

**Erzeugung funktionaler Lipidkapseln
aus Nanoemulsionen – Verfahrensentwicklung,
Produktcharakterisierung und Erprobung**

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Ing. Ellen Hildebrandt
aus Magdeburg

Referent: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl
Korreferentin: Prof. Dr.-Ing. Heike P. Karbstein
Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2017

Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,
den Glauben zum Handeln.

Max Planck

Danksagung

Diese Arbeit ist im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit bei der Abnoba GmbH, in Kooperation mit dem Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), in den Jahren von 2011 bis 2016 entstanden.

Herrn Dr. Gero Leneweit danke ich für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas, sowie der Finanzierung durch eingeworbene Drittmittel. Fernerhin möchte ich Ihm für die Unterstützung, die anregenden Gespräche und sein Engagement bei der Erstellung und Korrektur unserer gemeinsamen Publikationen danken. Bedanken möchte ich mich auch für die Möglichkeit die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu dürfen sowie das entgegengebrachte Vertrauen an zusätzlichen Aufgaben, wie der Organisation von Tagungen oder der Betreuung von Studenten, wachsen zu können.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl, der mir die Möglichkeit gab, an seinem Institut als externe Doktorandin zu promovieren. Des Weiterem danke ich Ihm nicht nur für fachliche Hinweise und Anregungen, sondern auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe und dass am MVM jederzeit eine Tür für mich und das Messgerät offen stand.

Frau Prof. Dr.-Ing. Heike P. Karbstein danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats, den hilfreichen Anregungen zu der Niederschrift und Korrektur dieser Dissertation sowie Ihr Interesse an meiner Arbeit.

Fernerhin richtet sich mein Dank an Frau Prof. Dr. Gisela Guthausen des Pro²NMR, sowie Herrn Dr. Reinhard Miller vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm, Potsdam. Liebe Frau Guthausen,

danke für die stimulierenden Gespräche und das Einbringen Ihrer enormen fachlichen Kompetenz auf dem Gebiet der NMR, sowie die Möglichkeit diese Messtechnik sinnvoll und ergänzend zur Erweiterung der tensiometrischen Messungen nutzen zu dürfen. Lieber Reinhard, danke für den fachlichen Austausch und Ideen rund um den Aufbau und zur Optimierung der Messung am Tensiometer. Beiden möchte ich aber auch ganz besonders für so manche ermutigenden Worte nach Tiefschlägen, sowie Zuspruch und Verständnis in schwierigen Situationen danken!

Meinen Kollegen am MVM danke ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre. Ich habe mich immer gefreut, wenn ich Zeit in der Arbeitsgruppe verbringen dürfte. Nicht nur die fachlichen Diskussionen in den Seminaren, sondern auch der freundschaftliche Umgang miteinander, das Zuhören, Aufmuntern und Motivieren habe ich immer sehr geschätzt. Gerne denke ich an gemeinsame Tage im Wanderseminar, die Grillabende oder sportliche Aktivitäten am MVM zurück!

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei Dr. Robbert Jan Kok und allen Kollegen der Arbeitsgruppe Biomaterialien und Pharmazie der Universität in Utrecht, mit denen ich während meines 9-monatigen Aufenthalts in den Niederlanden zusammenarbeiten durfte. Es war eine forschungsintensive Zeit, spezielle durch die Arbeit in der Zellkultur, an die ich jedoch sehr gerne zurück denke.

Auch möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. Klaus Zick und Dr. Dieter Groß, der Firma Bruker, bedanken, dass ich, aufgrund ihres großen Interesses an unseren Fragestellungen, sinnvoll ergänzende Messungen mit und bei Ihnen durchführen könnte.

Der Firma Lipoid GmbH danke ich für die großzügige Versorgung mit Phospholipiden für unser Forschungslabor.

Herrn Dr. Makievski danke ich für so manches freundliche Telefonat und die Beantwortung meiner Fragen rund um das Tensiometer.

Für die Bereitstellung des Extraktionsprotokolls bzw. des isolierten Mistellectins I möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Pfüller bzw. bei Dr. Christoph Heyder bedanken.

