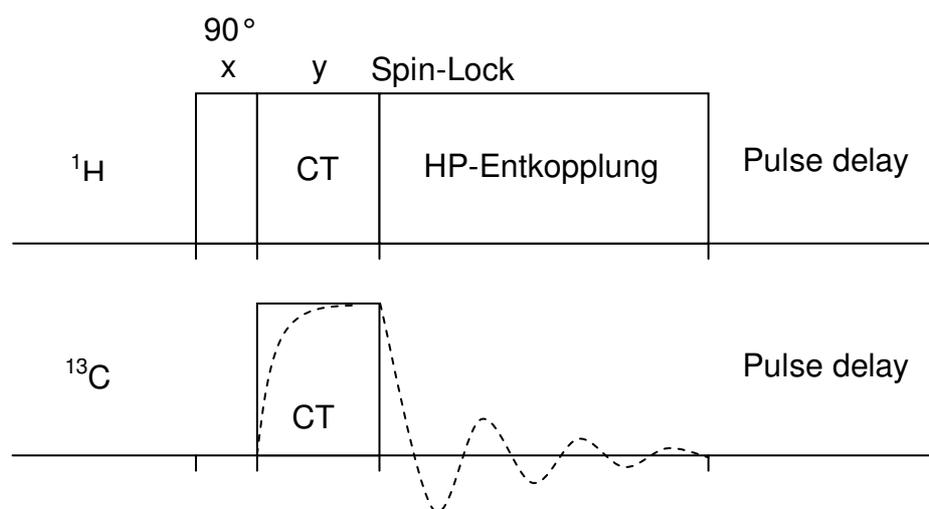


Abb. 3.24 Pulssequenz für das CP-Experiment

Da die Intensitäten der ^{13}C -NMR-Resonanzen von der Kinetik des Kreuzpolarisi-

sationsprozesses beeinflusst werden, können verschiedene Kontaktzeiten zu einer Veränderung der relativen Signalintensitäten führen. Außerdem beinhalten Naturstoffe oft paramagnetische Zentren, die die Signale von einigen ^{13}C -Kernen unterdrücken können. So muss bei einer quantitativen Auswertung sichergestellt werden, dass die entsprechenden ^{13}C -Signale für alle vorhandenen Kohlestoffatome repräsentativ sind.

Für eine Optimierung der Wiederholrate (relaxation delay) ist die Bestimmung der Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit ($T_{1\text{H}}$) von Bedeutung, während für die optimale Kontaktzeit die Kreuzpolarisationszeit (T_{CH}) und die Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden Device ($T_{1\rho\text{H}}$) erforderlich sind, um zuverlässige quantitative Aussagen treffen zu können. Die Kontaktzeit im Experiment muss wesentlich länger sein als die größte benötigte Kreuzpolarisationszeit T_{CH} , damit alle Kohlenstoffatome gleichermaßen kreuzpolarisiert sind. Sie muss aber auch wesentlich kleiner als die kleinste Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierendem Device $T_{1\rho\text{H}}$ sein, damit die Magnetisierung der sich im Spin-Lock befindlichen Protonen während der Kontaktphase gleich bleibt [Sullivan und Maciel 1982]:

$$T_{\text{CH}} \ll CT \ll T_{1\rho\text{H}} \qquad \text{Gleichung 3.10}$$

Duarte et al. [2001] bestimmten die Zeiten aller Kohlenstoffatome von Chitin und Chitosan für das Festkörper- ^{13}C CP/MAS NMR-Experiment mit Ausnahme des Carbonylkohlenstoffes. Der maximale T_{CH} -Wert wurde von der Methylgruppe des Acetylrestes erreicht und betrug 0,19 ms. Den minimalen $T_{1\rho\text{H}}$ -Wert besaßen die Kohlenstoffatome $\text{C}_{2,3,5}$ des Chitosans mit 4,3 ms, sodass diese Bedingung mit einer Kontaktzeit von 1 ms erfüllt ist.

Für die quantitative Auswertung der relativen Kohlenstoffintensitäten sollte zusätzlich der pulse delay mindestens dem vier- bis fünffachen der langsamsten Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit $T_{1\text{H}}$ entsprechen [Sullivan und Maciel 1982]. Die maximale T_{H1} -Zeit konnte für die Methylgruppe des acetylierten Po-

lymers beobachtet werden. Sie betrug 1,18 s bei einer Standardabweichung von 15 %. Um alle störenden Einflüsse auszuschließen, sollte der pulse delay unter Berücksichtigung der Messungenauigkeit folglich mindestens $(1,18 + 1,18 \cdot 0,15) \text{ s} \cdot 5 = 6,8 \text{ s}$ betragen. In allen bisherigen Arbeiten wurden kürzere Delays benutzt (Rinaudo et al. [1992] 1 s, Raymond et al. [1993] und Ottoy et al. [1996b] 3 s, Heux et al. [2000] 4 s, Duarte et al. [2001] 5 s). In dieser Arbeit wurden zur Optimierung der quantitativen Auswertung alle Messungen mit einem pulse delay von 10 s durchgeführt.

3.3.2.4 Spektrenauswertung ^{13}C -NMR

Die Abb. 3.25 zeigt die Spektren von dem Chitosanhydrochlorid CL310 und der Chitosanbase TM615, die erwartungsgemäß schlechter aufgelöst sind als die der Protonenresonanzspektroskopie.

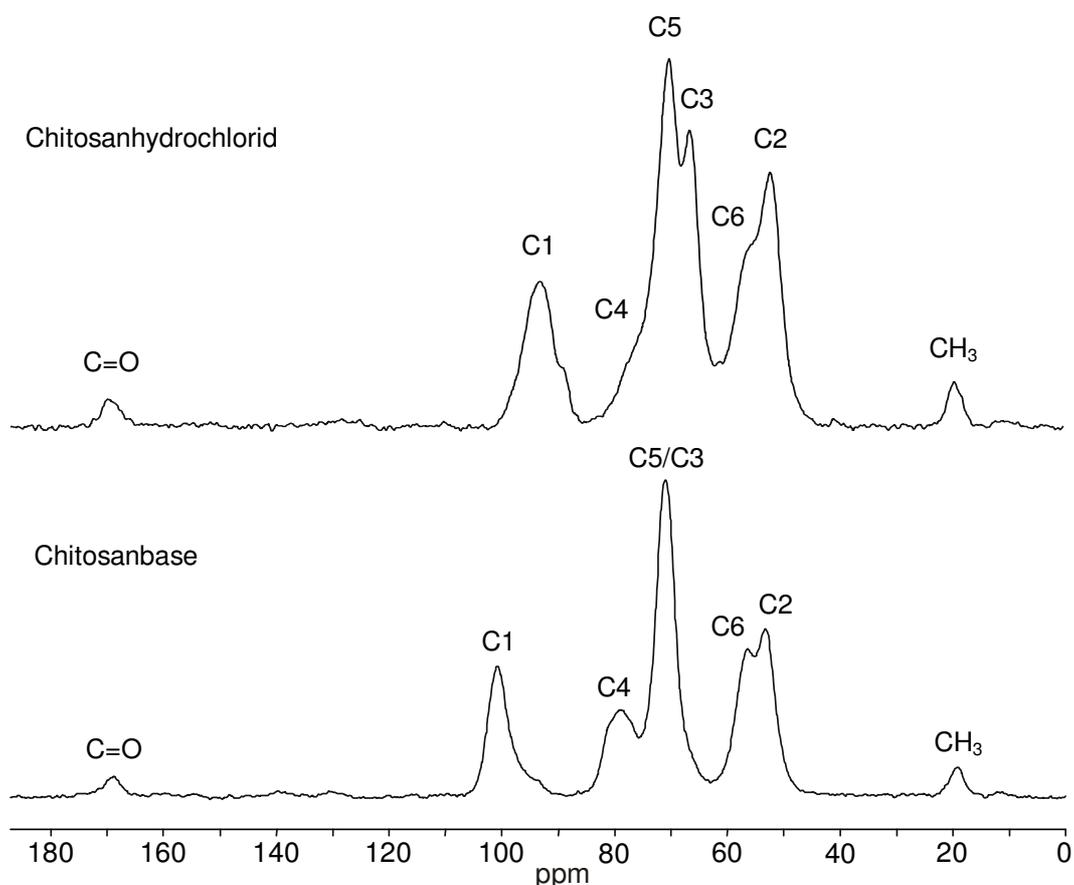


Abb. 3.25 ^{13}C -NMR-Spektrum von Chitosanhydrochlorid und Chitosanbase

In der Tab. 3.7 wurden die dazugehörigen chemischen Verschiebungen aufgeführt. Durch die geringere Elektronendichte an C2 des Chitosankations, sind die Banden der Kohlenstoffatome C1, 2, 3 und 4 im Vergleich zur Chitosanbase leicht hochfeldverschoben.

Tab. 3.7 Chemische Verschiebungen der Kohlenstoffresonanzen von Chitosan

Kohlenstoff	chem. Verschiebung [ppm]	chem. Verschiebung [ppm]
	Chitosanhydrochlorid	Chitosanbase
CH ₃	19,7	19,4
C2	52,5	53,2
C6	56,5	56,4
C3	66,8	} 70,8
C5	} 70,4	
C4		
C1	93,4	100,7
CO	170,1	168,8

Für die Berechnung des Deacetylierungsgrades wurden die Intensitäten der Kohlenstoffpeaks in folgende Formeln eingesetzt:

$$DD(C - NMR_{CO}) = \left(1 - \frac{6 \cdot CO}{\sum_{i=1}^6 C_i} \right) \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 3.11}$$

$$DD(C - NMR_{CH_3}) = \left(1 - \frac{6 \cdot CH_3}{\sum_{i=1}^6 C_i} \right) \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 3.12}$$

3.3.3 Bestimmung des Deacetylierungsgrades mit Hilfe des Partikelladungsdetektors

Die Funktionsweise des Partikelladungsdetektors (PCD) wurde im Kapitel 2.3.2 und die genaue Vorgehensweise der Titration im Anhang unter 6.2.3.3 beschrieben. Die Untersuchungen wurden in zwei verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Zum einen wurde eine exakt eingewogene Menge Chitosan in dessen gebräuchlichsten Lösungsmittel, einer 1 %-igen Essigsäure, gelöst. Zum anderen wurde eine 0,01 M Salzsäure für die Bestimmung verwendet und die beiden Ergebnisse miteinander verglichen. Um eine Veränderung des pH-Wertes während der Titration zu vermeiden, wurde das Titrationsmittel (Polyethylensulfonsaures Natrium – PES) mit dem gleichen Lösungsmittel wie die Probe angesetzt. Die Ladung der Polymere wurde während der automatischen Titration online aufgezeichnet, und man erhielt einen sigmoiden Verlauf vom positiven in den negativen Potentialbereich. Der Endpunkt ergab sich aus dem verbrauchten Volumen der PES-Lösung am Ladungsneutralpunkt (V_{IEP}).

Der Deacetylierungsgrad berechnet sich aus dem Anzahlverhältnis der deacetylierten Monomere (n_D) zu der Gesamtanzahl aus acetylierten (n_A) und deacetylierten Einheiten:

$$DD(PCD) = \frac{n_D}{n_D + n_A} = \frac{1}{\frac{n_A}{n_D} + 1} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

Jede deacetylierte Einheit trägt eine positive Ladung, die am Endpunkt durch eine negative Ladung des PES-Moleküls (n_P) neutralisiert vorliegt. Die Anzahl der acetylierten Einheiten berechnet sich aus deren Masse (m_A) und Molekulargewicht (M_A). Damit ergibt sich für den Term (n_A/n_D):

$$\frac{n_A}{n_D} = \frac{\frac{m_A}{M_A}}{n_P} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Die Masse der acetylierten Monomere entspricht der Differenz aus Gesamtmasse (m_T) und Masse der deacetylierten Einheiten (m_D). Da m_D dem Produkt aus deren Anzahl und Molmasse entspricht, und die Anzahl der deacetylierten Monomere am Ladungsneutralpunkt mit der Anzahl der PES-Ladungen identisch ist, folgt:

$$\frac{n_A}{n_D} = \frac{\frac{m_T - m_D}{M_A}}{n_P} = \frac{m_T - n_P \cdot M_D}{M_A} = \left(\frac{m_T}{n_P} - M_D \right) \cdot \frac{1}{M_A} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

Wird die Gleichung 3.15 in Gleichung 3.13 eingesetzt, ergibt sich für den Deacetylierungsgrad:

$$DD(PCD) = \frac{1}{\left(\frac{m_T}{n_P} - M_D \right) \cdot \frac{1}{M_A} + 1} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

Die Anzahl der Ladungsmengen (n_P) entspricht dem Produkt aus der Konzentration der Ladungsäquivalente ($c_{\text{äq}}$) und dem Verbrauch an PES-Lösung bis zum Ladungsneutralpunkt (V_{IEP}), sodass folgt:

$$DD(PCD) = \frac{1}{\left(\frac{m_T}{c_{\text{äq}} \cdot V_{\text{IEP}}} - M_D \right) \cdot \frac{1}{M_A} + 1} \quad \text{Gleichung 3.17}$$

Bei der Gesamtmasse der Probe ist die Restfeuchte und der Aschegehalt zu berücksichtigen. Die Konzentration der Maßlösung ist wie die Molmassen der

Monomere bekannt, sodass der Deacetylierungsgrad aus dem benötigten Volumen berechnet werden kann. Wird statt der Chitosanbase das Hydrochlorid eingesetzt, ist das um das Chloridion korrigierte Molekulargewicht des deacetylierten Monomeres zu berücksichtigen.

3.3.4 Ergebnisse

Für die Überprüfung des Titrationsverfahrens mit Hilfe des Partikelladungsdetektors wurden handelsübliche Chitosane verschiedener Hersteller mit möglichst unterschiedlichen Molekulargewichten und Deacetylierungsgraden gewählt:

Tab. 3.8 Übersicht der Chitosane zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades

Probe	Charge	Trockenrückstand [%]	Asche [%]	M _w [g/mol]	DD [%]
Chitoclear™	TM1070	94,5	0,4	173.050	99,9
Primex Chitosan	TM615	93,2	0,4	64.500	95,0
Primex Chitosan	TD127	94,6	0,4	89.990	92,2
Chitopure®	CP014	92,4	0,2	87.500	92,0
Primex Chitosan	MD4	91,5	1,5	187.700	86,5
Seacure	CL310	89,6	0,0	400.000	84,0
Chitopure®	CP026	92,2	0,1	530.000	73,6

Die hier aufgeführten Trockenrückstände wurden kurz vor der Messung bestimmt, da sich diese Werte durch die Lagerung erheblich ändern können. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe der GPC/MALLS bestimmt. Die angegebenen Deacetylierungsgrade sind den Analysenzertifikaten der Hersteller entnommen worden. Die Werte der Chargen TM615 und TM1070 wurden demnach kolloidtitrimetrisch bestimmt, wobei die Endpunktmethode nicht angegeben wurde. Bei allen anderen Chitosanen wurden die Bestimmungsmethoden auf den Zertifikaten nicht genannt.

Die Tab. 3.9 zeigt die Ergebnisse der Ladungstitrimetrie und der Kernresonanzspektroskopie. In der zweiten Titelzeile ist bei der Titrationsmethode das jeweilige Lösungsmittel, Essigsäure (HAc) beziehungsweise Salzsäure (HCl), und bei der Kernresonanzspektroskopie die jeweilige Auswertemethode angegeben.

Tab. 3.9 Ergebnisse der verschiedenen Bestimmungsmethoden

Probe	PCD		H-NMR		C-NMR	
	HCl	HAc	1	2	CO	CH ₃
TM1070	95,7	96,8	96,8	96,7	92,4	92,7
TM615	88,4	87,6	89,4	88,7	88,7	86,3
TD127	97,2	97,0	96,9	96,2	96,3	92,7
CP014	98,6	98,6	98,5	98,3	97,8	96,2
MD4	91,2	90,7	92,2	91,7	90,1	84,5
CL310	89,1	87,8	90,0	89,7	87,2	85,1
CP026	79,5	78,2	78,9	80,0	88,1	82,0

Bei genauer Bestimmung des Trockengewichtes und einer sorgfältigen Durchführung der Titration liegt der Fehler unter 2 %. Der höchste Variationskoeffizient der Kolloidtitration betrug 0,8 %. Der Standardfehler für die Protonenresonanzspektroskopie wurde von der ASTM unter 1 % beziffert, während dieser bei Festkörper-C-NMR-Spektroskopie bei ± 5 % liegt [Heux et al. 2000]. Man erkennt eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse der Titration in beiden Lösungsmitteln mit denen der Protonenresonanzspektroskopie. Die größere Fehleranfälligkeit der Festkörperresonanzspektroskopie wird vor allem bei der Betrachtung der Chargen TM 1070 und CP026 deutlich. Die Berechnung der Deacetylierungsgrade über die Carbonylbande ergab durchschnittlich höhere Werte als die über die Methylgruppe des Acetylrestes. Dies ist damit zu erklären, dass nach einer Kontaktzeit von 1 ms alle Kohlenstoffe des Polysaccharidgerüsts und das der Methylgruppe 88 % der theoretischen Gesamtmagnetisierung erreicht haben und der Carbonylkohlenstoff nur 84 % [Heux et al. 2000]. Die

gemessene Resonanz fällt also relativ gesehen zu niedrig aus und sollte zu falsch größeren Deacetylierungsgraden führen. Nicht erklärbar ist nur, dass diese näher an den mittels H-NMR und Titration ermittelten Werte liegen, und die Deacetylierungsgrade der C-NMR_{CH₃}-Auswertung durchschnittlich zu klein ausfielen.

Vergleicht man die Verfahren untereinander, erkennt man eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen des Partikelladungsdetektors und der Protonenresonanzspektroskopie. Ein Beispiel ist in der Abb. 3.26 wiedergegeben, in der die gute Linearität und die gleichzeitig geringen Standardabweichungen deutlich werden.

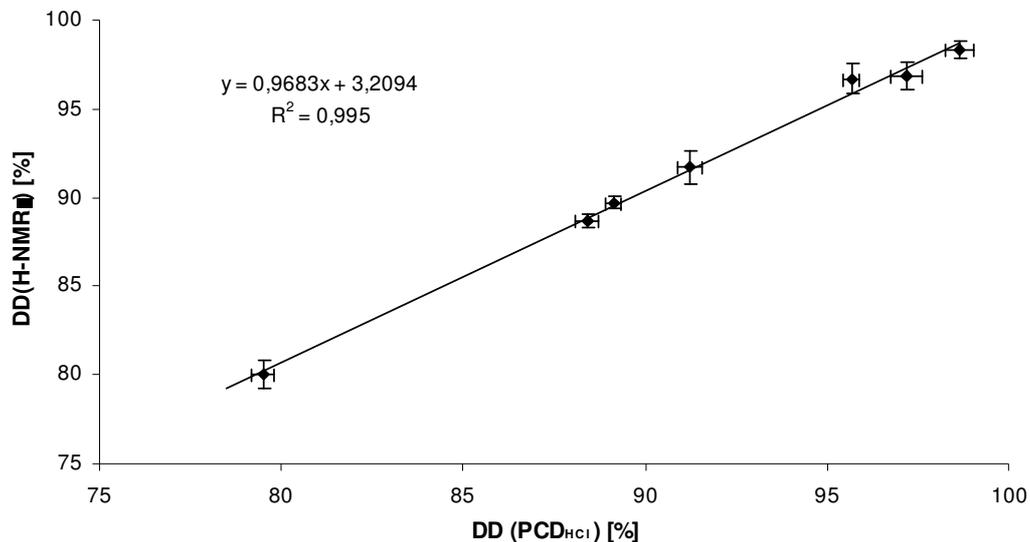


Abb. 3.26 Vergleich der Deacetylierungsgrade der Kolloidtitration

Die Auswertemethode 2 der ASTM, in der die Resonanzintensitäten der Protonen an den Kohlenstoffen C₃-C₆ nicht berücksichtigt wurden, zeigt leicht höhere Bestimmtheitsmasse (R^2) als die Methode 1, in der alle Protonenresonanzen zur Auswertung herangezogen worden sind (Tab. 3.10). Allerdings erreichen dort die Steigungen eher den Sollwert 1 und die Achsenabschnitte liegen näher an 0, sodass die Auswertemethode 1 zwar geringfügig weniger präzise, dafür aber richtiger ist. Die Werte der Festkörperresonanzspektroskopie zeigen keine guten Korrelationen mit denen der beiden anderen Verfahren. Die geringsten Werte

für Steigung und Bestimmtheitsmaß ergaben die Auswertungen mit Hilfe der Carbonylbande. Diese ist am weitesten tiefeldverschoben und im Vergleich zur Methylbande sehr breit. Eine Auswertung, vor allem bei sehr geringer Acetylierung, fällt dadurch schwerer. Dennoch sollte beachtet werden, dass die Deacetylierungsgrade im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Methode in dem Bereich der angegebenen Fehlergrenzen von $\pm 5\%$ liegen.

Tab. 3.10 Vergleich der Methoden zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades

		H-NMR ₁	H-NMR ₂	C-NMR _{CO}	C-NMR _{CH₃}
PCD_{HCl}	m	1,02	0,968	0,524	0,735
	b	-1,67	3,21	43,7	21,33
	R²	0,9903	0,9950	0,6891	0,8223
PCD_{HAc}	m	0,924	0,870	0,475	0,676
	b	7,77	12,5	48,3	27,0
	R²	0,9862	0,9940	0,6853	0,8381

Bei der Titration der Chitosane wurde die PES-Lösung bis kurz vor den isoelektrischen Punkt in einem Zug zugegeben. Danach wurde mit einer Titrationsgeschwindigkeit zwischen 0,05 oder 0,1 ml/10 s bis kurz über den Ladungsneutralpunkt hinaus titriert, der für die Berechnung des Deacetylierungsgrades herangezogen wurde. Die Titrationsgeschwindigkeit war für eine abgeschlossene Komplexierung ausreichend langsam, erkennbar durch das jeweils nach jedem Titrationsschritt entstehende stabile Potential, das sich auch am Ende der Titration nicht mehr veränderte. Bei wesentlich langsamerer Zugabe der PES-Lösung änderte sich das Ergebnis der Titration in Salzsäure nicht. Wurden die in Essigsäure gelösten Chitosane sehr langsam titriert (0,005 ml/15 s), wurden jedoch mit zunehmender Acetylierung niedrigere Deacetylierungsgrade gefunden, wobei das Bestimmtheitsmaß beim Vergleich mit den H-NMR-Daten unverändert hoch blieb (Abb. 3.27).

Chitosan liegt in saurer Lösung als expandiertes, durchspültes, zufälliges Knäuel vor und alle geladenen Gruppen sind für elektrostatische Interaktionen zugänglich [Fredheim und Christensen 2003]. Unter einem pH-Wert von 3,7 ist Chitosan vollständig dissoziiert [Sorlier et al. 2001]. Bei einer zügigen Titration werden alle Ladungen von dem sehr flexiblen PES-Polymer quantitativ abgesättigt, sodass die ungeladenen Komplexe am isoelektrischen Punkt zum Teil ausfallen. Bei einer sehr langsamen Titration kann es durch die geringer werdenden Abstoßungskräfte und die steigenden hydrophoben Wechselwirkungen zu einer Präzipitation vor dem isoelektrischen Punkt kommen. Hierbei können einige positive Ladungen des Chitosans eingeschlossen werden, sodass weniger Maßlösung verbraucht wird. Trotzdem werden die Chloridionen in leicht geflockten Systemen durch die PES-Moleküle ausgetauscht, da diese sehr beweglich bleiben. Dies war bei einer langsamen Titration in Salzsäure zu beobachten, bei der die Gleichgewichtseinstellung im Vergleich zu einer zügigen Titration unerwartet schleppend verlief. Der ermittelte Ladungsneutralpunkt war aber bei beiden Durchführungen identisch.

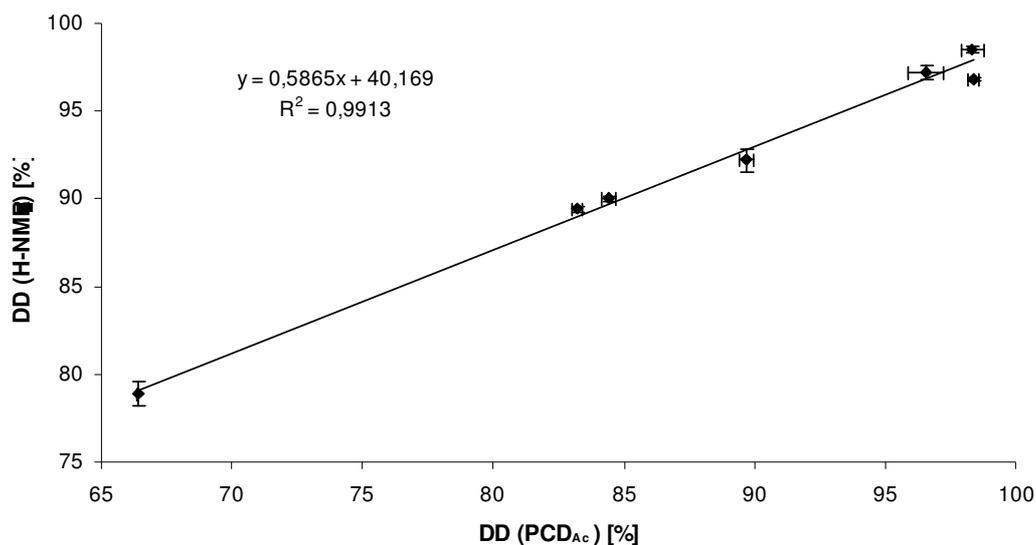


Abb. 3.27 Langsame Titration von Chitosanen in 1 %-iger Essigsäure

Mit steigender Acetylierung neigt Chitosan aufgrund der stärker werdenden hydrophoben Wechselwirkungen vermehrt zur Selbstaggregation. Hierfür sind vor allem die intramolekularen Interaktionen der Acetylgruppen verantwortlich [Ottoy et al. 1996a]. Wird Essigsäure als Lösungsmittel verwendet, beteiligen sich die Acetationen an diesem Vorgang. Je höher die Acetylierung, desto stärker ist der Effekt. Wird extrem langsam titriert, entstehen Präzipitate, deren eingeschlossene positive Ladungen aufgrund der starken hydrophoben Wechselwirkungen nicht mehr für das Polyanion erreichbar sind. Es wird zunehmend weniger Maßlösung verbraucht und man erhält falsch niedrige Deacetylierungsgrade. Diese Tendenz war schon bei einer zügigen Titration leicht zu erkennen. Somit ist die Titrationsgeschwindigkeit für die Bestimmung des Deacetylierungsgrades in Essigsäure von entscheidender Bedeutung. Das Lösungsmittel der Wahl ist daher die Salzsäure, in der robustere Ergebnisse erhalten werden, die sehr gut mit den H-NMR-Ergebnissen übereinstimmen.

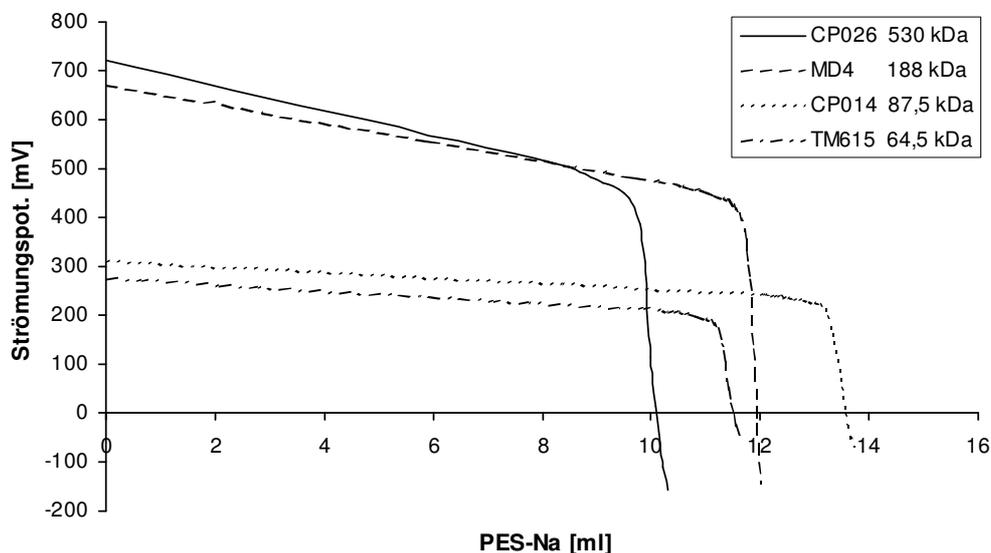


Abb. 3.28 Abhängigkeit des Startpotentials vom Molekulargewicht der Chitosanpolymere

Da das absolute Strömungspotential nur von den an der Teflonwandung adsorbierten Menge an Chitosanmolekülen abhängt, können bei gleichen Versuchs-

bedingungen Aussagen über das Adsorptionsverhalten der Polymere getroffen werden. Die Adsorption hängt hauptsächlich von der Kettenlänge des Chitosanmoleküls ab, sodass mit hohen Molekulargewichten hohe Ausgangspotentiale beobachtet werden können (Abb. 3.28). Wegen der großen Anfälligkeit der absoluten Potentialwerte durch verschiedenste Faktoren wie Temperatur, Konzentration, Ionenstärke und vor allem Fremdionen- oder -moleküle ist eine quantitative Auswertung jedoch nicht empfehlenswert. Die Potentialverläufe genügen jedoch zur groben Abschätzung der Polymerisationsgrade.

3.3.5 Vergleich der ermittelten Deacetylierungsgrade mit den Herstellerangaben

Auf die zum Teil großen Diskrepanzen zwischen Herstellerangaben und Laborergebnissen wiesen schon Rege und Block [1999] bei der Verwendung von Chitosanen der Lieferanten Fluka Chemie und Sigma Chemical Co. hin. Allerdings verwendeten sie zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades die ungenauere IR-Spektroskopie. Die in dieser Arbeit untersuchten Chitosane der in Tab. 3.11 angegebenen Hersteller ergaben ebenfalls zum Teil stark abweichende Ergebnisse.

Tab. 3.11 Vergleich der ermittelten Deacetylierungsgrade mit den Herstellerangaben

Probe	Hersteller	Herstellerangabe	PCD _{HCl}	H-NMR ₁
CP014	Fish Contract	92,0	98,6	98,5
TD127	Primex	92,2	97,2	96,9
TM1070	Primex	99,9	95,7	96,8
MD4	Primex	86,5	91,2	92,2
CL310	Pronova	84,0	89,1	90,0
TM615	Primex	95,0	88,4	89,4
CP026	Fish Contract	73,6	79,5	78,9

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Ladungstitrimetrie in Salzsäure und die der Protonenresonanzspektroskopie als genaueste Methoden herangezogen. Es wurde die Auswertemethode 1 gewählt, da dort alle Peaks des Spektrums berücksichtigt wurden. Die Herstellerangaben decken sich nicht mit den Ergebnissen dieser Untersuchung, die durch drei verschiedenen Verfahren abgesichert worden sind. Es sind auch keine systematischen Abweichungen selbst innerhalb der Chitosane eines Herstellers zu erkennen. Dieses Ergebnis macht den Bedarf nach einer zuverlässigen, einfachen Standardmethode deutlich.

3.3.6 Zusammenfassung

Die Protonenresonanzspektroskopie liefert eine sehr gute Signalaufspaltung bei der Untersuchung von kurzkettigen Chitosanen in deuterierter, verdünnter Salzsäure. Langkettige liefern nach einer Ultraschallentgasung im 300 MHz-Spektrometer eine ausreichend gute Aufspaltung der entscheidenden Resonanzsignale zur Berechnung des Deacetylierungsgrades, sodass eine vorhergehende Spaltung der Polymere durch salpetrige Säure nicht notwendig ist. Die Mess-temperatur sollte zwischen 330 und 340 K liegen. In diesem Bereich wird keine Bande durch das HDO-Signal gestört, und eine Zersetzung der Probe ist während der Messung nicht zu befürchten. Hierdurch schwindet die Gefahr einer Deacetylierung und der Zeitaufwand wird minimiert. Die empfindliche Protonenresonanzspektroskopie zeigt sich hier als Methode der Wahl für eine möglichst genaue Bestimmung von säurelöslichen Chitosanen. Durch die hohen Anschaffungs- und Betriebskosten des Gerätes kommt sie als Routinemethode nur wenig in Betracht. Sie kann aber sehr gut zur Kalibration von kostengünstigeren Verfahren eingesetzt werden.

Die Festkörper-C-NMR-Spektroskopie ist eine sehr zeitaufwendige Methode, deren Ergebnisse trotz optimierter Messbedingungen größere Schwankungen unterliegen. Sie eignet sich für die Analyse von unlöslichen Chitinen oder Chitosanderivaten, ist aber wegen der langen Messzeiten und des großen Standard-

fehlers nicht für die routinemäßige Untersuchung von Säure löslichen Chitosanen sinnvoll.

Eine neue, präzise, preiswerte und einfache Alternative zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades stellt die Kolloidtitration mit Hilfe des Partikelladungsdetektors dar. Durch die Verwendung von Salzsäure als Lösungsmittel ist eine 1:1-Stöchiometrie bei der Titration von Chitosan mit Polyethylensulfonsaurem Natrium erreichbar, während Essigsäure bei extrem langsamer Titration und schwächer deacetylierten Proben zu falsch niedrigen Werten führt. Bei einer sorgfältigen Durchführung des Titrationsexperimentes in Salzsäure zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades von Chitosanen, stehen die erhaltenen Ergebnisse denen der Protonenresonanzspektroskopie in ihrer Richtigkeit nicht nach. Da Chitosane im allgemeinen in verdünnter Mineralsäure löslich sind, eignet sich diese Methode für eine routinemäßige Untersuchung des Biopolymeres.

3.4 Mikro- und Nanopartikel als Träger von Vakzinen

3.4.1 Einleitung

Mikro- und Nanopartikel haben sich als vorteilhafte Adjuvantien bei der Vakzination durch Plasmid-DNA erwiesen [Singh 2000]. Die Voraussetzungen, die ein solcher Träger mit sich bringen sollte, sind:

- eine möglichst hohe Biokompatibilität, das bedeutet untoxisch, nicht immunogen und bioabbaubar
- Fähigkeit zur Komplexierung von DNA
- Schutz der DNA vor Nukleasen
- Unterstützung des Transportes in die immunkompetente Zelle
- Freisetzung der DNA in der Zelle

Chitosane zeigten bisher gute Eigenschaften in bezug auf die oben aufgeführten Punkte (vgl. Kap. 2.1 und 2.4.2). Kurzkettige Chitosane sind langkettigen im Hinblick auf die Biokompatibilität überlegen (vgl. Kap. 2.2). Sie zeigen jedoch bei der Herstellung von Nanopartikeln durch Fällung mit reiner DNA sehr unbefriedigende Komplexierungseigenschaften und führen damit zu keiner Verbesserung der Aufnahme im Vergleich zur nackten DNA [MacLaughlin et al. 1998]. Bei der Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln sind toxische Substanzen möglichst zu vermeiden, da Rückstände nicht auszuschließen sind und bei einem Verzicht eine möglicherweise komplizierte Rückstandsanalytik nicht mehr notwendig ist. Die aufwendigen Emulsionsverfahren, bei denen meist organische Lösungsmittel eingesetzt werden, scheiden damit genauso aus, wie die Verwendung von Glutaraldehyd als Quervernetzer [Carreno-Gomez und Duncan 1997]. Die Präzipitation von Chitosan mit Sulfatanionen nach Berthold et al. [1996] stellt ein einfaches Verfahren zur Herstellung von untoxischen Mikropartikeln dar. Ob sich diese Methode für die Herstellung von Mikropartikeln aus kurzkettigen Chitosanen eignet, wurde bisher noch nicht gezeigt. Tripolyphosphat geht

eine noch stärkere ionische Bindung mit dem Polykation Chitosan ein [Shu und Zhu 2002b]. Beim Vereinen der wässrigen Lösungen, bildet sich unter Rühren spontan eine stabile Nanopartikelsuspension. Tripolyphosphat ist untoxisch und eignet sich damit sehr gut für die Herstellung von Chitosanpartikeln für die parenterale Applikation [Ko et al. 2002].

Tabata und Ikada [1988] untersuchten verschieden geladene Polystyrol-, Polyacrolein-, und Cellulose-Mikropartikel mit unterschiedlichen Durchmessern. Geladene Partikel wurden von den Zellen besser aufgenommen als ungeladene und die positiv geladenen wiederum besser als die negativ geladenen Partikel. Die optimale Größe für die Phagozytose bei Maus-Makrophagen lag zwischen 1 und 2 μm . Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Singh et al. [2000], bei denen die Absorption der positiv geladenen Polylactid-co-glycolid-Partikel umgekehrt proportional zu der Teilchengröße, die zwischen 300 nm und 1 μm lag, stieg. Einig ist man sich jedoch, dass die Teilchengröße für eine optimales Targeting der DNA für Antigen präsentierende Zellen unter 10 μm liegen sollte [Hedley 2002].

Zwei einfache Herstellungsverfahren werden auf die Eignung zur Erzeugung von biokompatiblen DNA-Trägersystemen auf der Grundlage von verschiedenen kurzkettigen Chitosanen genauer untersucht. Sowohl ein nanopartikuläres als auch ein mikropartikuläres System sollen mit möglichst hoher positiver Oberflächenladung für die Beladung mit Plasmid-DNA zur Verfügung stehen. Nach der Beladung mit einer Plasmid-DNA, die ein fluoreszierenden Proteinfarbstoff kodiert, kann der Erfolg der Transfektion über den exprimierten Farbstoff mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

3.4.2 Herstellung von Mikropartikeln durch Fällung mit Natriumsulfat

Die Mikropartikel wurden in Anlehnung an das von Berthold et al. [1996] eingeführte Präzipitationsverfahren von Chitosan mit Natriumsulfat hergestellt. Hierfür wurde zunächst das Chitosan in einer Konzentration von 0,25 % in 200 ml

zweiprozentiger Essigsäure gelöst. Nach der Zugabe von 1 % Tween[®] 80 wurde das Glasgefäß, wie in Abb. 3.29 gezeigt, in ein Ultraschallbad eingehängt. Unter Rühren mit einem Blattrührer bei 400 U/min und Ultraschall wurden 0,5-Milliliteräquivalente einer 10 %-igen Natriumsulfatlösung tropfenweise zugegeben.

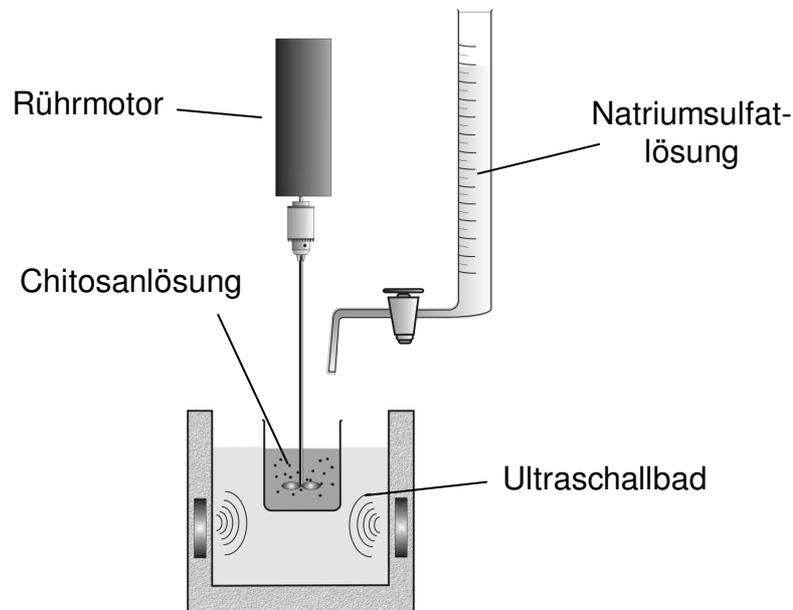


Abb. 3.29 Versuchsaufbau zur Herstellung von Mikropartikeln

Das Entstehen der Mikropartikel wurde turbidimetrisch mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers bei 500 nm verfolgt. Nach vollständiger Fällung wurden die Partikel 20 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, in Aqua ad injectabilia aufgenommen und zweimal mit Aqua ad injectabilia gewaschen. Anschließend wurden diese nach dem Standardprogramm (Kap. 6.2.4.1) gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur verschlossen gelagert. Die Mikropartikel wurden aus Chitosanen unterschiedlicher Molekulargewichte hergestellt und nachfolgend mit den in Tab. 3.12 aufgelisteten Kürzeln bezeichnet. Zunächst wurden die benötigten Sulfatmengen und die Bildungsgeschwindigkeiten der Partikel in Abhängigkeit von dem verwendeten Molekulargewicht des Chitosans beobachtet. Zu Beginn wurden alle 5 Minuten jeweils 0,5 ml bzw. alle 2,5 min 0,25 ml der Natriumsulfatlösung langsam in die Chitosanlösung ge-

tropft. Vor der Zugabe des jeweils folgenden Aliquots wurde darauf geachtet, dass sich die eingestellte Trübung nicht mehr änderte. Nach einer zugetropften Menge an Natriumsulfat von 2,0 ml war bei allen Molekulargewichten eine langandauernde Trübungszunahme bis zu einem Transmissionswert unter 2 % zu beobachten, sodass erst nach 80 Minuten weiter titriert wurde (Abb. 3.30).

Tab. 3.12 Kürzel der verwendeten Chitosan-Mikropartikel

Kürzel Chitosan	Molekulargewicht [g/mol]	Kürzel Mikropartikel
TD127	89.990	MP90
C54	54.100	MP54
C32	31.800	MP32
C14	14.340	MP14
C9	8.870	MP9
C3	2.610	MP3

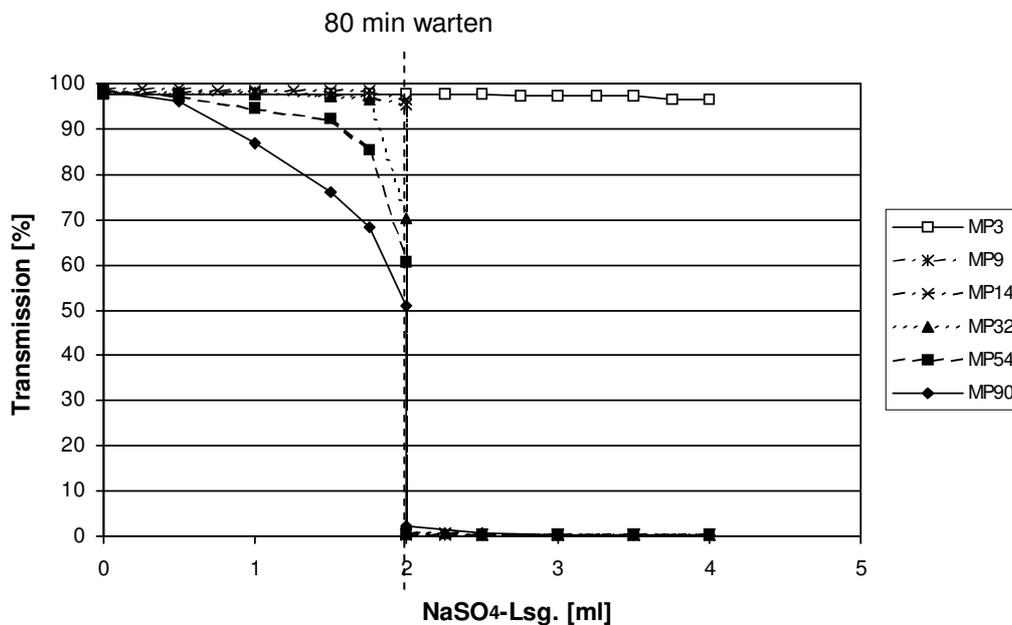


Abb. 3.30 Transmissionswerte in Abhängigkeit von der zutitrierten Menge Natriumsulfat

Kurzkettige Chitosansulfate sind besser löslich als langkettige. Dies wird durch die schnellere Abnahme der Transmissionswerte vor der Gesamtfällung bei den Partikeln MP90 – MP32 deutlich. Die Menge an Sulfat, die zur vollständigen Fällung der Chitosane notwendig ist, ist bei allen Chitosanen gleich. Die verwendeten Chitosane sind nahezu vollständig deacetyliert, sodass ab einer theoretischen Zugabemenge von 1,80 ml 10 %-iger Natriumsulfatlösung jeweils 2 Monomere des Chitosankations mit einem Sulfatanion quervernetzt werden und ausfallen. Einzige Ausnahme bildet die Charge MP3. Hier wurde erst ab einer Zugabe von 4,25 ml Sulfatlösung eine Trübung beobachtet. Die gefriergetrockneten Partikel der Charge MP3 lösten sich bei einer Redispergierung in Aqua ad injectabilia wieder auf. Das Sulfat-Salz von kurzkettigen Chitosanen unter 8800 g/mol ist also für eine Anwendung als Trägersystem nicht geeignet, da die Mikropartikel in Wasser zu leicht löslich sind.