Keine experimentelle Arbeit kann ohne eine funktionelle Laboranlage durchgeführt werden. Für manch eigens entworfener Konstruktion und Sonderanfertigung, aber auch die angenehme Zusammenarbeit im Allgemeinen, möchte ich mich herzlich bei Stefan Nikolaus bedanken. Er war immer zur Stelle, wenn ein größerer Umbau erfolgte, dringend ein Bauteil benötigt wurde oder um mich bei der Reparatur eines Gerätes zu unterstützen. Ebenso Herr Markus Beffert, mit seiner langjährigen Erfahrung in den Laboren der Abnoba GmbH, aber auch ganz speziell und mit sehr viel Leidenschaft und Fachwissen am Gas-Chromatographen.

Ein großer Dank geht auch an die Kollegen der Qualitätskontrolle der Abnoba GmbH, vornehmlich Edith Norman, Sandra Muth, Marina Krauth und Olga Tiran, die von etlichen Proben ELISA-Messungen zur Quantifizierung der Mistellektinkonzentration übernommen haben und so eine große Hilfe waren.

Des Weiteren möchte ich auch allen Kollegen der Abnoba GmbH und des Carl Gustav Carus-Institutes danken, mit denen ich in den vergangenen Jahren zusammengearbeitet habe und die nicht namentlich erwähnt sind. Auch ihr habt dazu beigetragen, dass ich mich über die Jahre wohlfühlt habe und somit diese Arbeit anfertigen konnte.

Nicht zu vergessen sind auch die ehemaligen Studentinnen und Studenten, deren Abschlussarbeiten oder Praktika ich betreuen durfte und die meine Messungen mit unterstützt haben: Benjamin Cossárd, Derya Arastiran, Tejal Mutha, Daniel Wilwok, Diana Laufer, Jürgen Binder, Philipp Walter, David Andreas Grijalva, Julia Stürmer, Johanna Intemann und Katharina Bender. Danke für die schöne Zusammenarbeit mit euch!

Meinen Eltern, der ganzen Familie und meinen Freunden danke ich für die jahrelange Unterstützung während des Studiums und der anschließenden Promotionszeit. Ich danke für die unzähligen tröstenden und aufmunternden Worte, ihr Verständnis und Rückhalt, sowie für so manche geduldige Bereitschaft zur Entbehrung ihrer Tochter, Schwester, Tante, Enkelin, Nichte und Freundin.

Am Ende bleibt eines:

Gott für alles zu danken!

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erzeugung funktionaler Lipidkapseln aus Nanoemulsionen sowie der Verfahrensentwicklung und Charakterisierung einzelner Prozesse und Zwischenprodukte. Insbesondere geht diese Ausarbeitung auf Grenzflächenphänomene in kolloidalen Systemen ein, die für pharmazeutische Anwendungen relevant sind. Fernerhin ist die Erprobung von Wirkstoffen auf zellulärer Ebene ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Die zentrifugale Herstellung von Liposomen aus Nanoemulsionen nach Pautot *et.al.* [1, 2] zeigt, dass der Transport von wässrig dispergierter Phase aus der Ölphase in eine unterliegende Wasserphase prinzipiell möglich ist. Der Nachweis erfolgt durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Emulgators sowie der Untersuchung der beteiligten Phasen mittels dynamischer Lichtstreuung. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass Phospholipide, welche im Öl gelöst sind, nach der Zentrifugation nur zu maximal 5% in dieser ursprünglich gelösten Phase verbleiben. Daraus und aus den Informationen der Analyse der wässrigen Phase nach der Zentrifugation kann abgeleitet werden, dass sich die Phospholipide zu mindestens 50% an dem Aufbau der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl, zur Stabilisierung der Emulsionströpfchen, beteiligen.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der gebildeten Partikel, welche nach der Zentrifugation in der Wasserphase zu finden sind, weisen darauf hin, dass das Verfahren in seiner technologisch realisierten Form, basierend auf dem Prozess von Pautot *et.al.* [1, 2], nicht zu den gewünschten Einkapselungseffizienzen führt. Es ergaben sich präzisierete Aufgabenstellungen sowie offene Fragen zur exakten Bildung von Phospholipid-Mono- bzw. Doppelschichten, welche hinsichtlich der Stabilität der Grenzflächen maßgeblich sind. Der Transport der Wasser-in-Öl Emulsionen in die unterliegende Wasserphase führt vermutlich zu einer Deformation der Emulsions-