Die Zeitabhängigkeit dieser Fällung ist in der Abb. 3.31 dargestellt.

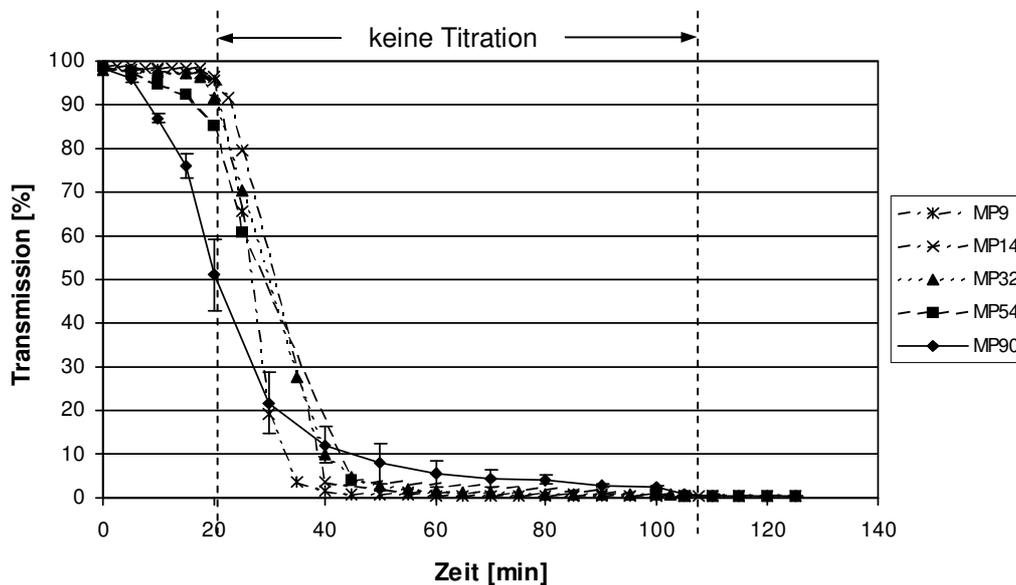


Abb. 3.31 Transmissionswerte in Abhängigkeit von der zutitrierten Menge Natriumsulfat und der Zeit

Die Fehlerbalken wurden zu Gunsten der Übersichtlichkeit nur beispielhaft für die Probe MP90 angegeben. Bis zur stöchiometrisch notwendigen Menge an Natriumsulfat vollzogen sich die Teilfällungen recht schnell. Der Transmissionswert blieb nach kurzer Zeit konstant, sodass in den oben genannten 5 bzw. 2,5-Minutenabständen weiter titriert werden konnte. Kurz über diesen Punkt hinaus, ab einer Zugabe von 2,0 ml, änderte sich der Trübungswert stetig und erlangte bei den Proben MP54 – MP9 seinen Endpunkt nach einer Gesamttitrationszeit von rund 50 Minuten und bei der Probe MP90 nach circa 100 Minuten.

3.4.3 Abhängigkeit der Partikelgröße von der Titrationsmenge

Die beschriebene Herstellung von Mikropartikeln unter Ultraschall zeigt, dass nach der Zugabe von 2,0 ml Natriumsulfatlösung die Fällung einige Zeit in Anspruch nimmt, bis sie nahezu vollständig abgelaufen ist. Wird größere Menge Natriumsulfatlösung vor der Wartezeit zugegeben, verkürzt sich die Gesamtdauer der Fällung (t_{Ges}) erwartungsgemäß auf rund 30 Minuten bei 2,5 ml (Tab. 3.13).

Tab. 3.13 Partikelgrößen und Fällungsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Mengen an Natriumsulfat

Charge	NaSO ₄ [ml]	t_{Ges} [min]	x_{50} [µm]	x_{90} [µm]
MP90a	2,0	125	1,64	3,15
MP90b	2,1	100	3,67	10,08
MP90c	2,5	30	7,17	13,78

Allerdings vergrößert sich hier mit der Natriumsulfatmenge auch der Teilchendurchmesser der Mikropartikel, der mit Hilfe der Laserdiffraktometrie bestimmt worden ist (Abb. 3.32). Angegeben wurde jeweils der mittlere Teilchendurchmesser x_{50} und der x_{90} -Wert, der Aufschluss über die Verteilungsbreite der Probe liefert.

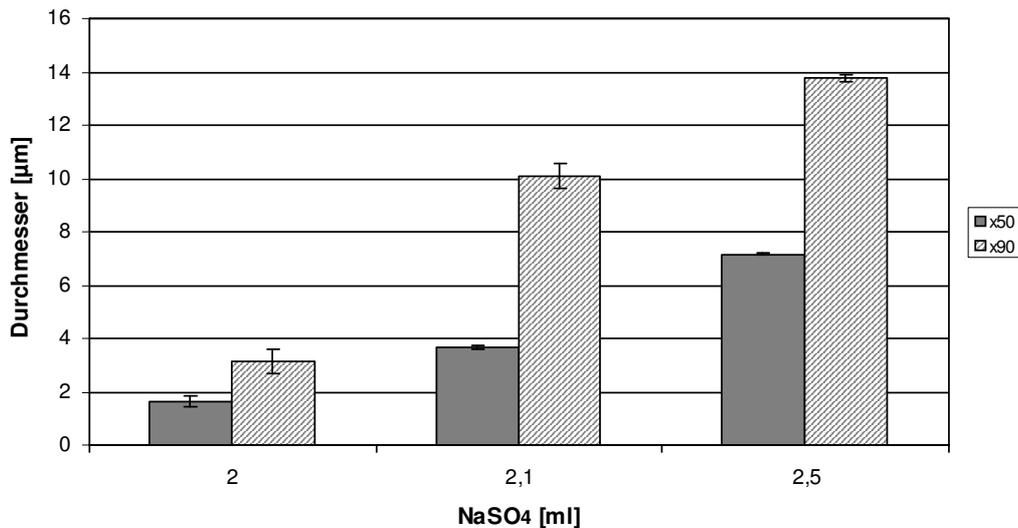


Abb. 3.32 Abhängigkeit der Partikelgröße von der zugegebenen Menge Natriumsulfat vor der Wartezeit

Wird am Anfang eine größere Menge des Fällungsmittels zugegeben, bilden sich vor allem an der Eintropfstelle schneller größere Präzipitate. Diese können trotz gleichzeitiger Ultraschallbehandlung nicht wieder vollständig zerstört werden. Wird hingegen eine geringere Menge zugegeben, bilden sich in der Dispersion nur sehr langsam Teilchen aus. Diese bleiben durch die gleichzeitige Ultraschallbehandlung von den neu entstehenden separiert, sodass der resultierende mittlere Teilchendurchmesser klein bleibt.

3.4.4 Charakterisierung der Mikropartikel in Abhängigkeit vom eingesetzten Molekulargewicht

3.4.4.1 Partikelgröße und -gestalt

Alle Partikel wurden wie im Kap. 3.4.2 beschrieben hergestellt, da dies zu den geringsten Teilchengrößen führte. Die x_{50} - und x_{90} -Werte wurden jeweils vor und nach der Gefriertrocknung bestimmt (Abb. 3.33). Die Signifikanz wurde mit Hilfe der Varianzanalyse auf einem p-Niveau von 0,05 überprüft. Die mittleren

Teilchengrößen lagen durchschnittlich bei $2,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ vor und bei $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ nach der Gefriertrocknung. Die x_{90} -Werte lagen vor der Lyophilisation bei durchschnittlich $4,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ und nach der Trocknung bei $4,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$.

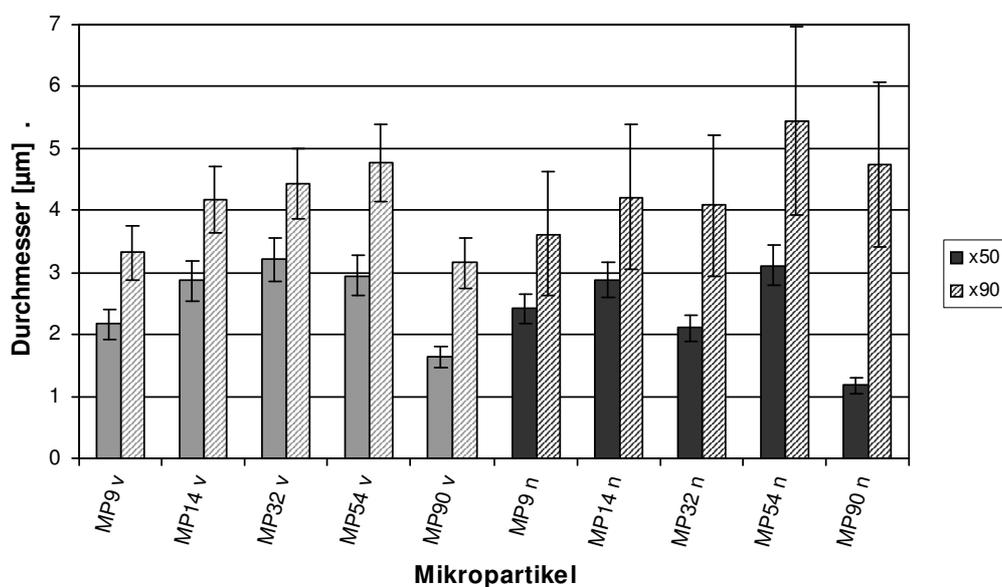


Abb. 3.33 Durchmesser der Mikropartikel vor (v) und nach (n) der Gefriertrocknung

Durch die Gefriertrocknung ändern sich die Teilchengrößen der Mikropartikel ,mit Ausnahme des Ausreißers MP32n, nicht signifikant. Der etwas höhere durchschnittliche x_{50} -Wert und die höhere Standardabweichung des x_{90} -Wertes nach der Lyophilisation ergeben sich jeweils aus dem geringen Anteil an Agglomeraten, die durch die Redispergierung im Ultraschallbad zum Teil nicht zerstört werden konnten. Die x_{50} - und x_{90} -Werte zeigen mit zunehmendem Molekulargewicht des Chitosans eine leicht steigende aber größtenteils nicht signifikante Tendenz, die mit den in Abb. 3.34 gezeigten Teilchengemetrien zusammenhängen kann. Demnach geben bei annähernd gleichem Radius die plättchenförmigen Partikel der Charge MP9 im Laserdiffraktometer niedrigere Durchmesser als die kugelförmigeren Partikel der Charge MP54. Eine Ausnahme bildet allerdings die Charge MP90, die aus dem Chitosan TD127 hergestellt

worden ist. Dieses lag im Gegensatz zu den kurzkettigeren, hydrolysierten Chitosanen als Base vor und ergab nach der Gefriertrocknung einen signifikant kleineren Durchmesser. Die sehr glatten, kugelförmigen Partikel dieser Charge scheinen allerdings eine leichte Tendenz zum Zusammenfließen zu zeigen, was sich mit der schlechteren Redispergierbarkeit und der größeren Verteilungsbreite deckt

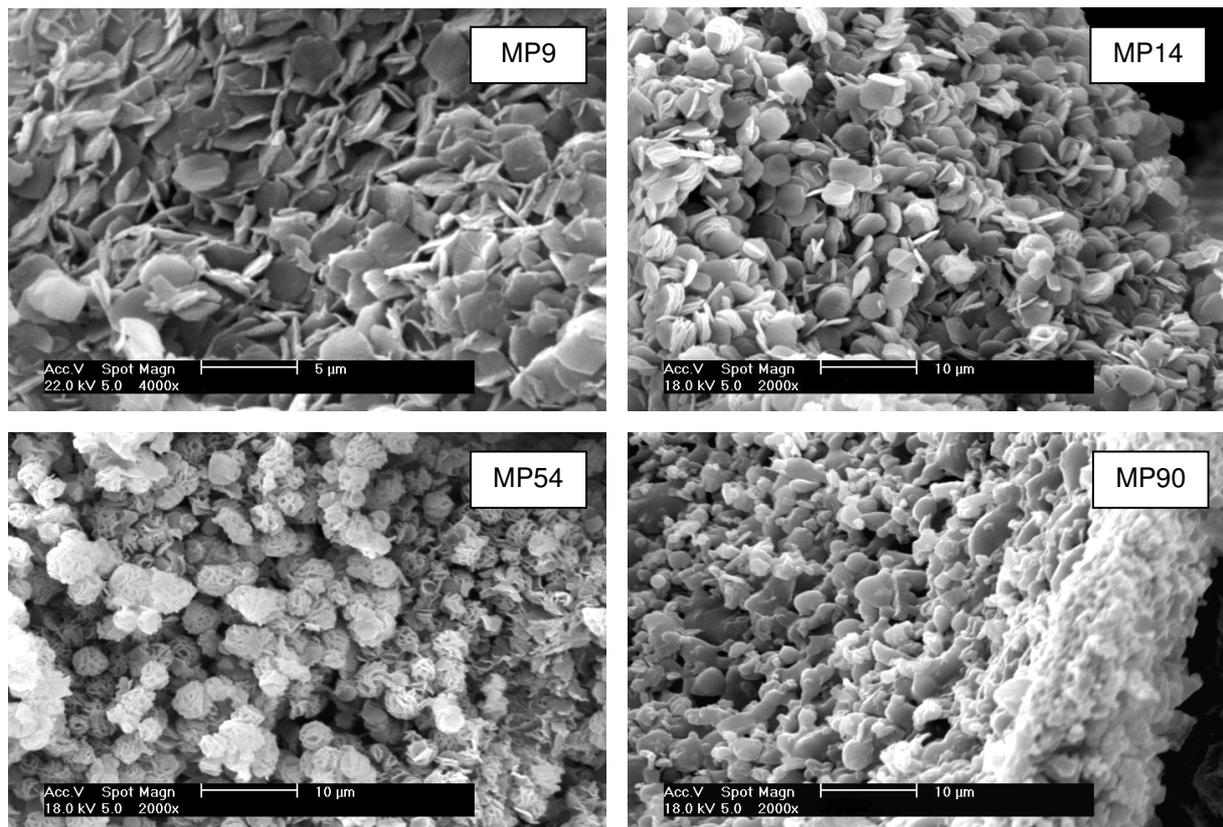


Abb. 3.34 Mikropartikel aus Chitosanen unterschiedlicher Molmassen

Die steigende Tendenz der Verteilungsbreite und der Standardabweichungen der Chitosanhydrochloride sind außerdem ein mögliches Anzeichen für eine leichtere Agglomeration der Teilchen bei der Verwendung höherer Molekulargewichte. Dies wirkte sich deutlicher nach einer 2-monatigen Lagerung aus, nach der die Chargen höherer Molekulargewichte (MP32 – MP90) nur noch sehr schwer zu redispergieren waren.

3.4.4.2 Bestimmung der Kristallinität

Eine mögliche höhere Ordnung der kurzkettingen Chitosansalze wurde mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie und der Differential Scanning Calorimetry überprüft. Bei der langkettigen Chitosanbase TD127 ist eine gewisse Teilkristallinität zu erkennen (Abb. 3.35).

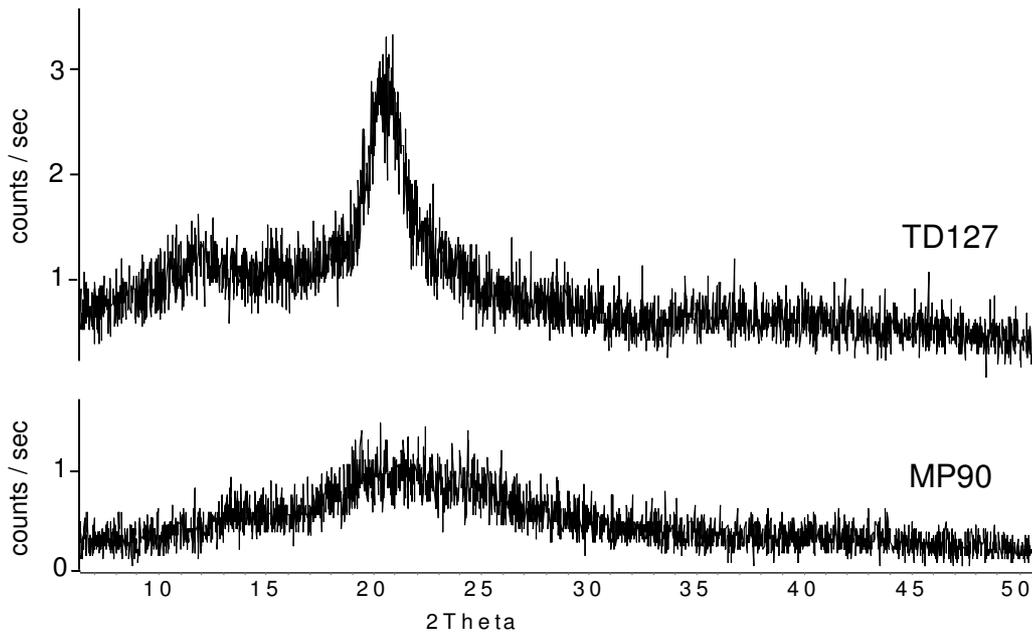


Abb. 3.35 Röntgendiffraktogramme des Chitosans TD127 und der daraus hergestellten Mikropartikel MP90

Bei der konventionellen Herstellung von Chitosan wird dies nach der Deacetylierung und Deproteinierung von Chitin neutralisiert und mehrfach mit Wasser gewaschen. Nach der langsamen Trocknung entstehen so geordnete Bereiche der Chitosanketten, deren Elementarzelle je nach eingesetztem Chitin und Abfolge der Präparation orthorhombisch oder monoklin ausfallen kann [Roberts 1992d]. Die relativ breiten Signale heben sich jedoch nur wenig vom Grundrauschen ab, was auf einen überwiegend amorphen Anteil zurückschließen lässt.

Der kristalline Anteil des kurzkettingen Chitosans C9 ist geringer als der der Ausgangsbasis TD127 (Abb. 3.36). Dies begründet sich hauptsächlich durch die hier vorliegenden Salzform des Chitosans. Durch die in der Nähe der positiven

Ladungen vorkommenden Chloridionen liegen die Moleküle weniger dicht gepackt vor und geben schwächere Signale im Röntgendiffraktometer [Roberts 1992d].

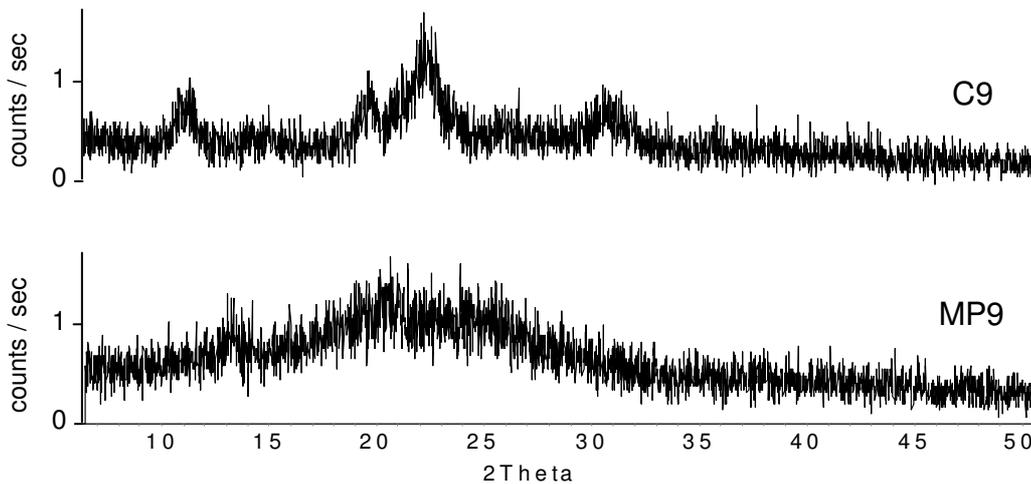


Abb. 3.36 Röntgendiffraktogramme des Chitosans C9 und der daraus hergestellten Mikropartikel MP9

Die mit Sulfat gefällten Chitosanmikropartikel liegen demnach nahezu vollständig röntgenamorph vor. Es ist so gut wie kein Unterschied beim Vergleich der verwendeten Molekulargewichte zu erkennen. Die verhältnismäßig großen Sulfatanionen stören den geordneten Aufbau der Polymere bei der Fällung unter Ultraschall unabhängig von deren Molekülgröße.

Bei der DSC-Untersuchung der Chitosan-Mikropartikel werden einzig die langgezogenen endothermen Banden deutlich, deren Maxima bei rund 100 °C liegen. Sie repräsentieren die Energien, die notwendig sind, um die Restfeuchte der Partikel zu entfernen (Abb. 3.37). Die Charge MP90, die aus der langkettigen Chitosanbase hergestellt worden sind, ergab in der normierten Darstellung im Vergleich zu den aus den Hydrochloriden hergestellten Partikeln, eine sehr flache Kurve. Hier wird deutlich, dass auch nach der Fällung durch Natriumsulfat der weniger hygroskopische Charakter der Base erhalten bleibt. Die Mikropartikel aus den kurzkettigeren Chitosanen (MP9, MP14) geben im Vergleich zu den

längerkettigeren (MP32 – MP90) schmalere Banden, deren Maxima zu niedrigeren Temperaturen verschoben sind. Das Wasser liegt in diesen folglich weniger fest gebunden vor. Kristalline Anteile sind in diesen Untersuchungen nicht erkennbar.

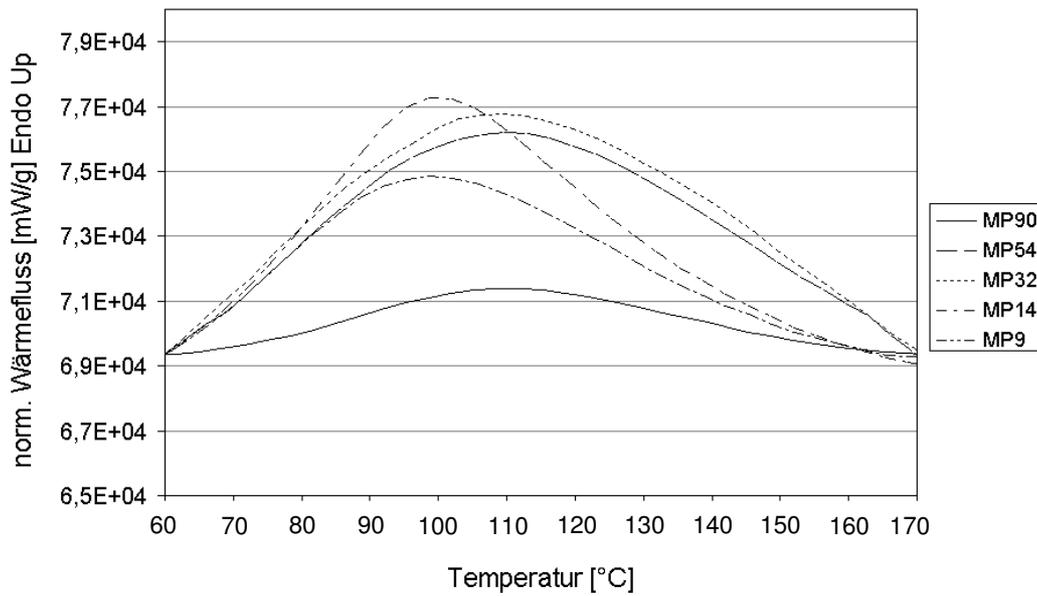


Abb. 3.37 Normierte DSC-Kurven der Mikropartikel

3.4.4.3 Zetapotential

Die Ladungskapazität der Mikropartikel für negativ geladene Plasmid-DNA wird hauptsächlich durch deren Zetapotential beeinflusst. Dieses wurde mit dem Zetasizer 3 in Abhängigkeit von dem pH-Wert und der verwendeten Kettenlänge untersucht. Für die Untersuchung der Potentiale sollte die Leitfähigkeit der Messflüssigkeit, des sogenannten Leitfähigkeitswassers, möglichst $50 \mu\text{S}/\text{cm}$ betragen. Bei einer niedrigeren Leitfähigkeit können schon leichte Leitfähigkeitsschwankungen das Zetapotential stark beeinflussen. Zur Erhöhung des Potentials werden vor allem die Salze NaCl und KCl verwendet, da diese die geringste Affinität zu Oberflächen zeigen und so den Messwert nur wenig verfä-

schen. Bei hohen Salzkonzentrationen wird die diffuse Schicht der Teilchen stärker komprimiert, sodass die zu detektierenden Unterschiede in den Zetapotentialen geringer werden [Müller 1996]. Der Einfluss der Salzkonzentration, verwendet wurde in allen Versuchen Natriumchlorid, ist bei den Chitosanmikropartikeln nur sehr gering (Abb. 3.38). Durch die Auffüllung der noch nicht vollständig besetzten Helmholtzschicht ist durch die Zugabe von Natriumchlorid zunächst ein leichtes Ansteigen des Zetapotentials zu verzeichnen, das sich ab $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ nur noch geringfügig verändert.

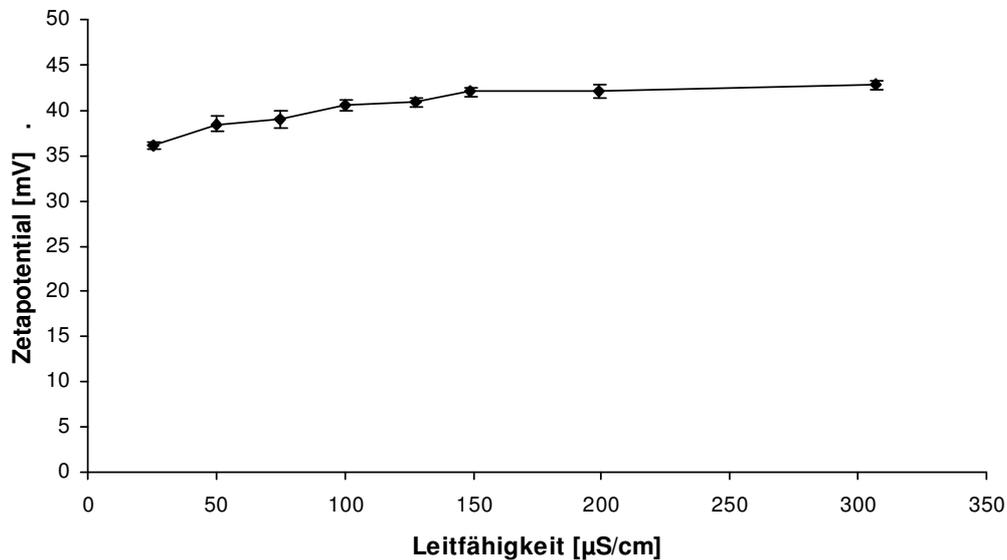


Abb. 3.38 Das Zetapotential der Probe MP90 in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit bei pH 5

Zur optimalen Vergleichbarkeit der Proben wurde für alle Versuche die gleiche Leitfähigkeit eingestellt. Das Zetapotential wurde in einem Bereich von pH 3 bis 10 untersucht (Abb. 3.39). Zum Einstellen des pH-Wertes wurde zuerst Salzsäure beziehungsweise Natronlauge verwendet, wonach dann die Leitfähigkeit durch Zusatz von Natriumchlorid korrigiert wurde. Um alle pH-Werte einstellen zu können, mussten zum Teil Säuren- bzw. Basenkonzentrationen eingesetzt werden, die eine Leitfähigkeit von bis zu $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ zur Folge hatten. Eine Ausnahme bildete die untersuchte Probe bei pH 10, bei der die Leitfähigkeit der

Lösung aufgrund der notwendig hohen Laugenkonzentration bei $140 \mu\text{S}/\text{cm}$ lag.

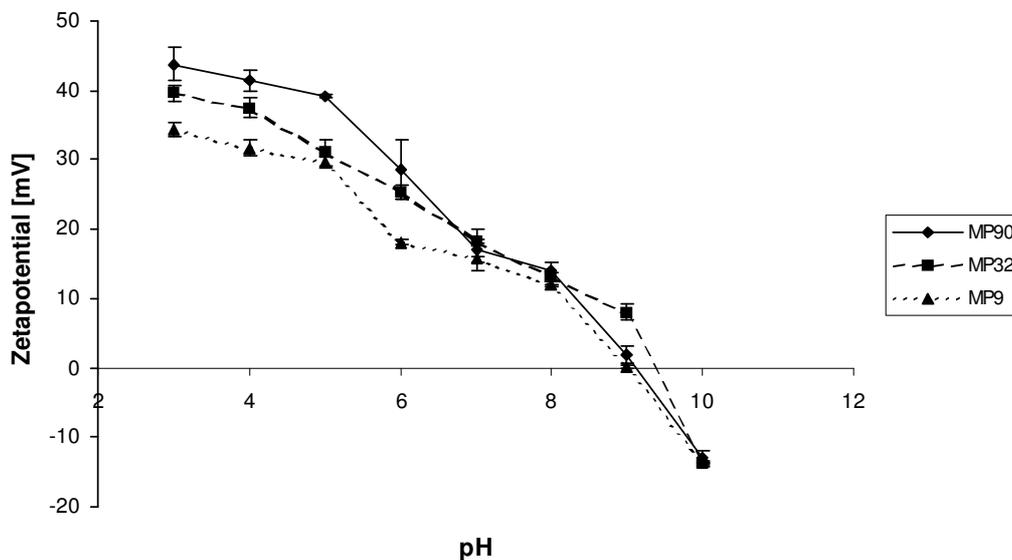


Abb. 3.39 Abhängigkeit des Zetapotentials von pH-Wert und Molekulargewicht

Werden die Partikel als Salze einer starken Säure und einer schwachen Base in Wasser dispergiert, stellt sich ein pH-Wert von 5,0 ein - ein Anzeichen für eine geringfügige Dissoziation der Teilchen.

Das Zetapotential der Mikropartikel aus langkettigem Chitosan liegt über dem der kurzkettigeren Chitosane (Abb. 3.40). Aus der Abb. 3.30 konnte man entnehmen, dass langkettige Chitosane gleichen Deacetylierungsgrades bei der Zugabe von Sulfat früher beginnen auszufallen als kurzkettige. Somit liegen mehr freie, positive Aminogruppen vor, die zu einem höheren Zetapotential führen. Bei einer Anhebung des pH-Wertes erkennt man zunächst eine sehr geringe und reversible Agglomeration unterhalb eines Potentials von +30 mV und eine stärker werdende unterhalb +20 mV zwischen pH 6,5 und 7,0. Eine Beladung der Partikel sollte deshalb bei einem pH-Wert unter 5 erfolgen.

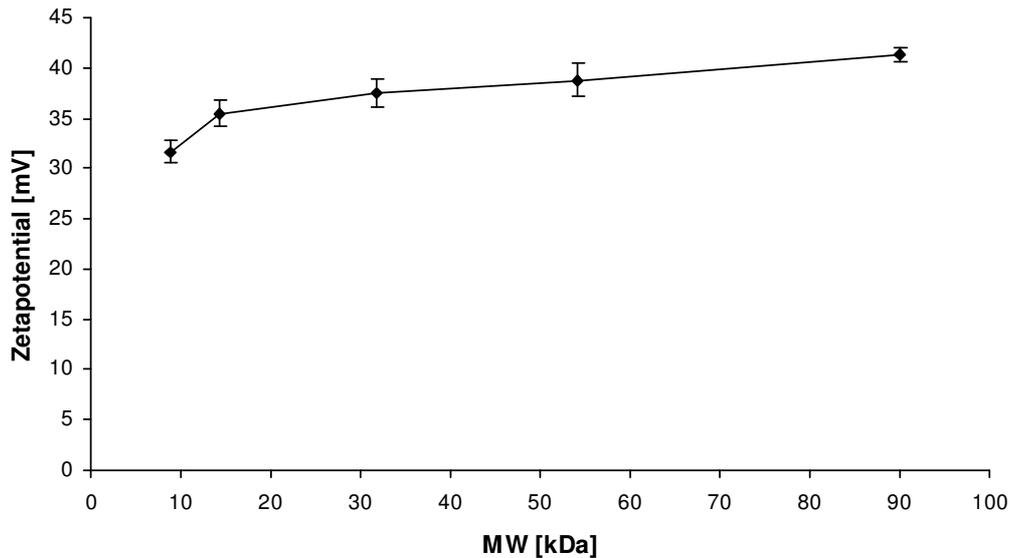


Abb. 3.40 Abhängigkeit de Zetapotentials vom Molekulargewicht bei pH 4,0

3.4.5 Herstellung von Nanopartikeln durch Fällung mit Tripolyphosphat

Für die Herstellung von schwerlöslichen Partikeln aus kurzkettigen Chitosanen unter 8.800 g/mol ist die Fällung mit Sulfat ungeeignet, da deren Löslichkeit in Wasser zu hoch ist (vgl. Kap. 3.4.2, S. 99). Calvo et al. entwickelten 1997 eine Fällungsmethode von Chitosan mit Tripolyphosphat zur Herstellung von Nanopartikeln. Shu und Zhu [2002a] überprüften die Quervernetzung von Chitosanfilmen mit Phosphat, Pyrophosphat und Tripolyphosphat. Nur Pyrophosphat und Tripolyphosphat führten zu einer ausreichend stabilen Quervernetzung der Filme. Der stabilste Film konnte aus Chitosan und Tripolyphosphat hergestellt werden, der sich selbst unter einem pH-Wert von 0,5 nicht auflöste. Mikropartikel, die mit diesem Komplex überzogen wurden, waren bis zu zehn mal stabiler als Chitosanfilme, die mit Sulfat quervernetzt worden sind [Shu und Zhu, 2002b]. Folglich ist zu erwarten, dass mit Tripolyphosphat auch mit sehr kurzkettigen Chitosanen stabilere Mikropartikel als mit Sulfat herzustellen sind.

Die Bereitung der Nanopartikel mit Tripolyphosphat ist wesentlich einfacher durchführbar als die Mikropartikelherstellung mit Natriumsulfat. Für die Her-

stellung von 14 ml Nanopartikelsuspension wurden 10 ml sterilfiltrierte Chitosanhydrochloridlösung in einer Konzentration von 2 mg/ml vorgelegt. In diese Lösung wurde 4 ml Natrium-Tripolyphosphatlösung (0,84 mg/ml) unter Rühren mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur langsam zugegeben. Nach 15 Minuten wurden die spontan entstandenen Nanopartikel abzentrifugiert und mit Aqua ad injectabilia gewaschen. Für die so hergestellten Partikel werden die in der Tab. 3.14 aufgelisteten Kürzel verwendet.

Tab. 3.14 Kürzel der verwendeten Chitosan-Nanopartikel

Kürzel Chitosan	Molekulargewicht [g/mol]	Kürzel Nanopartikel
C54	54.100	NP54
C32	31.800	NP32
C14	14.340	NP14
C9	8.870	NP9
C3a	3.090	NP3

3.4.6 Charakterisierung der Nanopartikel in Abhängigkeit vom eingesetzten Molekulargewicht

3.4.6.1 Partikelgröße

Die Größe der entstandenen Partikel wurde über die dynamische Lichtstreuung im Autosizer 2c ermittelt (Abb. 3.41). Die Varianzanalyse der Teilchengröße in Abhängigkeit von dem eingesetzten Molekulargewicht des Chitosans ergab mit einem p-Niveau von 0,05 einen nicht signifikanten Unterschied der Proben NP3 bis NP32, der durchschnittlich bei 187 nm lag. Die Probe NP54 zeigte allerdings einen geringfügig signifikant höheren Mittelwert von 243 nm, was mit den größeren Ausmaßen und der erhöhten Selbstagglomerationsneigung von langketti-

gen Chitosanen zusammenhängt, die sich meist jedoch erst bei wesentlich höheren Molekulargewichten bemerkbar machen.

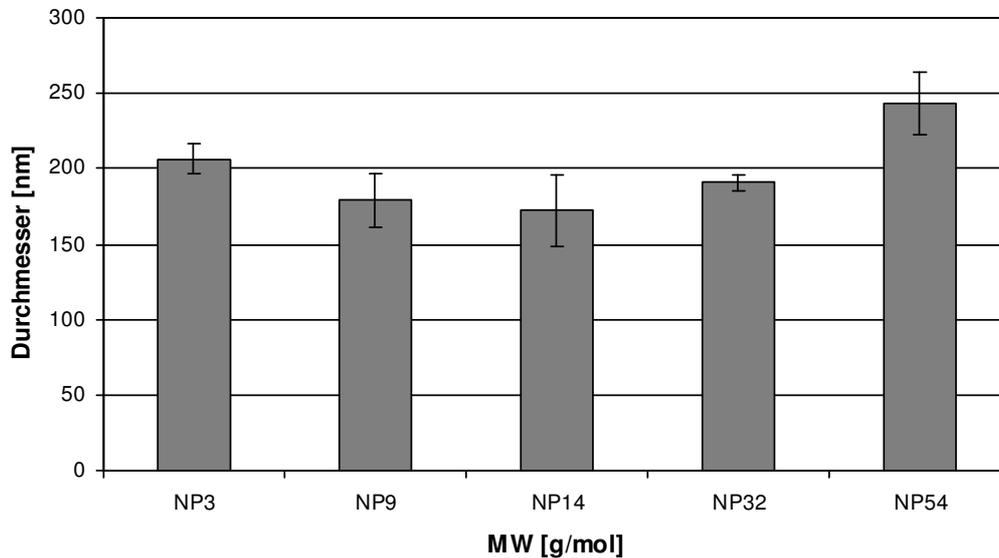


Abb. 3.41 Einfluss des Molekulargewichtes auf die Partikelgröße

3.4.6.2 Zetapotential

Für die Messung des Zetapotentials wurden die Nanopartikel in Wasser re-dispergiert und die Leitfähigkeit mit Natriumchlorid auf $90 \mu\text{S}/\text{cm}$ eingestellt. Der pH-Wert der Proben lag bei 5,1. Im Gegensatz zu den Chitosansulfatpartikeln sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen gefunden worden (Abb. 3.42). Alle vollständig deacetylierten Chitosane gingen unabhängig vom Molekulargewicht eine starke ionische Bindung mit dem Tripolyphosphat ein, sodass sich die daraus resultierenden Zetapotentiale nicht unterschieden. Auch das kurzkettigste Chitosan mit einem Molekulargewicht von 3.090 g/mol bildete ein schwer lösliches Präzipitat. Das durchschnittliche Zetapotential lag bei $+35,0 \text{ mV}$, und die Nanopartikel zeigten auch nach mehrwöchiger Lagerung keine Neigung zur Agglomeration.

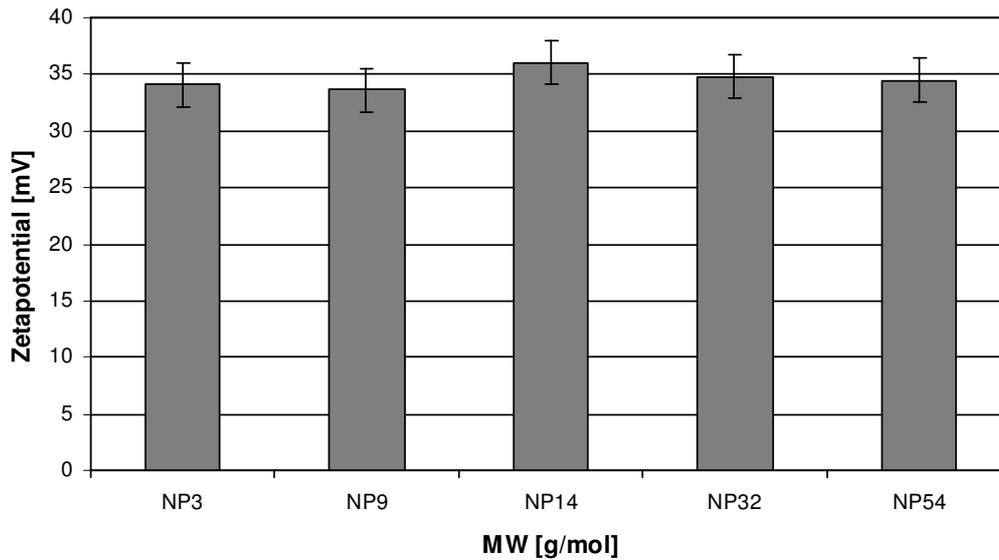


Abb. 3.42 Einfluss des Molekulargewichtes auf das Zetapotential

3.4.7 Durchführung der In-vitro-Untersuchungen zur Aufnahme von pDNA

Die Mikro- und Nanopartikel wurden wie im Kapitel 6.2.5 beschrieben hergestellt und mit der Plasmid-DNA beladen. Als Testplasmid diente pcDNA₃-EGFP, das ein grün fluoreszierendes Protein kodiert. Die Beladung wurde nach Zentrifugation der Partikel durch Messung der nicht gebundenen DNA im Überstand bei 260 nm überprüft. Die Nierenepithelzellen vom Typ 293 wurden mit den beladenen Trägern inkubiert, bebrütet und im Durchflusszytometer vermessen (vgl. Kap. 6.2.5). Im Durchflusszytometer können Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der einzelnen Zellen in Suspension gemessen werden. Über die Streulichteigenschaften kann die Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden. Gleichzeitig dient der eingesetzte Laser als Anregungslicht für Fluorochrome, was die quantitative Bestimmung des exprimierten Fluoreszenzfarbstoffes in den Zellen erlaubt.

3.4.8 Auswertung der inkubierten Zellen

Im Durchflusszytometer wurden insgesamt 15.000 Ereignisse pro Probe vermessen. Zur Beobachtung wurden die Vorwärtsstreuung (FSC) für die Größe des gemessenen Ereignisses, die Rechtwinkelstreuung (SSC) für die Granularität der Zellen und das Fluoreszenzstreulicht (FL1-H) als Maß für den Erfolg der Transfektion herangezogen. In der Abb. 3.43 wurde beispielhaft das Ergebnis nach der Inkubation der Zellen mit reinen Nanopartikeln (links) und mit DNA-beladenen Nanopartikel (rechts) dargestellt.