tröpfchen, bevor diese an der Phasengrenze von einer zweiten Phospholipidschicht ummantelt werden, was in einer ungewollten Freisetzung von Wirkstoff resultiert. Dies äußert sich in Partikeln oder Liposomen, die im Durchschnitt etwa die Hälfte der Partikelgröße der zuvor erzeugten Emulsionen aufweisen sowie in Einkapselungseffizienzen von etwa 25%. Um ein besseres Verständnis über das Adsorptionsverhalten der Emulgatormoleküle, den Phospholipiden, zu erreichen, liegt der Fokus dieser Arbeit auf tensiometrischen Untersuchungen an der Wasser/Öl-Grenzfläche. Diese Analysen liefern einen Einblick in die Flächendichte der Moleküle an der Phasengrenze, was zur Optimierung und späteren Realisierung stabiler Lipidschichten im Zentrifugationsprozess ohne zu hohen Wirkstoffverlust, von Bedeutung ist.

Die Charakterisierung der Struktur und des Aufbaus von Schichten adsorbierter Phospholipidmoleküle, an der Grenzfläche zwischen Wasser und einer zweiten organischen Phase, erfolgt mit Hilfe der Tropfen-Profilanalyse Tensiometrie (PAT). Mittels PAT werden Untersuchungen von Phospholipiden unterschiedlicher Sättigung in den verschiedenen pharmazeutisch relevanten Ölphasen Squalen und Squalan durchgeführt, die Rückschlüsse über die Packungsdichte adsorbierter Moleküle zulassen. In Abhängigkeit von der Sättigung der Ölphasen, in denen die Phospholipide gelöst sind, lassen sich darüber hinaus klare Indizien für eine Monoschichtbildung in der ungesättigten Phase Squalen und für eine Multischichtbildung in der gesättigten Phase Squalan ableiten. Dieses Ergebnis erlaubt zudem Rückschlüsse auf die Stabilität von Emulsionen, was jedoch in dieser Arbeit nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen ist.

Die systematische Variation der Tropfenphase und der umgebenden Phase bei der tensiometrischen Analyse ergibt zudem signifikante Unterschiede, die in vergleichender Form noch nicht in der Literatur beschrieben sind. Um deren Ursache aufzuklären und um verifizierte tensiometrische Messergebnisse zu erhalten, kommt zusätzlich Chloroform mit dem Phospholipid DPPC als Referenz zum Einsatz, das als gut beschriebenes Stoffsystem gilt. Durch diese ergänzenden Betrachtungen, auch mit Hilfe weiterer Messmethoden wie der dynamischen Lichtstreuung, Kernspinresonanzspektroskopie und Phosphatanalytik, ist die Ursache für diese Messunterschiede näher beschreibbar. Es wurde eine Abreicherung von Phospholipiden aus der Ölphase in die Wasserphase beobachtet, die stärkere Auswirkungen auf die Phospholipidkonzentration aufweist, wenn das lipidhaltige Reservoir

die um den Faktor 100 kleinere Volumenphase darstellt. Dies ist in dem in der Literatur ausschließlich verwendeten Messaufbau, eines Phospholipidhaltigen Öltropfens in 100-fach größeren umgebenden Wasserphasenvolumen, der Fall. Aus diesem Grund kann mit dem invertierten tensiometrischen Messaufbau eines Wassertropfens in Öl eine Empfehlung gegeben werden, der diese Artefakte ausschließt bzw. minimiert.

Die systematische Analyse an der Grenzfläche zweier kaum mischbarer Phasen vermittelt ein umfangreiches Verständnis über das Löslichkeits- und Adsorptionsverhalten von Phospholipiden in den verwendeten pharmazeutischen Ölen Squalen und Squalan. Eine erhöhte Löslichkeit ungesättigter Phospholipide gegenüber gesättigten Phospholipide im ungesättigten Öl lässt sich auf mögliche Lösemittel-Phospholipid-Interaktionen, an den jeweiligen Doppelbindungen der beiden Moleküle (π - π -Interaktionen), zurückführen.

Des Weiteren wird die Anwesenheit oxidativer Verunreinigungen von Squalen genauer untersucht, ein mehrstufiges Aufreinigungsverfahren etabliert und die Auswirkungen dieser Verunreinigungen in Form einer erhöhten Löslichkeit gesättigter Phospholipide beschrieben. Die beobachtete Löslichkeitserhöhung wird im Zusammenhang mit physiologischen Emulsionen, den sogenannten Lipoproteinen, und deren Beteiligung an pathologischen Vorstufen der Entstehung von Arteriosklerose diskutiert. Dies geschieht ebenfalls unter dem Aspekt möglicher Interaktionen zwischen dem Phospholipid und der Ölphase sowie deren Einfluss auf die Stabilität von Lipoproteinen im menschlichen Körper und deren medizinischer Relevanz.

Informationen zur Zytotoxizität unterschiedlicher Wirkstoffe sowie zur Sensitivität verschiedener Tumorentitäten sind für die Durchführung von *in vivo*-Versuchen von essentiellem Interesse. Daher wird unverkapselter Wirkstoff, pharmazeutisch zugelassener Präparate aus *Viscum album* (der weißbeerenigen Mistel), zur Erprobung auf Tumorzellen verwendet. Dies sind Pflanzenextrakte, die abhängig von der verwendeten Wirtspflanze, auf denen die Mistel wächst, Unterschiede in ihrer Viscotoxin (VT)- und Mistellektin (ML)-Zusammensetzung aufweisen. abnobaVISCUM® (aV) Fraxini, Quercus und Pini, welche in ihrer ML-Konzentration sowie ML-Isoform stark variieren, wurden *in vitro* auf murinen Zelllinien untersucht.

Die Durchführung von Zellproliferationstests dient zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration der aV Präparate und zur Auswahl mög-

lichst sensitiver Zelllinien für *in vivo*-Experimente. aV Pini, das den niedrigsten ML-Gehalt, jedoch überwiegend die ML-Isoform III aufweist, zeigt eine deutlich stärkere Inhibierung der Zellproliferation der Melanomzellen B16-F10 und der Makrophagen RAW264.7 als im Vergleich zu den ML-reicheren Präparaten aV Fraxini und Quercus. Zusätzlich wird die Wirkung von extrahiertem ML I, welches aus Rohmaterial von der Esche gewonnen wurde, in einer vergleichenden *in vitro* Studie untersucht. Obwohl das getestete ML I für alle untersuchten Zelllinien zytotoxisch ist, sind in Abhängigkeit vom Zelltyp deutliche Unterschiede beobachtbar. Die murinen Dickdarmkarzinomzellen der Zelllinie C26 zeigen dabei die höchste Empfindlichkeit auf das isolierte ML I und sind daher für nachfolgende *in vivo* Versuche zu empfehlen.

Summary

The aim of this work is to generate functional lipid capsules, so called liposomes, by centrifugation of nanoemulsions, to perform a process development and product characterization of the different process steps and intermediates. In particular, this thesis focuses on interfacial phenomena in colloidal systems, which are relevant for pharmaceutical applications. The investigation of the impact of active pharmaceutical ingredients on a cellular level is an additional objective.

The centrifugal manufacturing process of liposomes from phospholipid-stabilized nanoemulsions as intermediates, is shown to be feasible. Pautot *et al.* [1, 2] introduced the concept of the sedimentation of an aqueous dispersed phase from an oil phase into a water phase. The process is investigated and proven by the use of fluorescently labelled phospholipids and their detection in the aqueous phase, as well as by the analysis of both liquid phases via dynamic light scattering. Furthermore, it is shown that phospholipids, which were dissolved in the continuous oil phase of the emulsion, are eliminated from the oil phase during centrifugation. The lipids are being adsorbed at the aqueous phase, while maximally 5% remain in the original dissolved state in the organic phase. From these results and the investigation of the aqueous phase after centrifugation it could be concluded, that phospholipids are at least 50% part of an interfacial structure between water and oil in order to stabilize the emulsion droplets.