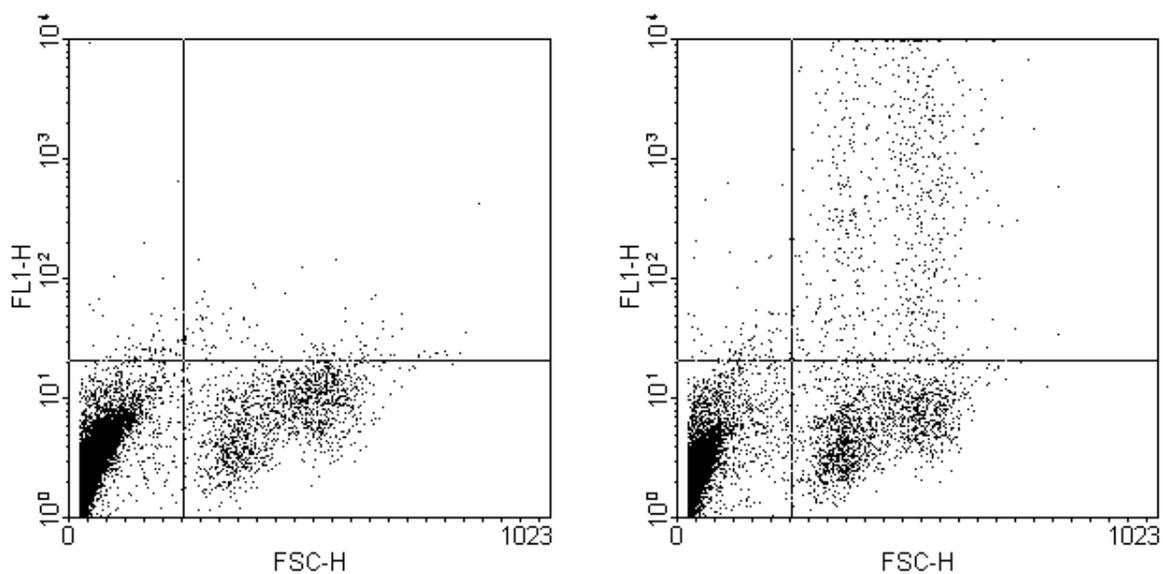


Abb. 3.43 Fluoreszenzstreulicht nach der Inkubation mit DNA-unbeladenen (links) und beladenen Nanopartikeln (rechts) im Verhältnis zur Zellgröße

Die Abszisse zeigt die relative Größe der Zellen in linearer und die Ordinate die Fluoreszenzintensität in logarithmischer Skalierung. Im Quadranten links unten liegt das Streulicht der im Vergleich zu den Zellen kleinen Nanopartikel. Der Quadrant rechts unten zeigt die nicht relevant fluoreszierende Zellpopulation, während im Quadranten rechts oben die Zellen erscheinen, die durch die Aufnahme der Plasmid-DNA das fluoreszierende Protein produziert haben. Durch Ausschluss des Quadranten, der die nicht aufgenommenen Partikel zeigt (links un-

ten) ist eine genauere Abgrenzung in der Darstellung von der Granularität gegen die Fluoreszenz möglich (Abb. 3.44) Aus dem Verhältnis der fluoreszierenden Fraktion, entsprechend der Fläche II, zur Gesamtpopulation, die Summe aus Fläche I und II, kann der Anteil der Zellen ermittelt werden, der die DNA-beladenen Partikel erfolgreich aufgenommen hat.

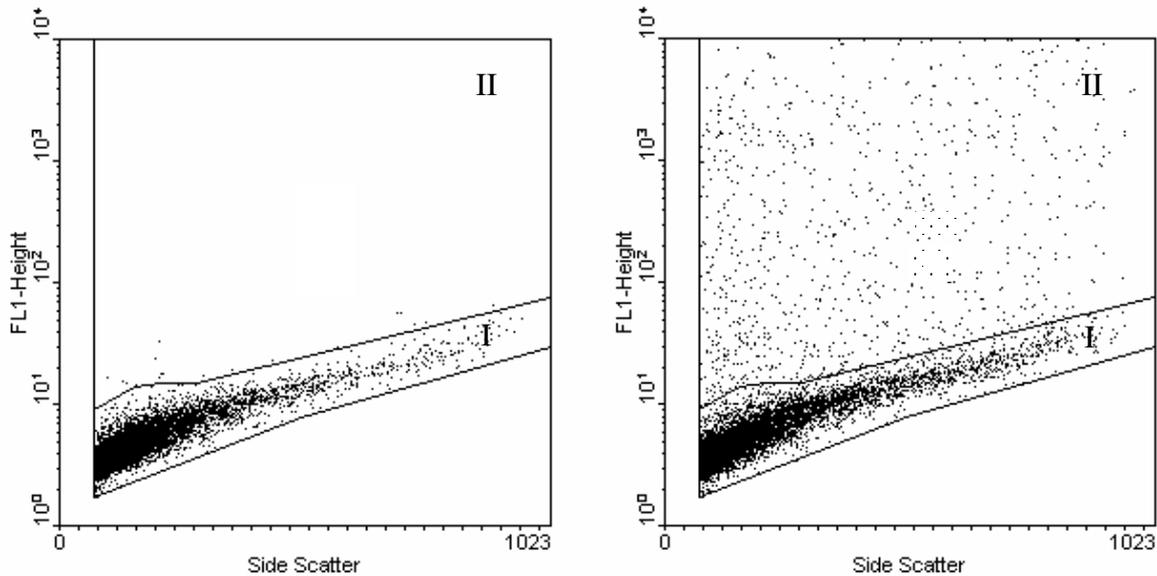


Abb. 3.44 Abgrenzung der fluoreszierenden Zellen zu den nicht fluoreszierenden

3.4.9 Einfluss der Partikelart und des Chitosan-Molekulargewichtes auf den Transfektionserfolg

Für das Transfektionsexperiment wurde jede Zellkultur mit 10 μg an Partikel adsorbierter Plasmid-DNA versetzt. Als Vergleich diente die Zugabe reiner DNA-Lösung gleicher Konzentration (DNA pur) und als Negativkontrolle unbehandelte Zellkulturen (ohne). Die Beladungen der Träger erreichten unabhängig von der Partikelart und des verwendeten Chitosan-Molekulargewichtes Werte über 98 %. Die Probenbezeichnungen entsprechen den aus den vorhergehenden Kapiteln. Aus der Abb. 3.45 geht hervor, dass ohne Adjuvans zugeführte Plasmid-DNA nicht erfolgreich von den Zellen aufgenommen wurde.

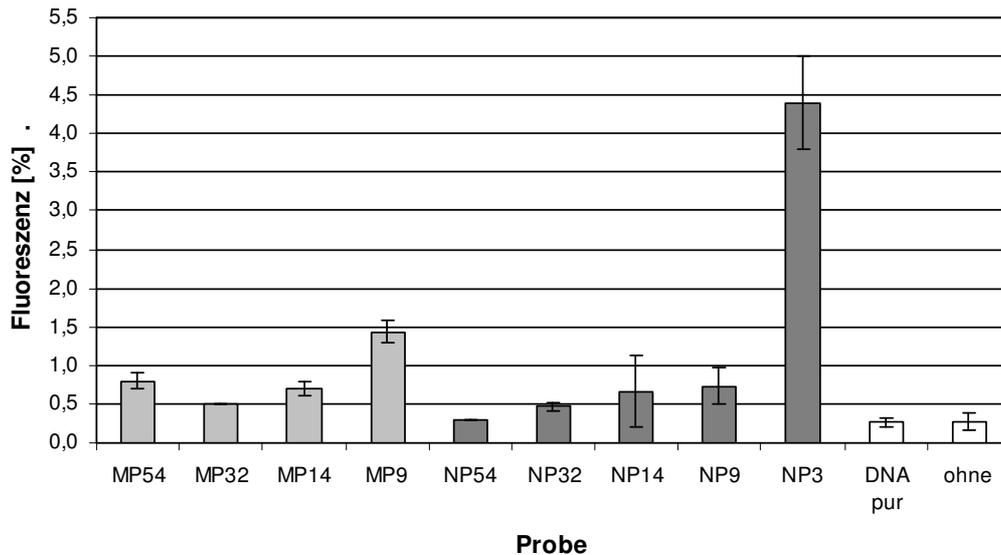


Abb. 3.45 Einfluss der Partikelart und der Molmasse auf die Fluoreszenzausbeute

Die gemessene Fluoreszenz fiel genauso niedrig aus wie die der unbehandelten Zellen. Der Erfolg bei der Verwendung der Mikropartikel MP54 und MP9 fiel im Vergleich zu den entsprechenden Nanopartikeln NP54 und NP9 signifikant höher aus. Am auffälligsten ist jedoch die hohe Fluoreszenzausbeute der Probe NP3, die durch drei unabhängige Wiederholungsversuche an jeweils frisch hergestellten Zellkulturen bestätigt werden konnte. Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren die fluoreszierenden Zellen deutlich sichtbar (Abb. 3.46).

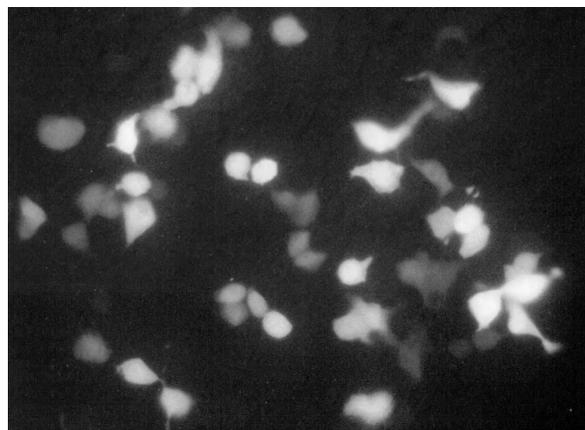


Abb. 3.46 Fluoreszierende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die Vergleichsprobe der Mikropartikel (MP3) konnte nicht eingesetzt werden, da sich diese Partikel aus kurzkettigem Chitosansulfat mit einem Molgewicht von 3 kDa bei der Redispergierung auflösten.

Mögliche Ursachen für die niedrigere Transfektion durch Partikel mit höherem Molekulargewicht sind zum einen eine schlechtere Aufnahme in die Zelle und zum anderen die langsamere Freigabe der DNA innerhalb der Zelle. Mit der Überprüfung der Gesamtgranularität der Zellen durch die Betrachtung der Intensitäten des Seitwärtsstreulichtes (SSC) im Durchflusszytometer konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme bei dem Vergleich der Träger aus verschiedenen Molekulargewichten nicht mit der beobachteten Fluoreszenz korreliert (Abb. 3.47).

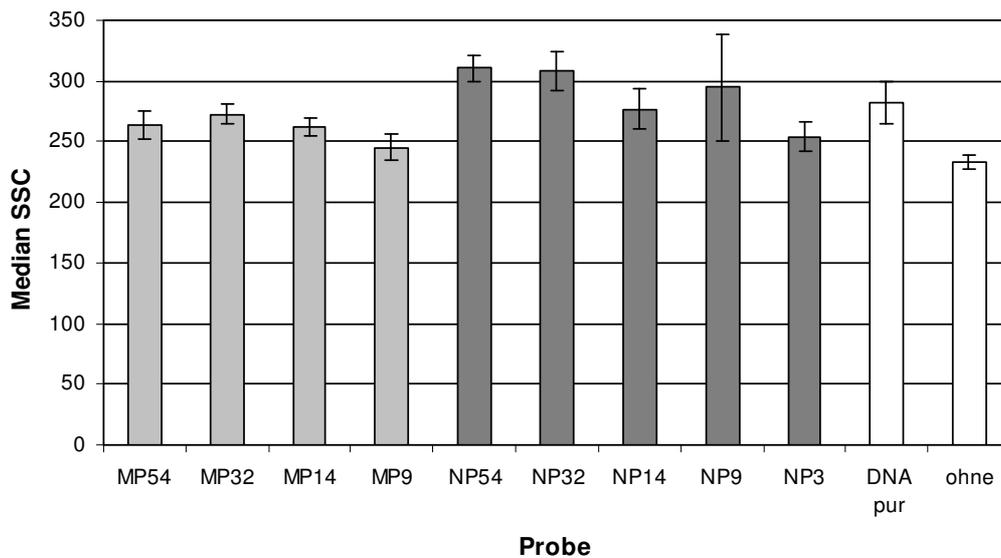


Abb. 3.47 Einfluss der Partikelart und der Molmasse auf die Granularität

Durchschnittlich führen Nanopartikel zwar im Vergleich zu den Mikropartikeln zu einer leicht erhöhten Granularität der Zellen, jedoch nimmt diese auch mit dem kleiner werdendem Molekulargewicht leicht ab. Demnach spielt die erhöhte Freigabe der DNA in der Zelle durch den schneller abbaubaren, kurzkettigen Träger eine entscheidende Rolle. Für alle folgenden Versuche wurden daher

ausschließlich die Chitosanpartikel MP9 und NP3 als DNA-Träger verwendet.

3.4.10 Einfluss der Partikelbeladung auf die Fluoreszenz und Granularität

Bei der Aufnahme von Partikeln in die Zelle geht man davon aus, dass unter anderem Proteoglykane an der Zelloberfläche für die Partikeladsorption verantwortlich sind. Nach der anschließenden Aufnahme mittels Endozytose gelangt letztendlich ein Teil der DNA in den Zellkern, worauf die Transkription des Gens erfolgt [Mislik und Baldenschweiler 1996, Labat-Moleur et al. 1996]. Welchen Einfluss die Beladungsdichte der DNA auf der Oberfläche auf die Endozytose hat, zeigen Abb. 3.48 und Abb. 3.49. Dargestellt ist zum einen die mittlere Gesamtgranularität (SSC I+II) und die mittlere Granularität der Fluoreszierenden Fraktion (SSC II).

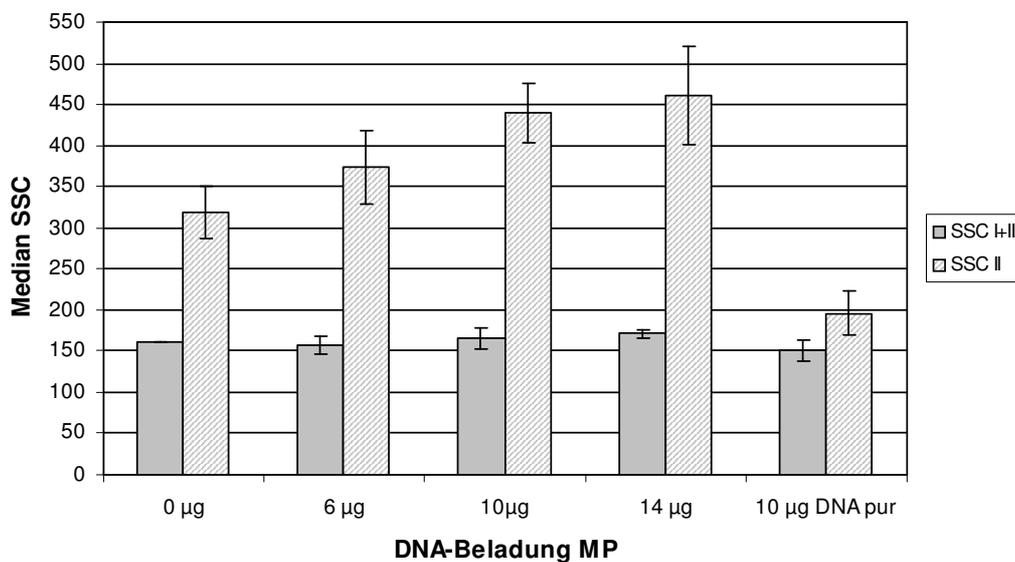


Abb. 3.48 Granularität nach verschiedenen Beladungen der Mikropartikel

Mit steigender Beladung ist im Vergleich zu den unbehandelten oder mit reiner DNA behandelten Zellen bei der Gesamtgranularität nur eine geringfügige Zunahme zu verzeichnen gewesen. Sie ist, wie schon in Abb. 3.47 zu erkennen war, bei den kleinsten Molekulargewichten bei Mikro- und Nanopartikeln gleich

hoch. Die mittlere Granularität der fluoreszierenden Zellfraktion nimmt jedoch sowohl bei den Nano- als auch bei den Mikropartikeln mit steigender DNA-Beladung zu. Die oberflächenadsorbierte DNA scheint folglich die Endozytose der Partikel zu fördern. Dabei fällt die Granularität bei den Mikropartikel aufgrund des größeren Teilchendurchmessers höher aus als bei den Nanopartikel. Die etwas geringere Granularität der 14 µg-Charge der Nanopartikel ist nicht signifikant.

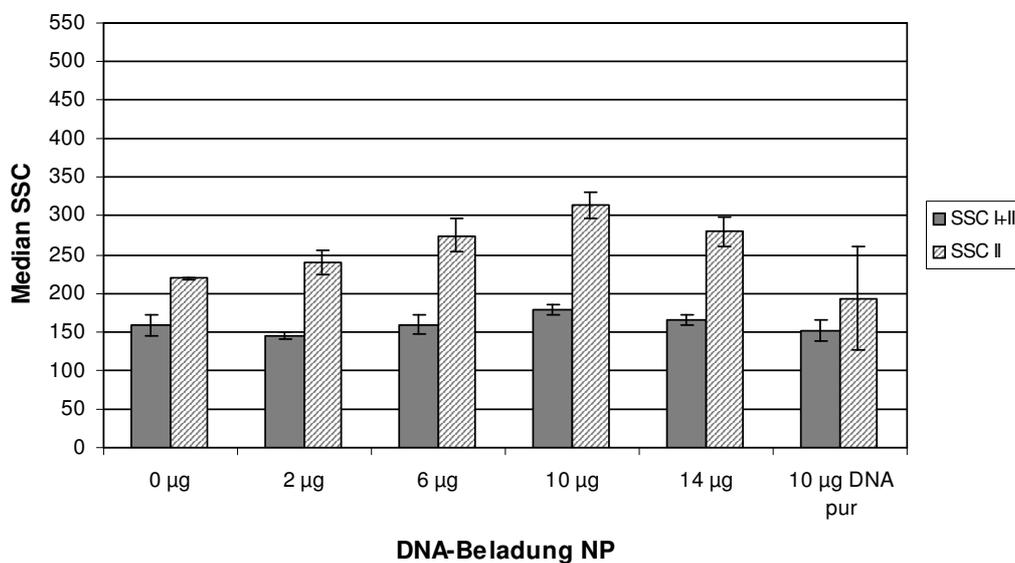


Abb. 3.49 Granularität nach verschiedener Beladung der Nanopartikel

Mit der besseren Aufnahme von stärker beladenen Zellen ist eine proportional steigende Fluoreszenz der Zellen zu erwarten. Dies ist auch bis zu der 10 µg-Charge der Nanopartikeln sehr gut zu erkennen (Abb. 3.50). Die 14 µg-Charge zeigt keine Verbesserung der Fluoreszenzausbeute. Eine mögliche Erklärung ist die bei dieser Charge beobachtete leichte Flockung. Das Zetapotential der Partikel sank mit der Beladung von +33,5 mV bei den unbeladenen Partikeln auf +13,5 mV bei den mit 14 µg DNA beladenen Partikeln. Die weniger beladenen, nicht agglomerierten Partikel werden vermutlich besser aufgenommen, sodass es trotz hoher Granulation zu keiner weiteren Erhöhung der Fluoreszenzausbeute

kam. Bei den Mikropartikeln setzte eine Flockung schon über einer Beladung von $6 \mu\text{g}$ ein. Bei einer Beladung von $14 \mu\text{g}$ sank das Zetapotential von $+31,7 \text{ mV}$ auf $+3,1 \text{ mV}$. Es wurden weniger fluoreszierende Zellen mit einer stärkeren Granulation beobachtet. Dies bedeutet, dass weniger Zellen auch Agglomerate aufnehmen konnten, was zu dem höheren Seitwärtsstreulicht führte.

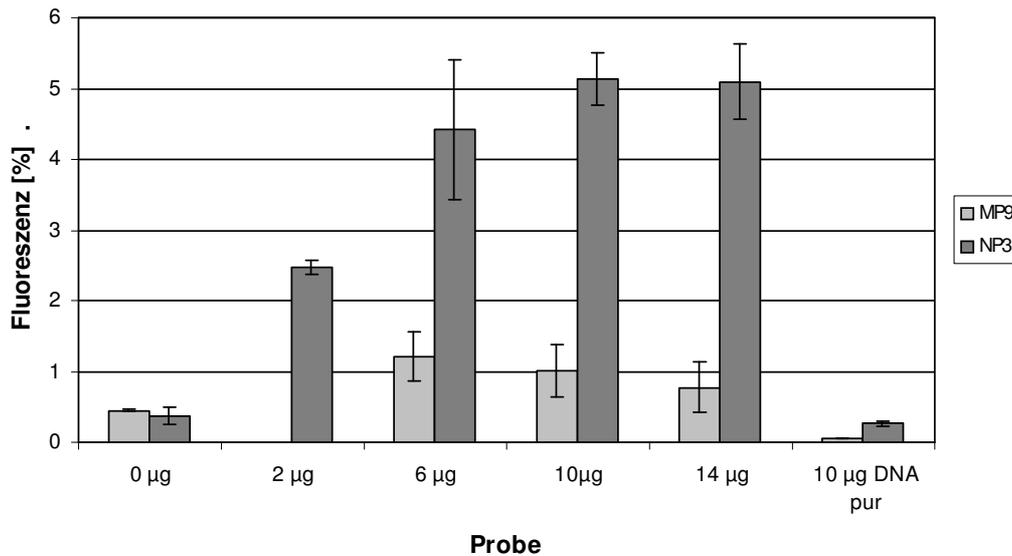


Abb. 3.50 Einfluss der Partikelbeladung auf die Fluoreszenz

3.4.11 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf Fluoreszenz und Granularität

Die beobachteten leichten Flockungen konnten durch eine kurze Ultraschallbehandlung nach der Beladung aufgehoben werden. Inwieweit sich diese Behandlung vor der Inkubation positiv auf die Aufnahme der Partikel in die Zelle oder negativ auf die Stabilität der Plasmid-DNA auswirkt, welche durch Ultraschall zum Teil zerstört werden kann [Perez et al. 2001], wurde am Beispiel der Nanopartikel NP3 in Abb. 3.51 und Abb. 3.52 dargestellt. Bis zu einer Ultraschallbehandlungsdauer von 10 s ist eine signifikante Erhöhung der Granularität und der Fluoreszenz zu erkennen. Die desagglomerierten Partikel werden folglich besser

von der Zelle aufgenommen, was eine höhere Produktion des Fluoreszenzproteins zur Folge hat.