However, based on the characterization of particles in the water phase after the centrifugation step, it could be concluded that the use of the technical process conditions, described by Pautot *et al.* [1, 2], did not allow to reach the desired encapsulation efficiencies so far. Instead, these results revealed essential tasks and open questions in order to understand the exact formation of phospholipid mono- and bilayers during emulsification and centrifugation. During the transfer of water-in-oil emulsions into the water

phase, the droplets are probably deformed, before they are covered by the second phospholipid layer at the phase boundary between both liquid phases. This is reflected by the formation of solid lipid particles or liposomes, the latter being about half of the emulsion droplet sizes, as well as by encapsulation efficiencies of about 25%. In consequence, an urgent need for analytical measurements became obvious to improve the understanding for adsorption phenomena of phospholipids as emulsifier. These investigations provide insights into the surface density of the amphiphilic molecules and contribute to an optimized formation of stable lipid layers, especially to avoid high losses of active material in the centrifugal method.

The characterization of the structure and adsorption behavior of phospholipids at the water/oil interface is done by using drop profile analysis tensiometry (PAT). Phospholipids with different saturated hydrocarbon chains, dissolved in the two pharmaceutical oils squalene or squalane, are studied leading to the packing density of adsorbed amphiphilic molecules at the interface. Depending on the oil phase's saturation, there are clear indications for monolayer formation in the unsaturated phase squalene and for multilayer formation in the saturated phase squalane. In consequence, the result of multilayer formation in squalane is concluded to be an advantage for the stability of nanoemulsions, which was however not further considered or systematically investigated in this work.

By varying the setup of the droplet phase and the surrounding phase during PAT, different results of the adsorption of phospholipids are found, which have not been described in a comparative form in the literature so far. In order to elucidate the reason of these effects, as well as to determine valid data for tensiometric studies, the well-known characterized system of chloroform with the phospholipid DPPC is analyzed as reference. Using complementary measurement techniques such as dynamic light scattering, nuclear magnetic resonance spectroscopy and phosphorus detection, the cause for these measurement differences could be identified. A depletion of phospholipids from the oil phase into the water phase was observed. This depletion had a large effect on the phospholipid concentration of an oil droplet, which has a 100-times smaller volume than the surrounding water phase, as it is the case with the conventional measurement setup. For that reason, an inverted measurement setup, with a water drop in the larger phospholipid oil reservoir, is recommended, which excludes or at least minimizes measurement artifacts. The intensive and systematic analysis of the

interface of two immiscible or partly miscible liquid phases leads to a comprehensive understanding of the solubility and adsorption behavior of phospholipids in the pharmaceutical oils squalene and squalane. Moreover, an increased solubility of unsaturated phospholipids compared to saturated phospholipids is found in unsaturated oil, which is explained by attractive solvent-solute interactions. These interactions take place at the respective double bonds (π - π interactions) of both an organic lipid phase and the unsaturated phospholipid.

Furthermore, the presence of impurities in form of oxidation products in unsaturated oil are studied analytically, showing an increased solubility of saturated phospholipids. An adequate purification procedure is introduced in order to remove and to avoid these oxidative impurities. The observation of increased solubility of saturated phospholipids is taken into consideration for the discussion about the pathological appearance of arteriosclerosis under the aspect of possible interactions between phospholipid and oil phase. The influence of these possible interactions from a physiological point of view as well as its medical relevance is discussed for the stability of lipoproteins in the human body.

For the entire development of *in vivo* pre-clinical studies, the investigation of non-encapsulated drug on tumor cells is of essential interest in order to estimate the cytotoxicity of various active ingredients and to determine the sensitivity of different tumor cell lines. Therefore abnobaVISCUM® (aV) preparations Fraxini, Quercus and Pini are studied *in vitro* on murine cell lines. These approved preparations of *Viscum album* are plant extracts, which strongly differ in their viscotoxin (VT) and mistletoe lectin (ML) composition, depending on the host tree of the harvested plant material.