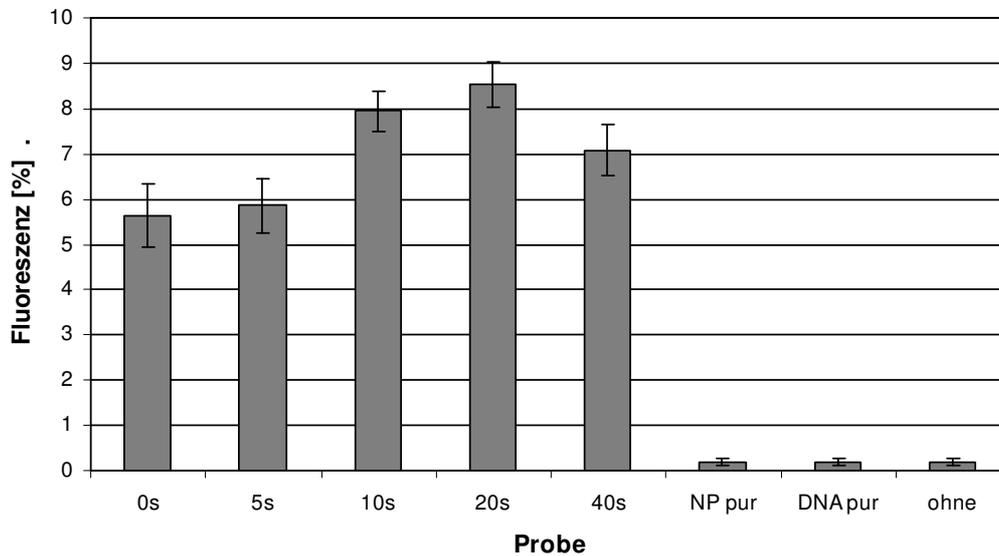


Abb. 3.51 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Fluoreszenz

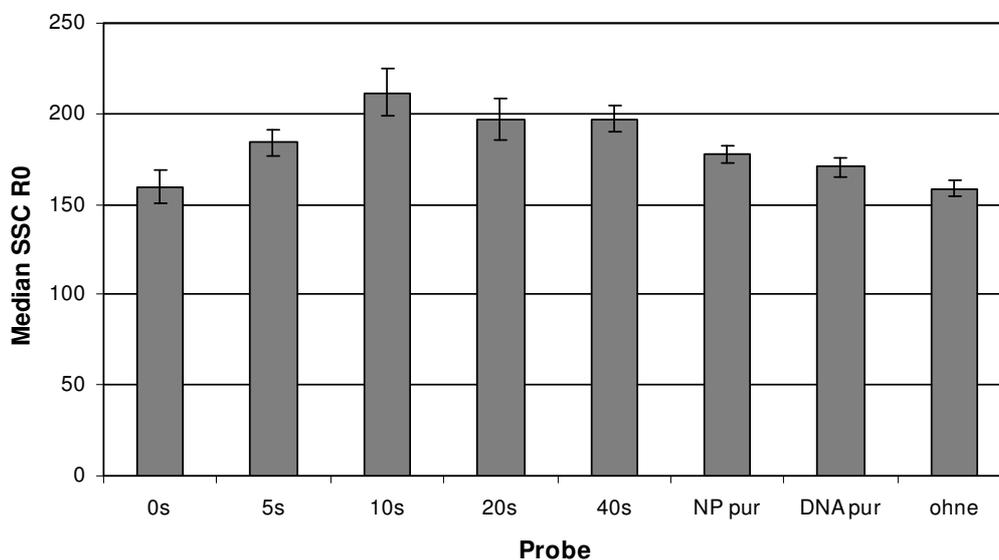


Abb. 3.52 Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Granularität der Zellen

Eine Einbuße der Fluoreszenzausbeute wurde erst nach einer Ultraschallbehandlung von 40 s beobachtet. Mit Hilfe der Gelelektrophorese konnte dort eine

leichte Zerstörung der Plasmid-DNA erkannt werden. Somit kann nur eine sehr kurze Ultraschallbehandlung zu einer Verbesserung der Transfektion führen.

3.4.12 Zusammenfassung

Mit Natriumsulfat sind aus Chitosanen mit einem Molekulargewicht über 8.800 g/mol in Wasser dispergierbare Mikropartikel herstellbar. Kurzkettigere Chitosane lassen sich nur durch eine sehr hohe Zugabe des desolvatisierenden Salzes fällen. Die gute Löslichkeit der daraus entstehenden Partikel verhindert eine Anwendbarkeit als Träger für DNA. Die Teilchengröße der schwerlöslichen Mikropartikel liegt unabhängig vom verwendeten Molekulargewicht bei durchschnittlich 2,3 μm . Die amorphen Partikel der langkettigeren Chitosane zeigen nach längerer Lagerung eine schlechtere Redispergierbarkeit, sodass für diese Methode Chitosane mit einem Molekulargewicht zwischen 9 und 14 kDa die besten Eigenschaften für ein Trägersystem mit sich bringen. Die resultierenden Zetapotentiale steigen mit dem verwendeten Molekulargewicht und liegen bei pH 5 zwischen +30 und +45 mV.

Nanopartikel lassen sich durch die Verwendung von Tripolyphosphat auch aus extrem kurzkettigen Chitosanen durch ein sehr einfaches Verfahren herstellen. Sowohl die entstandenen Teilchengrößen von durchschnittlich 190 nm als auch das Zetapotential von +35 mV bei pH 5 sind unabhängig von der Kettenlänge des eingesetzten Chitosans.

Werden die Chitosanpartikel als kationische Träger für Plasmid-DNA eingesetzt, so führen kleinere Molekulargewichte des Chitosans zu einer besseren Transfektion. Die verwendeten Nanopartikel eignen sich hierfür wesentlich besser als Mikropartikel. Leichte Flockungen führen zu einer Minderung des Transfektionserfolges. Eine Desagglomeration mit Hilfe von Ultraschall kann deshalb zum einen zu einer verbesserten Aufnahme führen. Andererseits besteht die Gefahr einer irreversiblen Zerstörung der Plasmid-DNA, sodass diese Behandlung, je nach Leistung des Gerätes, nur von sehr kurzer Dauer sein darf.

4 Zusammenfassung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die gezielte Herstellung kurzkettiger Chitosane verschiedener Molekulargewichte. Da die relevanten, charakteristischen Größen, Molekulargewicht und Deacetylierungsgrad, das physikalische Verhalten und die Eigenschaften im menschlichen Körper von Chitosan stark beeinflussen, sollten diese möglichst präzise bestimmt werden. Aus verschiedenen kurzkettigen Chitosanen sollten sowohl biokompatible Mikro- als auch Nanopartikel als Träger für Plasmid-DNA hergestellt werden. Diese sollten in Hinblick auf einen Einsatz als Adjuvans bei der DNA-Vakzinierung *in vitro* auf ihre Eignung für eine Transfektionsverbesserung im Vergleich zur nackten DNA überprüft werden.

Durch eine Methodenmodifikation der salzsauren Hydrolyse eines langkettigen Chitosans konnten durch ein einfaches Verfahren monomodal verteilte, kurzkettige Chitosane mit guten Polydispersitätsgraden hergestellt werden. Mit Hilfe eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans und anschließender statistischer Auswertung wurden die Einflüsse der variablen Hydrolysentemperatur, -zeit und Säurenkonzentration untersucht. Für die Depolymerisation war der Einfluss der Temperatur signifikant am größten, während die Ausbeute zusätzlich stark von der Konzentration der verwendeten Salzsäure beeinflusst wurde. Die Zeit spielte nur eine untergeordnete Rolle, sodass diese Methode bei geeigneten Bedingungen schnell zu dem gewünschten Spaltprodukt führte. Weiterhin konnten optimierte Bedingungen für bestimmte Zielgrößen, wie zum Beispiel Molekulargewicht und Ausbeute, prognostiziert werden.

Bei der Bestimmung des Molekulargewichtes wurden mit Hilfe der MALDI-TOF MS hochaufgelöste Spektren kurzkettiger Chitosane gezeigt. Dazu wurde sowohl im Reflektor- als auch im linearen Modus gemessen. Im Reflektormodus konnten die Molekulargewichte der acetylierten und nicht acetylierten Bestandteile sehr exakt bestimmt werden. Im linearen Modus konnte zum ersten mal ein

Gesamtspektrum von Chitosan mit Molekulargewichten bis über 11.000 g/mol dargestellt werden. Aufgrund der Massendiskriminierung der höheren Molekulargewichte lagen die mittleren Molmassen auch von Proben mit einem niedrigeren Polydispersitätsgrad als 1,2 unter den Ergebnissen der GFC/MALLS-Untersuchung.

Der Deacetylierungsgrad von lang- und kurzkettigen Chitosanen wurde mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie und der Kolloidtitration untersucht. Die Protonenresonanzspektroskopie lieferte für in deuterierter, verdünnter Salzsäure gelöstes Chitosan nach einer Optimierung der Probenbereitung und -messung im 300 MHz-Spektrometer eine sehr gute Signalaufspaltung zur präzisen Berechnung des Deacetylierungsgrades. Auf eine chemische Probenaufbereitung konnte verzichtet werden, sodass die Gefahr einer Veränderung minimiert und der Zeitaufwand verkürzt wurde. Sie stellte die Methode der Wahl zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades von handelsüblichen und kurzkettigen Chitosanen dar. Im Vergleich lieferte die zeitaufwendige Festkörper-C-NMR-Spektroskopie auch nach einer Optimierung weniger exakte Ergebnisse, sodass diese Methode nur für Chitin und unlösliche Chitosanderivate zu empfehlen ist. Mit Hilfe des Partikelladungsdetektors wurde eine sehr gute Alternativmethode zur Endpunktbestimmung der Kolloidtitration von Chitosan mit Polyethylensulfonsaurem Natrium gefunden. Die Ergebnisse der Messung von salzsauren Chitosanlösungen korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen der Protonenresonanzspektroskopie. Somit eignet sich dieses Verfahren zur routinemäßigen Untersuchung des Deacetylierungsgrades von Chitosanen. Der Vergleich von Herstellerangaben mit den gut übereinstimmenden Ergebnissen der drei Methoden zeigte zum Teil erhebliche Abweichungen und bestätigte die Notwendigkeit einer einfachen und präzisen Messmethode.

Aus kurzkettigen Chitosanen mit verschiedenen Molekulargewichten und hohem Deacetylierungsgrad wurden mit Hilfe von Natriumsulfat und Triphosphat Mikro- und Nanopartikel hergestellt. Beide Fällungsmethoden waren

mit toxikologisch unbedenklichen Substanzen durchführbar. Sie ergaben unabhängig vom eingesetztem Molekulargewicht Chitosansulfatmikropartikel mit einem Durchmesser von 2,3 μm und mit der ionischen Gelierung durch Tripolyphosphat Nanopartikel mit einem Durchmesser von rund 190 nm. Bei der Verwendung von Chitosanen unter 8.800 g/mol führte nur die Herstellung von Nanopartikeln mit Tripolyphosphat zu stabilen Trägern. Nach der Beladung der Partikel mit Plasmid-DNA wurde deren Aufnahme und die Transfektion in vitro an Nierenepithelzellen überprüft. Der Transfektionserfolg stieg sowohl bei den Mikro- als auch bei den Nanopartikeln mit dem sinkenden Molekulargewicht des Chitosanträgers. Die mit Abstand besten Ergebnisse für die adjuvante Wirkung von Chitosanpartikeln beim Transport von Plasmid-DNA wurden im Hinblick auf die Größe und dem verwendeten Molekulargewicht mit Nanopartikeln aus sehr kurzkettigem Chitosan mit einer mittleren Molmasse von 3.000 g/mol erreicht.

5 Abstract (English Version)

The target of this study was an aimed production of low-molecular-weight chitosans with a different degree of polymerisation. The relevant and characteristic dimensions, the molecular weight as well as the degree of deacetylation of chitosan, had to be determined by an exact method, because they affect its physical characters and its bioavailability in the human organism. Biocompatible microparticles as well as nanoparticles had to be produced from chitosans with different molecular weights to serve as a carrier for plasmid DNA. These particles were then to be examined *in vitro* for a possible usage as an adjuvant for DNA vaccination comparing with naked DNA.

Low-molecular-weight chitosans with a low degree of polydispersity and a monomodal molecular weight distribution were produced with an optimized acid hydrolysis by concentrated hydrochloric acid. The influence of temperature, duration of hydrolysis and various acid concentrations were examined utilizing a central composite design followed by a statistical evaluation. The results emphasized that the temperature had the most significant influence on the depolymerisation of chitosan whereas the yield was further to be greatly influenced by the acid concentration. The effect of hydrolysis time was very low so that under suitable conditions this method leads very quickly to the desired short chained product. In addition optimised conditions were predicted for obtaining a definite molecular weight with a high yield, for instance.

For the determination of the molecular weight high resolution spectra of low-molecular-weight chitosans were shown with the aid of MALDI-TOF MS. Both the reflector and the linear modulus were used. The molecular weight of the acetylated and the deacetylated components was precisely determined in the reflector modulus. In the linear modulus, chitosans with a molecular weight higher than 11 kDa were presented in an overall view. Because of the mass discrimination of the high molecular weight fractions, the average molar mass of samples with a

degree of polydispersity under 1.2 were also lower than the results obtained from the investigations by GFC/MALLS.

The degree of deacetylation for high- and low-molecular-weight chitosans were examined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and colloidal titration. The NMR spectra for chitosan which had been dissolved in deuterated, diluted hydrochloric acid yield after optimization baseline separated peaks with a high resolution which was utilized for the determination of the degree of deacetylation. No previous chemical preparation for the sample was necessary so that there was no risk of an alteration and the time exposure could remain short. ¹H NMR was the method of the first choice for the determination of the degree of deacetylation for commercial and low-molecular-weight chitosans. Nevertheless, the time consuming solid state ¹³C NMR spectroscopy yielded even after optimization low accurate values, thus this method is recommended only for chitin and insoluble chitosan derivatives. The Particle Charge Detector (PCD) was considered to be a good alternative method to determine the endpoint of the colloidal titration of chitosan with polyethylene sulphonic acid. The results of the measurements of chitosan solutions in diluted hydrochloric acid were in agreement with the results of the proton resonance spectroscopy. Thus this approach is suitable for the routine examination of the degree of deacetylation of chitosans. By comparing the specifications of the chitosan manufacturers with the concurrent results from the three used methods, considerable differences were observed, which demonstrate the necessity of a simple and precise measuring method.

With the aid of sodium sulphate and sodium tripolyphosphate, micro- and nanoparticles were produced with various low-molecular-weight chitosans. Both two methods of precipitation were feasible with pharmaceutically considered safe substances. Independently from the used chitosan molecular weight, microparticles with a mean diameter of 2.3 μm and nanoparticles with a mean diameter of 190 nm were produced by precipitation with sodium sulphate and

ionotropic gelation with tripolyphosphate, respectively. When using chitosans beneath 8.8 kDa only the preparation of tripolyphosphate nanoparticles led to stable carriers. After loading the particles with plasmid-DNA their absorption and transfection was examined in vitro using human kidney epithelia cells. The success of the transfection increased with decreasing the molecular weight of the used chitosan for both micro- and nanoparticles. Ultimately, the best results for an adjuvant effect of chitosan particles delivering plasmid-DNA were obtained with nanoparticles of chitosan with low average molecular weight of 3 kDa.

6 Anhang

6.1 Allgemeine Materialien und Geräte

6.1.1 Verwendete Chemikalien

Aqua ad injektabilia	Hergestellt mit Anlage 75-E-4, Finnaqua, Finnland
Ammoniumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deuteriumchlorid 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deuteriumoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Diethylether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,8 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PES-Na	Mütek Analytic GmbH, Herrsching, Deutschland
Polydadmac	Mütek Analytic GmbH, Herrsching, Deutschland
Pullulan P3	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Pullulanstandards	Polymer Labs GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37 %	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
TMSPS-Na	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Toluol, Uvasol [®]	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
THAP	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tripolyphosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin - EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween [®] 80	Uniqema, Euperberg, Belgien

6.1.2 Verwendete Chitosanqualitäten

Chitosan	Hersteller	Kürzel	DD [%]	MW [g/mol]	η [mPas]	Trockenrückstand [%]	Asche [%]
ChitoClear™ TM1070	Primex	TM1070	99,9	k. A.	41	95,6	0,4
Chitooligosaccharide	Seikagaku	OLIGO	100	413 - 1204	k. A.	k. A.	k. A.
Chitopure® 014	Fish Contract	CP014	92,0	k. A.	14,	98,6	0,2
Chitopure® 026	Fish Contract	CP026	73,6	k. A.	461	96,8	1,0
Chitosan MD4	Primex	MD4	86,5	k. A.	54	93,3	1,5
Chitosan TD127	Primex	TD127	92,2	k. A.	25	96	0,4
Chitosan TM615	Primex	TM615	95,0	k. A.	7	95,9	0,4
Chitosan Oligosaccharide	Dalwoo	DALW	95	3880	< 5	95	0,06
Seacure CL310	Pronova	CL310	84	k. A.	290	91,7	k. A.

Dalwoo-chitoSan

Seoul, Korea

Fish Contract Bremerhaven GmbH

Bremerhaven, Deutschland

Primex Ingredients ASA

Avaldsnes, Norwegen

Pronova Biopolymer a.s

Oslo, Norwegen

Seikagaku Corp.

Tokyo, Japan

Alle hier aufgeführten Werte beziehen sich auf die Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Deacetylierungsgrade wurden außerdem mit den im Kapitel 3.3 aufgeführten Methoden bestimmt, mit den Herstellerangaben verglichen und

diskutiert. Für die Ermittlung genauer Einwaagen wurden die aktuellen Trockenrückstände direkt vor der Verwendung bestimmt. Die Viskositätsangaben beziehen sich auf eine 1%ige Chitosanlösung in 1%iger Essigsäure bei 25 °C.

6.1.3 Geräte

Analysewaage	Sartorius A200S Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Datenanalyse-Software	Statistika 6.0 StatSoft, Inc., Tulsa, USA
DSC	DSC 7 PerkinElmer, Shelton, USA
DSC-Software	Pyris V.3.7 PerkinElmer, Shelton, USA
Dyn. Lichtstreuung	Autosizer 2c Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England
Filter	Minisart [®] -RC 15; 0,20 µm Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Isopore [™] 0,4 µm Millipore, Bedford, USA
Laborflasche	DURAN [®] ISO 4796 Schott Glas, Mainz, Deutschland
Laserdiffraktometer	HELOS KFS Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland Linse: R1 (0,125 - 42,75 µm)
Magnetrührer	IKAMAG [®] RET-GS IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
MALDI-TOF MS	Bruker Biflex III Bruker Daltonics Inc., Billerica, USA
Mikrowaage	Sartorius 4501 micro

	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	pH 540 GLP
	WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
REM	XL 30
	Philips Electronics, Eindhoven, Niederlande
Röntgendiffraktometer	Stoe & Cie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rührwerk	IKA RW 20
	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR
	IKA VF2
	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Sputter Coater	SCD 005
	Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein
Trockenschrank	Heraeus T6
	Kendro Lab. Products GmbH, Hanau, Deutschland
Ultraschallgerät	Bandelin Sonorex Super RK 106
	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
UV/VIS-Spektrometer	Uvicon 930
	Kontron Instruments, München, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Biofuge 7 RS
	Heraeus Biofuge A
	Kendro Lab. Products GmbH, Hanau, Deutschland
Zetapotential	Zetasizer 3
	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England

6.2 Spezielle Methoden und Geräte

6.2.1 Säurehydrolyse

Für die Untersuchung der Einflussgrößen bei der Säurehydrolyse von Chitosan und zur Herstellung von kurzkettigen Chitosanen für die weiteren Versuche wurde das Ausgangschitosan TD127 der Firma Primex mit Salzsäure unterschiedlicher Konzentration bei verschiedenen Temperaturen nach dem in Kapitel 3.1.5 aufgeführten Versuchsplan gespalten. Hierfür wurden 100 ml Salzsäure in ein 100 ml DURAN[®] Laborglas gefüllt, druckfest verschlossen und mindestens 3 Stunden bei der gewünschten Temperatur im Trockenschrank vortemperiert. Danach wurde genau 1 g Chitosan vorsichtig unter dem Abzug zugegeben, die Suspension geschwenkt und zurück in den Trockenschrank gestellt. Nach Ablauf der Hydrolysezeit wurde die Suspension in zwei 50 ml NUNC-Röhrchen aufgeteilt und sofort für 3 Minuten bei 8.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und gesammelt. Die Zentrifugate wurden mit jeweils 25 ml Ethanol redispergiert, über Isopore[™]-Filter filtriert und mit weiteren 50 ml Ethanol gewaschen. Diese langkettigeren, in konzentrierter Mineralsäure unlöslichen Chitosane wurden dann bei 70 °C getrocknet und im Exsikkator abgekühlt.

Zur Fällung der kurzkettigen, in ethanolischer Lösung schwer löslichen Chitosane wurden die vereinigten Waschlösungen zu den Überständen gegeben. Nach 30 Minuten wurde der Niederschlag über Isopore[™]-Filter filtriert, mit 50 ml Ethanol gewaschen und ebenfalls getrocknet.

Die erhaltenen Chitosane wurden zur Bestimmung der Ausbeuten gewogen. Die Molekulargewichte wurden wie unter 6.2.2.1 beschrieben mit Hilfe der Gel-filtrationschromatographie und die Deacetylierungsgrade wie unter 3.3 beschrieben mittels ¹H-NMR bestimmt. Die Auswertung des zentral zusammengesetzten Versuchsplanes erfolgte mit Statistica 6.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA.

6.2.2 Molekulargewichtsbestimmungen

6.2.2.1 Gelfiltrationschromatographie (GFC/MALLS)

Pumpe	HPLC 320 Kontron Instruments, München, Deutschland
Autosampler	HPLC 560 Kontron Instruments, München, Deutschland
Streulichtdetektor (MALLS)	miniDAWN [®] Tristar Wyatt Technologie Corp., Santa Barbara, USA
RI-Detektor	Shodex RI SE-51 Showa Denko K.K., Tokyo, Japan
stationäre Phasen	Vorsäule: PL aquagel-OH Guard 8 µm Hauptsäulen: 2 x PL aquagel-OH 30 8 µm Molekulargewichtsbereich: 100 – 30.000 Da Vorsäule: TSKgel PWXL Guardcolumn Hauptsäulen: 2 x PL aquagel-OH 50 8 µm Molekulargewichtsbereich: 50 – 1.000 kDa
mobile Phase	0,5 M Essigsäure + 0,5 M Natriumacetat in Aqua ad injectabilia
Probenvolumen	100 µl
Probenkonzentrationen	1 – 10 mg/ml
Flussrate	1 ml/min
Auswertsoftware	Astra V4.73.04 Wyatt Technologie Corp., Santa Barbara, USA

Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen wurden die Proben über die Ausschlusschromatographie (GFC) nach den effektiven hydrodynamischen Volumina aufgetrennt. Hierfür wurde die erforderliche Masse des zu untersuchenden Polymeres im frischem, Ultraschall entgastem Elutionsmittel gelöst, durch einen 0,2 µm Membranfilter (Minisart RC 15) filtriert und über den oben aufgeführten Autosampler injiziert. Die Doppeldetektion erfolgte über ein molmassensensitiven Mehrwinkel-Streulichtdetektor (MALLS) und ein konzentrations sensitives Differentialrefraktometer. Der Streulichtdetektor wurde mit Toluol kalibriert. Der Abgleich zum Brechungsindexdetektor erfolgte über Pullulanstandards im Molmassenbereich von 738 – 788.000 g/mol.

6.2.2.2 Flugzeitspektrometrie, MALDI-TOF MS

Flugzeitspektrometer	Biflex III MALDI-TOF MS Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Laser	Stickstoff
Wellenlänge	337 nm
Pulsdauer	2 ns
Frequenz	5 Hz
Beschleunigungs- spannung	18,75 kV (linear), 18,00 kV (Reflektormodus)
Reflektorspannung	20,0 kV
Signalakkumulation	200 – 600 Scans

Kurzkettige Chitosane wurden mit Hilfe von MALDI-TOF MS hinsichtlich ihres Molekulargewichtes und Deacetylierungsgrades untersucht. Hierzu wurden die Chitosanhydrochloride zu 1 mg/ml in Wasser gelöst und davon 0,5 µl auf den Probeträger pipettiert. Dort wurden sie mit 1 µl Matrixlösung, einer 5 %-igen Lösung von THAP in Methanol, gemischt. Zusätzlich wurde Natriumchlo-

rid zur Förderung der Bildung von Natriumaddukten und der Ionisierung in einer Konzentration von 0,1 % zur Matrixlösung gegeben. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde die Probe in 1 µl Methanol wieder angelöst, um durch Rekristallisation einen feineren Kristallteppich zu erhalten. Alle Proben wurden im Linear- und Reflektormodus vermessen. In gleicher Weise vorbereitete und vermessene Chitooligomerenstandards wurden zur externen Kalibration eingesetzt.

6.2.3 Bestimmung des Deacetylierungsgrades

6.2.3.1 ¹H-NMR

Kernresonanzspektrometer	ARX 300 Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Kernresonanzfrequenz	300,13 MHz
Pulse Angle	30°
Pulse Delay	1,9 s
Signalakkumulation	64 und 128 Scans
Anzahl der Datenpunkte	8.192
Probentemperatur	330 K, wenn nicht anders angegeben

Zur Untersuchung des Deacetylierungsgrades wurden die Chitosanproben zu 2 %, bei Molgewichten über 500 kDa zu 1 %, in einer 1 %-igen Lösung von Deuteriumchlorid in Deuteriumoxid gelöst. Davon wurden 0,6 ml in das Probenröhrchen gegeben und im Wasserbad auf 330 K erwärmt. Danach wurde die Probe kurz im Ultraschallbad entgast, um eine bessere Peakauflösung zu erhalten, im Kernresonanzspektrometer 5 Minuten temperiert und anschließend vermessen. Es wurde ein Pulsprogramm mit Vorsättigung zur Unterdrückung des Wassersignals verwendet.

Für die Kalibration zur Ermittlung der chemischen Verschiebungen wurde

TMSPS-Na in einer Konzentration von 1,67 mg/ml verwendet und der entstehende Peak der Trimethylgruppe auf 0 ppm gesetzt. Bei allen quantitativen Auswertungen der Chitosanproben wurde auf diesen Zusatz verzichtet, um eine Peak-Überlagerung der Kalibriersubstanz mit den Proben zu vermeiden.

6.2.3.2 Festkörper- ^{13}C CP/MAS NMR

Kernresonanzspektrometer	AM 400 Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Kernresonanzfrequenz	100,61 MHz
Pulse-Angle	90°
Spinning Frequenz	6 kHz
Pulse Delay	10 s
Kontaktzeit	1 ms
Signalakkumulation	7.200 Scans
Anzahl der Datenpunkte	5.006
Probentemperatur	300 K
Interner Standard	TMSPS-Na

Alle Proben wurden in pulverisierter Form direkt im Kernresonanzspektrometer vermessen. Die chemischen Verschiebungen wurden wie bei der H-NMR-Analytik extern mit TMSPS-Na kalibriert.

6.2.3.3 Polyelektrolyttitration

Partikelladungsdetektor	PCD 03 pH Mütek Analytic GmbH, Herrsching, Deutschland
Titratoren	Metrohm 702 SM Titrino Metrohm AG, Herisau, Schweiz

Für die Untersuchung der Proben wurden jeweils 100 mg Chitosan genau ein-

gewogen, mit der gewünschten Säure auf 100,0 ml aufgefüllt und vollständig gelöst. Hiervon wurden genau 2 ml Lösung abgenommen, in das Teflongefäß des Partikelladungsdetektors gegeben und mit Säure zu 10 ml aufgefüllt. Titriert wurde mit einer 1 mN PES-Lösung, die mit der gleichen Säure, welche als Lösungsmittel für das Chitosan verwendet wurde, hergestellt und deren Faktor mit Hilfe einer 1 mN Polydadmac-Standardlösung ermittelt wurde.

Die erste Titration wurde zur groben Ermittlung des Umschlagspunktes zügig durchgeführt. Bei allen weiteren Messungen (mindestens fünf) wurde bis kurz vor den Ladungsneutralpunkt schnell vortitriert. Daraufhin wurden die Titrationschritte so gewählt, dass die Volumeninkremente so klein waren, dass der Äquivalenzpunkt mit einer ausreichenden Genauigkeit ermittelt werden konnte. Die Zeitintervalle waren andererseits mindestens so groß, dass sich das Potential vor jedem nächsten Schritt nicht mehr veränderte und vor allem nach dem Erreichen des Endpunktes mindestens eine Minute lang stabil blieb.

Zur Ermittlung der wahren Einwaagen wurden zur Berechnung des Deacetylierungsgrades der Asche- und Wassergehalt der jeweiligen Proben berücksichtigt. Der Aschegehalt wurde den Analysezertifikaten der Hersteller entnommen. Da die Wassergehalte der Proben jedoch je nach Lagerung von den Herstellerangaben differieren kann, wurden diese zum Zeitpunkt der Verwendung gravimetrisch ermittelt. Hierzu wurden jeweils ca. 500 oder 1.000 mg genau eingewogen, 3 Stunden bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und die Trockengewichte nach dem Erkalten im Exsiccator bestimmt.

6.2.4 Herstellung der Mikro- und Nanopartikel

Die Mikropartikel wurden wie im Kap. 3.4.2 beschrieben hergestellt und anschließend Gefriergetrocknet (Kap. 6.2.4.1).

Nanopartikel wurden für jeden Versuch frisch hergestellt. Die hierfür verwendeten Ausgangslösungen wurden durch einen Membranfilter (Minisart RC 15, 0,2 µm) filtriert. Die Chitosanlösung wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml

vorgelegt und Tripolyphosphatlösung (0,84 mg/ml) unter Rühren im Verhältnis 2,5:1 (Chitosan:TPP) langsam zugegeben. Diese Dispersion wurde zur vollständigen Ausbildung der Partikel bei Raumtemperatur 15 Minuten lang weiter gerührt. Die fertigen Partikel wurden danach 25 Minuten bei 11.000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sedimentierten Nanopartikel mit Aqua ad injectabilia resuspendiert.

6.2.4.1 Gefriertrocknung der unbeladenen Mikropartikel

Gefriertrockner

GFT 6

Klein Vakuumtechnik, Freudenberg, Deutschland

Die nach 3.4.2 hergestellten Mikropartikel wurden in suspendierter Form bei Raumtemperatur in den Gefriertrockner gegeben. Die Temperatur wurde bei maximaler Kühlleistung in 15 Minuten auf -25 °C abgesenkt und nach dem in Tab. 6.1 wiedergegeben Programm getrocknet.

Tab. 6.1 Gefriertrocknungsprogramm für Mikropartikel

Schritt	Zeit [min]	Endtempera- tur [°C]	Druck [mbar]	Bemerkung
1	480	-5 °C	0,8	Primärtrocknung
2	300	5 °C	0,8	Übergangstrocknung
3	60	25	0,1	Nachtrocknung
4	180	25	0,1	Nachtrocknung

Nach Abschluss der Trocknung wurde die Trocknungskammer mit sterilfiltrierter Raumluft belüftet, und die Proben wurden bis zur Weiterverwendung im verschlossenen Zustand bei Raumtemperatur gelagert.

6.2.5 In-vitro-Testmethode

Auswertsoftware	WinMDI 2.8 J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA
Brutschrank	Model 3336 Thermo Forma Scientific, Marietta, USA
Durchflusszytometer	FACS Calibur BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Röhrchen	Falcon 2052 BD Biosciences, San Jose, USA
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop	Axiovert 100 Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Gewebekulturplatten	Cellstar [®] TC-Plate 24 well Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land
Kleinbildkamera	KR-10M Ricoh Europe B. V., Düsseldorf, Deutschland
Kultivierungsmedium	RPMI 1640 Gibco Invitrogen Ltd., Paisley, UK + Fetales Kälberserum (FCS) 10 % + Penicillin G 100 U/ml + Streptomycin 100 U/ml Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Laminar Air Flow	Heraeus LaminAir HA 2472 Kendro Lab. Products GmbH, Hanau, Deutschland
PcDNA3-EGFP	kloniert im Institut für Immunologie der CAU Kiel
PBS-Puffer pH 7,2	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄

	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Steuersoftware	CellQuest™ 3.3
	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellkulturen	Humane embryonale Nierenepithelzellen, Typ 293
	ATCC, Manassas, USA
Zentrifuge	Heraeus Labofuge GL
	Kendro Lab. Products GmbH, Hanau, Deutschland

6.2.5.1 Beladung der Partikel

Die gefriergetrockneten Mikropartikel wurden in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Aqua ad injectabilia im Ultraschallbad redispergiert. Die Nanopartikelsuspension wurden vor jedem Versuch wie im Kap 6.2.4 beschrieben hergestellt. Die Partikel wurden mit der entsprechenden Menge pDNA-Lösung 60 Minuten bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Partikel 10 Minuten lang bei 9.000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit Aqua ad injectabilia aufgenommen.

6.2.5.2 Beladung und Bebrütung der Zellen

Die Nierenepithelzellen vom Typ 293 wurden in einer Konzentration von $8 \cdot 10^4$ Zellen pro Well ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in 1 ml Kultivierungsmedium bebrütet. Unter Laminar Air Flow wurden dann jeweils 100 µl der Partikelsuspensionen pro Loch zugegeben und weitere zwei Tage unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

6.2.5.3 Aufarbeitung

Zur Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden nach Ablauf der Inkubationszeit die Medien über den adhäsiven Zellen abgenommen. Die Kulturen wurden mit jeweils 500 µl PBS-Puffer gewaschen und anschließend bis zum Ablösen der Zellen mit 200 µl Trypsin-Lösung versetzt. Weitere

500 µl PBS-Puffer wurden zugegeben und die Zellsuspensionen vollständig in FACS-Röhrchen überführt. Die Wells wurden mit 500 µl PBS gespült und die Puffer den FACS-Röhrchen zugefügt. Die Suspensionen wurden 10 Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellen in jeweils 1 ml RPMI/FCS redispergiert.

6.2.5.4 Durchflusszytometrie

Vor jeder Messung wurden die aufgearbeiteten Zellsuspensionen kurz geschüttelt (IKA VF2). Mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS Calibur) wurden 15.000 Ereignisse aufgezeichnet und mit der Software WinMDI 2.8 ausgewertet.

7 Literaturverzeichnis

- Aiba, S. (1986). "Studies on chitosan: 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography." Int J Biol Macromol 8: 173-176.
- Akiyama, K., Kawazu, K. und Kobayashi, A. (1995). "A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction system." Carbohydr Res 279: 151-160.
- Allan, G. G. und Peyron, M. (1989). "The kinetics of the depolymerization of chitosan by nitrous acid." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 443-466.
- Allan, G. G. und Peyron, M. (1995). "Molecular weight manipulation of chitosan. I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid." Carbohydr Res 277 (2): 257-272.
- Anthonsen, M. W. und Smidsroed, O. (1995). "Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced H-NMR chemical shifts." Carbohydr Polym 26: 303-305.
- Arai, K., Kinumaki, T. und Fujita, T. (1968). "Toxicity of chitosan." Bull Tokai Reg Fish Lab 56: 89-94.
- Bahr, U., Deppe, A., Karas, M. und Hillenkamp, F. (1992). "Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization." Anal Chem 64: 2866-2869.
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. und Roberts, G. A. (1992). "Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan." Int J Biol Macromol 14 (3): 166-169.

- Beri, R. G., Walker, J., Reese, E. T. und E., R. J. (1993). "Characterisation of chitosans via couple size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique." Carbohydr Res 238: 11-26.
- Bernkop-Schnurch, A. (2000). "Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems." Int J Pharm 194 (1): 1-13.
- Berthold, A., Cremer, K. und Kreuter, J. (1996). "Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs." J Control Release 39: 17-25.
- Bodmeier, R., Chen, H. und Paeratakul, O. (1989). "A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles." Pharm Res 6 (5): 413-417.
- Braconnot, M. H. (1811). "Sur la nature des Champignons." Anal Chem 79: 265-304.
- Brine, C. J. (1989). "Controlled release pharmaceutical applications of chitosan." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 679-691.
- Broussignac, P. (1968). Chim Ind Genie Chim 99: 1241.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Gocoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J. und Rinaudo, M. (2001). "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization." Polymer 42: 3569-3580.
- Burdalo, J., Medrano, R., Saiz, E. und Tarazona, M. P. (2000). "A simple method to determine unperturbed dimensions of polymers using size exclusion chromatography and multiangel light scattering." Polymer 41: 1615-1620.
- Byrd, H. C. M. und McEwen, C. N. (2000). "The limitations of MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of wide polydisperse polymers." Anal Chem 72: 4568-4576.

- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. und Alonso, M. J. (1997a). "Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines." Pharm Res 14 (10): 1431-1436.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. und Alonso, M. J. (1997b). "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers." J Appl Pol Sci 63 (1): 125-132.
- Carreno-Gomez, B. und Duncan, R. (1997). "Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres." Int J Pharm 148: 231-240.
- Chandy, T. und Sharma, C. P. (1990). "Chitosan - as a biomaterial." Biomater Artif Cells Artif Organs 18 (1): 1-24.
- Cui, Z. und Mumper, R. J. (2001). "Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization." J Control Release 75 (3): 409-419.
- Curotto, E. und Aros, F. (1993). "Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups." Anal Biochem 211 (2): 240-241.
- Defaye, J., Gadelle, A. und Pedersen, C. (1989). "Chitin and chitosan oligosaccharides." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 415-429.
- Dodane, V. und Vilivalam, V. D. (1998). "Pharmaceutical applications of chitosan." Pharm Sci Tech today 1 (6): 246-253.
- Domard, A. und Rinaudo, M. (1983). "Preparation and characterization of fully deacetylated chitosans." Int J Biol Macromol 5: 49-52.
- Domard, A. (1987a). "pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cu^{II}-polymer interaction." Int J Biol Macromol 9: 98-104.
- Domard, A. (1987b). "Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements." Int J Biol Macromol 9: 332-336.

- Domard, A. und Cartier, N. (1989). "Preparation, separation and characterization of the D-glucosamine oligomer series." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 383-387.
- Domard, A., Gey, C. und Tavel, F. (1991). "Glucosamine oligomers: 2. N.m.r. studies on a DP3." Int J Biol Macromol 13 (2): 105-109.
- Domszy, J. G. und Roberts, G. A. F. (1985). "Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan." Makromol Chem 186x: 1671-1677.
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C. und Marvao, M. R. (2000). "A statistical evaluation of IR spectroscopic methods to determine the degree of acetylation of alpha-chitin and chitosan." In: Advan Chitin Sci. Peter, M. G., Domard, A. et Muzzarelli, R. University of Potsdam, Potsdam. 4: 367-374.
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R. und Rocha, J. (2001). "Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy." Int J Biol Macromol 28 (5): 359-363.
- Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M. und Remy, J. S. (1998). "Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability." Pharm Res 15 (9): 1332-1339.
- Felt, O., Buri, P. und Gurny, R. (1998). "Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery." Drug Dev Ind Pharm 24 (11): 979-993.
- Fenton, D., Davis, B., Rotgers, C. und Eveleigh, D. E. (1978). "Enzymatic degradation of chitosan." Proceed 1st Int Conf Chitin Chitosan: 525-534.
- Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L. und Alonso, M. J. (1999). "Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles." Pharm Res 16 (10): 1576-1581.
- Fradet, G., Brister, S., Mulder, D. S., Lough, J. und Averbach, B. L. (1986). "Evaluation of chitosan as a new hemostatic agent: in vitro and in vivo experiments." In: Chitin in Nature and Technology. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C. et Gooday, G. W. Plenum Press, New York.

- Fredheim, G. E. und Christensen, B. E. (2003). "Polyelectrolyte Complexes: Interactions between Lignosulfonate and Chitosan." Biomacromolecules 4 (2): 232-239.
- Gallo, J. M. und Hassan, E. E. (1988). "Receptor-mediated magnetic carriers: basis for targeting." Pharm Res 5 (5): 300-304.
- Gaseroed, O., Smidsroed, O. und Skjak-Braek, G. (1998). "Microcapsules of alginate-chitosan - A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan." Biomaterials 19: 1815-1825.
- Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Giunchedi, B. und Conte, U. (1994). "Spray-drying for the preparation of chitosan microspheres." Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater 21: 616-617.
- Genta, I., Perugini, P. und Pavanetto, F. (1998). "Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading and drug release." Drug Dev Ind Pharm 24 (8): 779-784.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M. und Seder, R. A. (2000). "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*." Annu Rev Immunol 18: 927-974.
- Hattori, T., Katai, K., Kato, M., Izume, M. und Mizuta, Y. (1999). "Colloidal titration of chitosan and critical unit of chitosan to the potentiometric colloidal titration with poly(vinyl sulfate) using toluidine blue as indicator." Bull Chem Soc Jpn 72 (1): 37-41.
- He, P., Davis, S. S. und Illum, L. (1999). "Chitosan microspheres prepared by spray drying." Int J Pharm 187 (1): 53-65.
- Hedley, M. (2002). "Polymeric delivery systems for plasmid DNA: a clinical experience." DNA Vaccines, Edinburgh, Scotland.
- Heller, J., Liu, L.-S., Ng, S., Duncan, R. und Richardson, S. C. (1996). "Alginate/chitosan microporous microspheres for the controlled release of proteins and antigens." Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater 23: 269-270.

- Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. (1995). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 72.
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M. F. und Rinaudo, M. (2000). "Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan." Biomacromolecules 1 (4): 746-751.
- Hirai, A., Odani, H. und Nakajima, A. (1991). "Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy." Polym Bull 26: 87-94.
- Hirano, S., Kondo, Y. und Fuji-i, K. (1986). "Peracetylated, modified chitosaccharides produced by the nitrous acid depolymerisation of partially N-acetylated chitosan." In: Chitin in Nature and Technology. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C. et Gooday, G. W. Plenum Press, New York.
- Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. und Nonaka, I. (1988). "Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations." Polym Mater Sci Eng 59: 897-901.
- Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. und Nonaka, I. (1990). "Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration." In: Prog Biomed Polymers. Gebelein, C. G. et Dunn, R. L. Plenum Press, New York: 283-290.
- Hirano, S. (1996). "Chitin biotechnology applications." Biotechnol Annu Rev 2: 237-258.
- Holme, H. K., Hagen, A. und Dornish, M. (2000). "Influence of chitosans on permeability of human intestinal epithelial (caco-2) cells: The effect of molecular weight, degree of deacetylation and exposure time." In: Advan Chitin Sci. Peter, M. G., Domard, A. et Muzzarelli, R. A. A. University Potsdam, Potsdam. 4: 259-265.
- Hoppe-Seyler, F. (1894). "Ueber Chitin und Cellulose." Ber Deut Chem Gesell 27: 3329-3331.

- Horn, D. (1978). "Optisches Zweistrahlverfahren zur Bestimmung von Polyelektrolyten in Wasser und zur Messung der Polymeradsorption an Grenzflächen." Prog Colloid Polym Sci 65: 251-264.
- Horowitz, S. T., Roseman, S. und Blumenthal, H. J. (1957). "The preparation of glucosamine oligosaccharides." J Amer Chem Soc 79: 5046-5049.
- Hwang, K. T., Jung, S. T., Lee, G. D., Chinnan, M. S., Park, Y. S. und Park, H. J. (2002). "Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology." J Agric Food Chem 50 (7): 1876-1882.
- Illum, L., Farraj, N. F. und Davis, S. S. (1994). "Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs." Pharm Res 11 (8): 1186-1189.
- Illum, L. (1998). "Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient." Pharm Res 15 (9): 1326-1331.
- Ilyina, A. V., Tikhonov, V. E., Albulov, A. I. und Varlamov, V. P. (2000). "Enzymatic preparation of acid-free-water-soluble chitosan." Process Biochem 35: 563-568.
- Jameela, S. R., Misra, A. und Jayakrishnan, A. (1994). "Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs." J Biomater Sci Polym Ed 6 (7): 621-632.
- Janeway, C. A. und Travers, P. (1997). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 523-536.
- Jumaa, M. und Müller, B. W. (1999). "Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process." Int J Pharm 183 (2): 175-184.
- Kanke, M., Katayama, H., Tsuzuki, S. und Kuramoto, H. (1989). "Application of chitin and chitosan to pharmaceutical preparations. I. Film preparation and in vitro evaluation." Chem Pharm Bull 37 (2): 523-525.

-
- Karas, M. und Kruger, R. (2003). "Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism." Chem Rev 103 (2): 427-440.
- Kasaai, M. R., Arul, J. und Charlet, G. (2000). "Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan." J Polym Sci Polym Phys 38: 2591-2598.
- Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S. Y. und Ando, Y. (1985). "Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan." J Pharm Sci 74 (3): 264-268.
- Ke, H. und Chen, Q. (1990). "Potentiometric titration of chitosan." Huaxue Tongbao 10: 44-46.
- Khan, T. A., Peh, K. K. und Ch'ng, H. S. (2002). "Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods." J Pharm Pharm Sci 5 (3): 205-212.
- Knapczyk, J., Krowczynski, L., Marchut, E., Brozowski, T., Marcinkiewicz, J., Guminska, M., Konturek, S. J. und Ptak, W. (1989). "Some biomedical properties of chitosan." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonson, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 605-616.
- Knapczyk, J., Macura, A. B. und Pawlik, B. (1992). "Simple tests demonstrating the antimycotic effect of chitosan." Int J Pharm 80: 33-38.
- Knaul, J. Z., Kasaai, M. R., Tam Bui, V. und Creber, K. A. M. (1998). "Characterisation of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review." Can J Chem 76: 1699-1706.
- Ko, J. A., Park, H. J., Hwang, S. J., Park, J. B. und Lee, J. S. (2002). "Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery." Int J Pharm 249 (1-2): 165-174.
- Kristiansen, A., Varum, K. M. und Grasdalen, H. (1998). "The interactions between highly de-N-acetylated chitosans and lysozyme from chicken egg white studied by ¹H-NMR spectroscopy." Eur J Biochem 251 (1-2): 335-342.
-

- Kristl, J., Smid-Kobar, J., Struc, E., Schara, M. und Rupprecht, H. (1993). "Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers." Int J Pharm 99: 13-19.
- Kubota, N., Tatsumoto, N., Sano, T. und Toya, K. (2000). "A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents." Carbohydr Res 324 (4): 268-274.
- Labat-Moleur, F., Steffan, A. M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E. und Behr, J. P. (1996). "An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines." Gene Ther 3 (11): 1010-1017.
- Ledderhose, G. (1876). "Ueber salzsaures Glycosamin." Ber Deut Chem Gesell: 1200.
- Lehr, C.-M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H. und Junginger, H. E. (1992). "In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers." Int J Pharm 78: 43-48.
- Letzel, M. C., Synstad, B., Eijsink, V. G. H., Peter-Katalinic, J. und Peter, M. G. (2000). "Libraries of chito-oligosaccharides of mixed acetylation patterns and their interactions with chitinases." In: Advan Chitin Sci. Peter, M. G., Domard, A. et Muzzarelli, R. University of Potsdam, Potsdam. 4: 545-552.
- Lim, L. Y. und Wan, L. S. (1998). "Effect of magnesium stearate on chitosan microspheres prepared by an emulsification-coacervation technique." J Microencapsul 15 (3): 319-333.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 329-331.
- Luessen, H. L., de Leeuw, B. J., Langemeyer, M. W., de Boer, A. B., Verhoef, J. C. und Junginger, H. E. (1996). "Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo." Pharm Res 13 (11): 1668-1672.

- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M. und Rolland, A. P. (1998). "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery." J Control Release 56 (1-3): 259-272.
- Mao, H. Q., Roy, K., Walsh, S. M., August, J. T. und Leong, K. W. (1996). "DNA-Chitosan nanospheres for gene delivery." Intern Symp Control Rel Bioact Mater 23: 401-402.
- Mao, H. Q., Roy, K., Truong-Le, V., August, J. T. und Leong, K. W. (1997). "DNA-chitosan nanospheres: derivatisation and storage stability." Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater 24: 671-672.
- Martin, K., Spickermann, J., Raeder, H. J. und Muellen, K. (1996). "Why does matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry give incorrect results for broad polymer distributions?" Rapid Commun Mass Spectrom 10: 1471-1474.
- Mislick, K. A. und Baldeschwieler, J. D. (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci USA 93 (22): 12349-12354.
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S. und Mima, S. (1980). "I.r. spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan." Int J Biol Macromol 2: 323-324.
- Montaudo, G., Garozzo, D., Montaudo, M. S., Puglisi, C. und Samperi, F. (1995). "Molecular and structural characterization of polydisperse polymers and copolymers by combining MALDI-TOF mass spectrometry with GPC Fractionation." Macromolecules 28: 7983-7989.
- Moore, G. K. und Roberts, G. A. F. (1980). "Determination of the degree of N-acetylation of chitosan." Int J Biol Macromol 2: 115-116.
- Müller, R. H. (1996). Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 123-124.

- Muzzarelli, R. und Rocchetti, R. (1985). "Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry." Carbohydr Polym 5: 461-472.
- Muzzarelli, R., Baldassarre, V., Conti, F., Ferrara, P., Biagini, G., Gazzanelli, G. und Vasi, V. (1988). "Biological activity of chitosan: ultrastructural study." Biomaterials 9 (3): 247-252.
- Muzzarelli, R. A. A. (1997). "Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives." Cell Mol Life Sci 53: 131-140.
- Nagasawa, K. und Tanoura, N. (1972). "Reaction between carbohydrates and sulfuric acid. III. Depolymerisation and sulfation of chitosan by sulfuric acid." Chem Pharm Bull 20 (1): 157-162.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S. und Azuma, I. (1984). "Immunological activity of chitin and its derivatives." Vaccine 2 (1): 93-99.
- Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. und Azuma, I. (1986). "Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin." Vaccine 4 (3): 151-156.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S. und Azuma, I. (1987). "Effect of multiporous microspheres derived from chitin and partially deacetylated chitin on the activation of mouse peritoneal macrophages." Vaccine 5 (2): 136-140.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H. und Meyers, S. P. (2002). "Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights." Int J Food Microbiol 74 (1-2): 65-72.
- O'Hagan, D., Singh, M., Ugozzoli, M., Wild, C., Barnett, S., Chen, M., Schaefer, M., Doe, B., Otten, G. R. und Ulmer, J. B. (2001). "Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines." J Virol 75 (19): 9037-9043.

- O'Hagan, D. (2002). "Cationic microparticles are a potent delivery system for HIV DNA vaccines in mice, guinea pigs and rhesus macaques." DNA Vaccines, Edinburgh, Scotland.
- Ohe, T. (1996). "Antigenotoxic activities of chitin and chitosan as assayed by sister chromatid exchange." Sci Total Environ 181 (1): 1-5.
- Olsen, R., Schwartzmiller, D., Weppner, W. und Winandy, R. (1989). "Bio-medical applications of chitin and its derivatives." In: Chitin And Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 813-828.
- Otterlei, M., Varum, K. M., Ryan, L. und Espevik, T. (1994). "Characterization of binding and TNF-alpha-inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD14." Vaccine 12 (9): 825-832.
- Ottoy, M. H., Varum, K. M., Christensen, B. E., Anthonsen, M. W. und Smidsrod, O. (1996a). "Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans." Carbohydr Polym 31: 253-261.
- Ottoy, M. H., Varum, K. M. und Smidsrod, O. (1996b). "Compositional heterogeneity of heterogeneously decetylated chitosans." Carbohydr Res 29 (1): 17-24.
- Oungbho, K. und Müller, B. W. (1997). "Chitosan sponges as sustained release drug carriers." Int J Pharm 156: 229-237.
- Paul, W. und Sharma, C. P. (2000). "Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review." STP Pharm Sci 10 (1): 5-22.
- Pavanetto, F., Perugini, P., Conti, B., Modena, T. und Genta, I. (1996). "Evaluation of process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method." J Microencapsul 13 (6): 679-688.
- Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., Avalone, B. und Balsamo, G. (1994). "Chitosan-mediated stimulation of macrophage function." Biomaterials 15 (15): 1215-1220.

- Perez, C., Sanchez, A., Putnam, D., Ting, D., Langer, R. und Alonso, M. J. (2001). "Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA." J Control Release 75 (1-2): 211-224.
- Ph.Eur (2002). "Chitosanhydrochlorid." In: Pharmacopoea Europaea. Dt. Apothekerverlag, Stuttgart. 4: 1486-1487.
- Rao, S. B. und Sharma, C. P. (1997). "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential." J Biomed Mater Res 34 (1): 21-28.
- Raymond, L., Morin, F. G. und Marchessault, R. H. (1993). "Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR." Carbohydr Res 246: 331-336.
- Rege, P. R. und Block, H. B. (1999). "Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties." Carbohydr Res 321: 235-245.
- Remunan-Lopez, C. und Bodmeier, R. (1996). "Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates." Int J Pharm 135: 63-72.
- Richardson, S. C., Kolbe, H. V. J. und Duncan, R. (1997). "Evaluation of highly purified chitosan as a potential gene delivery vector." Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater 24: 649-650.
- Richardson, S. C., Kolbe, H. V. und Duncan, R. (1999). "Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA." Int J Pharm 178 (2): 231-243.
- Rinaudo, M., Le Dung, P., Gey, C. und Milas, M. (1992). "Substituent distribution on O,N-carboxymethylchitosans by ¹H and ¹³C n.m.r." Int J Biol Macromol 14 (3): 122-128.

- Rinaudo, M., Milas, M. und Le Dung, P. (1993). "Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion." Int J Biol Macromol 15 (5): 281-285.
- Roberts, G. A. F. (1992). Chitin Chemistry. The MacMillan Press Ltd., Houndmills: 54-58 (a), 102-110 (b), 85-102 (c), 45-49 (d)
- Rouget, C. (1859). "Des substances amacées dans le tissu des animaux, spécialement les articles (chitin)." Comp Rend 48: 792-795.
- Rupley, J. A. (1964). "The hydrolysis of chitin and the preparartion of low-molecular-weight substrates for lysozyme." Biochim Biophys Acta 83: 245-255.
- Sabnis, S. und Block, H. B. (1997). "Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan." Polym Bull 39: 67-71.
- Sannan, T., Kurita, K. und Iwakura, Y. (1976). "Studies on chitin, 2." Makromol Chem 177: 3589-3600.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. und Iwakura, Y. (1978). "Studies on chitin: 7. I.r. spectroscopic determination of degree of deacetylation." Polymer 19: 458-459.
- Schipper, N. G., Varum, K. M. und Artursson, P. (1996). "Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Pharm Res 13 (11): 1686-1692.
- Schriemer, D. C. und Li, L. (1996). "Detection of high molecular weight narrow polydisperse polymers up to 1.5 million daltons." Anal Chem 68: 2721-2725.
- Schriemer, D. C. und Li, L. (1997a). "Mass dicrimination in the analysis of polydisperse polymers by MALDI Time-of-Flight mass spectrometry. 1. Sample preparation and desorption/ionization issues." Anal Chem 69: 4169-4175.

- Schriemer, D. C. und Li, L. (1997b). "Mass discrimination in the analysis of polydisperse polymers by MALDI Time-of-Flight mass spectrometry. 2. Instrumental issues." Anal Chem 69: 4176-4183.
- Seferian, P. G. und Martinez, M. L. (2001). "Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations." Vaccine 19 (6): 661-668.
- Seo, W. G., Pae, H. O., Kim, N. Y., Oh, G. S., Park, I. S., Kim, Y. H., Kim, Y. M., Lee, Y. H., Jun, C. D. und Chung, H. T. (2000). "Synergistic cooperation between water-soluble chitosan oligomers and interferon-gamma for induction of nitric oxide synthesis and tumoricidal activity in murine peritoneal macrophages." Cancer Lett 159 (2): 189-195.
- Shimada, K., Lusenkova, M. A., Sato, K., Saito, T., Matsuyama, S., Nakahara, H. und Kinugasa, S. (2001). "Evaluation of mass discrimination effects in the quantitative analysis of polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using uniform oligostyrenes." Rapid Commun Mass Spectrom 15: 277-282.
- Shiraishi, S., Arahira, M., Imai, T. und Otagiri, M. (1990). "Enhancement of dissolution rates of several drugs by low-molecular weight chitosan and alginate." Chem Pharm Bull 38 (1): 185-187.
- Shu, X. Z. und Zhu, K. J. (2002a). "The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release." Eur J Pharm Biopharm 54 (2): 235-243.
- Shu, X. Z. und Zhu, K. J. (2002b). "Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure." Int J Pharm 233 (1-2): 217-225.
- Signini, R. und Campana Filho, S. P. (1999). "On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride." Polym Bull 42: 159-166.
- Singh, M., Briones, M., Ott, G. und O'Hagan, D. (2000). "Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines." Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2): 811-816.

- Singla, A. K. und Chawla, M. (2001). "Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update." J Pharm Pharmacol 53 (8): 1047-1067.
- Skaugrud, O. (1991). "Chitosan - new biopolymer for cosmetics and drugs." DCI: 24-30.
- Sorlier, P., Denuziere, A., Viton, C. und Domard, A. (2001). "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan." Biomacromolecules 2 (3): 765-772.
- Struszczyk, M. H. (2000). Herstellung von Chitosan und einige Anwendungen. Institut für Organische Chemie. Potsdam, Potsdam: 81-84.
- Sullivan, M. J. und Maciel, G. E. (1982). "Spin dynamics in the carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric analysis of coal by cross polarization and magic-angle spinning." Anal Chem 54: 1615-1623.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. und Suzuki, M. (1986). "Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose." Carbohydr Res 151: 403-408.
- Tabata, Y. und Ikada, Y. (1988). "Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage." Biomaterials 9 (4): 356-362.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. und Kawashima, Y. (1994). "Mucoadhesion of polymer-coated liposomes to rat intestine in vitro." Chem Pharm Bull (Tokyo) 42 (9): 1954-1956.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K. und Wong, S. M. (1998). "The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination." Talanta 45: 713-719.
- Tanaka, Y., Tanioka, S., Tanaka, M., Tanigawa, T., Kitamura, Y., Minami, S., Okamoto, Y., Miyashita, M. und Nanno, M. (1997). "Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration." Biomaterials 18 (8): 591-595.

- Tanigawa, T., Tanaka, Y., Sashiwa, H., Saimoto, H. und Shigemasa, Y. (1992). "Various biological effects of chitin derivates." In: Advances in Chitin and Chitosan. Brine, C. J., Sandford, P. et Zikakis, J. P. Elsevier, London: 206-215.
- Tarsi, R., Corbin, B., Pruzzo, C. und Muzzarelli, R. A. (1998). "Effect of low-molecular-weight chitosans on the adhesive properties of oral streptococci." Oral Microbiol Immunol 13 (4): 217-224.
- Tengamnuay, P., Sahamethapat, A., Sailasuta, A. und Mitra, A. K. (2000). "Chitosans as nasal absorption enhancers of peptides: comparison between free amine chitosans and soluble salts." Int J Pharm 197 (1-2): 53-67.
- Terayama, I. (1952). "Method of colloid titration (a new titration between polymer ions)." J Polym Sci 8 (2): 243-253.
- Terbojevich, M., Cosani, A., Focher, B. und Marsano, E. (1993). "High-performance gel-permeation chromatography of chitosan samples." Carbohydr Res 250: 301-314.
- Terbojevich, M., Cosani, A. und Muzzarelli, R. (1996). "Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain." Carbohydr Res 29 (1): 63-68.
- Thanoo, B. C., Sunny, M. C. und Jayakrishnan, A. (1992). "Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals." J Pharm Pharmacol 44 (4): 283-286.
- Thanou, M., Verhoef, J. C. und Junginger, H. E. (2001). "Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers." Adv Drug Deliv Rev 50 (Suppl 1): S91-101.
- Tommeraaas, K., Varum, K. M., Christensen, B. E. und Smidsrod, O. (2001). "Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans." Carbohydr Res 333 (2): 137-144.

- Uchida , Y., Izume, M. und Ohtakara, A. (1989). "Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 373-382.
- Ueno, K. und Kina, K. (1985). "Colloid titration - a rapid method for the determination of charged colloid." J Chem Educ 62 (7): 627-629.
- Varum, K. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H. und Smidsrod, O. (1991a). "Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy." Carbohydr Res 211 (1): 17-23.
- Varum, K. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H. und Smidsrod, O. (1991b). "¹³C-n.m.r. studies of the acetylation sequences in partially N-deacetylated chitins (chitosans)." Carbohydr Res 217: 19-27.
- Varum, K. M., Ottoy, M. H. und Smidsrod, O. (1994). "Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation." Carbohydr Polym 25: 65-70.
- Varum, K. M., Ottoy, M. H. und Smidsroed, O. (2001). "Acid hydrolysis of chitosans." Carbohydr Polym 46: 89-98.
- Vestal, M. L., Juhasz, P. und Martin, S. A. (1995). "Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom 9: 1044-1050.
- Wang, W., Bo, S. Q., Li, S. Q. und Qin, W. (1991). "Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation." Int J Biol Macromol 13 (5): 281-285.
- Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedestrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Normann, J. A. und Hoffman, S. L. (1998). "Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine." Science 282: 476-480.

Wittig, B. (2002). DNA Vaccines, Edinburgh, Scotland.

Yabuki, M. (1989). "Characterization of chitosanase produced by *Bacillus circulans* MH-K1." In: Chitin and Chitosan. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. et Sandford, P. Elsevier, London: 197-206.

Yu, G., Morin, F. M., Nobes, G. A. R. und Marchessault, R. H. (1999). "Degree of acetylation of chitin and extent of grafting PHB on chitosan determined by solid state N NMR." Macromolecules 32: 518-520.

Zhang, H., Du, Y., Yu, X., Mitsutomi, M. und Aiba, S. (1999). "Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme." Carbohydr Res 320 (3-4): 257-260.

Zhang, H. und Neau, S. H. (2001). "In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation." Biomaterials 22 (12): 1653-1658.

Zinkernagel, M. (2002). "On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception." Eur J Immunol 32: 2385-2392.

8 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. B. W. Müller für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Überlassung des interessanten Themengebietes.

Der Technologie-Stiftung Schleswig-Holstein danke ich für die Bereitstellung von Mitteln für die Beschaffung eines Mehrwinkelstreulicht-Detektors, der die Bestimmung der Molekulargewichte ermöglichte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Dr. Stefan Schenderlein für die vielen Diskussionen über Molekulargewichtsbestimmungen bedanken. Zum Glück war das von uns angeschaffte Gerät im Gegensatz zum Konkurrenzprodukt sehr zuverlässig.

Der Firma Beiersdorf und insbesondere Julia Pruns danke ich für die Messzeiten und für die Zusammenarbeit bei der Erstellung der MALDI TOF-Spektren.

Dr. Uli Girreser und Dr. Peters danke ich für die Erstellung der NMR-Spektren und die vielen Diskussionen über Kernresonanzspektroskopie.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. G. Lagaly danke ich für die zur Verfügung gestellten Messzeiten am Partikelladungsdetektor im anorganischen Institut. Hierbei danke ich besonders Nils Rickertsen für die Einweihung in die PCD-Geheimnisse und die gute Zusammenarbeit auf diesem Gebiet.

Herrn Prof. Dr. Jörg Steinmann vom immunologischen Institut danke ich zum einen für die hervorragende, aktive Kooperation bei allen in vitro- und in vivo-Versuchen, auch wenn bei den letzteren leider etwas schief gelaufen ist – am Ball bleiben ist alles. Zum anderen möchte ich mich auch für die vielen kleinen Gespräche zur Klärung meiner Fragen bedanken, die nahezu jederzeit möglich waren. Petra, Jörg Krause, Kyoung und Daniel danke ich ebenfalls für die sehr gute und interessante Zusammenarbeit bei all diesen Versuchen.

Rüdi sei gedankt für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen, der Anfertigung der Corel Draw-Zeichnungen und vor allem für die vielen anregenden Gespräche, die oft weit über den Tellerrand der Pharmazie hinaus gingen.

Arne, Günter, Peter und Kai danke ich für jegliche Unterstützung in der großen weiten Welt der Computer. Mit Euch konnten die Eigensinnigkeiten dieser Schaltkreise im Zaum gehalten und ständig verbessert werden.

Katja und Andreas danke ich für den Gedankenaustausch rund um das Thema Chitosan. Wird es nach uns noch weitere Ritter der Chitosanrunde geben?

Anja danke ich für den leider nur zeitweise möglichen aber luxuriösen Literaturfluss, der im Vergleich zur Unibibliothek schwindelerregende Geschwindigkeiten erreicht hatte.

Muhannad, Firas und Fadi danke ich für die arabischen Momente und die vielen orientalischen Leckereien in der Uni. Auch der harte Kern der Zipnertreuen und die Betriebssportgruppe Squash sorgten immer für einen angenehmen Ausgleich zum Uni Alltag.

Dem gesamten Arbeitskreis der Technologie danke ich für die nette Atmosphäre und die schöne, interessante Zeit am Institut.

Dorothe, Inga-Lis und Sebastian danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Sebastian danke ich vor allem für die immer sehr kritischen und konstruktiven Anmerkungen und Diskussionen bei allen Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Dorothe und meinem Sohn Jonas, der während des Endspurtes das Licht der Welt erblicken durfte. Mit der von Euch ausgehenden Energie, Freude und Liebe habt ihr mir Kraft und Motivation bis zur letzten Sekunde gegeben.