Proliferation assays are performed to elucidate the inhibitory concentrations and select sensitive cell lines for further *in vivo* experiments. Here, aV Pini preparations, with the lowest ML content and predominantly ML III composition, show a stronger inhibition of proliferation compared to aV Fraxini and Quercus on both B16-F10 and RAW264.7 cells. Moreover, the effect of mistletoe lectin I, extracted from mistletoe, which was harvested from the ash tree, is investigated in a comparative study on murine cell lines in culture. Although mistletoe lectin I is cytotoxic for all tested cell lines, the sensitivity is dependent on the cell type. The murine colon carcinoma cell line C26 proved to be the most sensitive of all tested cell lines and is therefore identified as a good candidate for further *in vivo* studies.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	V
Summary	IX
1 Einleitung	1
1.1 Motivation und Ziel dieser Arbeit	1
1.2 Abgrenzung des Themengebietes.....	3
2 Stand des Wissens	5
2.1 Liposomen.....	5
2.1.1 Aufbau und Klassifizierung	5
2.1.2 Anwendungen in der pharmazeutischen Praxis	7
2.1.3 Klassische Herstellungsverfahren	8
2.1.4 Anforderungen für innovativere Herstellungsverfahren – Liposomen aus Nanoemulsionen durch Zentrifugation	10
2.2 Untersuchung der Phasengrenze von Wasser und Öl	12
2.2.1 Berechnungen zur Grenzflächenspannung	12
2.2.2 Adsorptionsuntersuchungen	13
2.3 Forschung für die Krebstherapie	16
2.3.1 Die Mistel.....	16
2.3.2 Verkapselung von Mistelinhaltsstoffen in Liposomen	17
3 Theoretische Grundlagen	21

3.1	Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme.....	21
3.1.1	Emulsionen	22
3.1.2	Tenside	27
3.2	Ober- und Grenzflächenspannung von Flüssigkeiten	33
3.2.1	Theorie zur Oberflächenspannung	33
3.2.2	Adsorptionsisothermen	35
4	Material und Methoden.....	37
4.1	Materialien	37
4.1.1	Phospholipide und Membranbestandteile	37
4.1.2	Chemikalien und Reagenzien	37
4.1.3	Puffer und Lösungen.....	38
4.1.4	Glas- und Plastikwaren	38
4.1.5	Geräte und Software	38
4.1.6	Medien und Lösungen für die Zellkultur	39
4.1.7	Verwendete Zellen	40
4.2	Phosphatbestimmung mittels Bartlett-Methode	41
4.3	Emulgierung mittels Ultraschall.....	42
4.4	Herstellung von Liposomen im Zentrifugalfeld	43
4.5	Tropfen-Profilanalyse-Tensiometrie (PAT).....	45
4.6	Analytische Messmethoden	48
4.6.1	Photonenkorrelationsspektroskopie	48
4.6.2	UV-Vis Spektroskopie	50
4.6.3	Größenausschlusschromatografie	51
4.6.4	Fluoreszenzspektroskopie	52
4.6.5	Kernspinresonanzspektroskopie	53
4.7	Aufreinigung der Ölphase	54

4.8	Zellkultur.....	55
4.8.1	Passagieren von Zellen.....	56
4.8.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	57
4.8.3	Zellzahlbestimmung und Mikroskopie.....	57
4.8.4	Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Kurven.....	59
5	Ergebnisse und Diskussion	65
5.1	Emulsionserzeugung mit natürlichen Emulgatoren.....	65
5.1.1	Einfluss der Beschallungsparameter.....	65
5.1.2	Tropfengrößenverringern durch Ultraschall- Extrusions-Kombination.....	68
5.2	Liposomen aus Nanoemulsionen mittels Zentrifugation.....	69
5.2.1	Nachweis des Phasentransfers des Emulgators.....	70
5.2.2	Charakterisierung gebildeter nanoskaliger Liposomen.....	72
5.3	Grenzflächenuntersuchung an flüssigen Phasengrenzen.....	76
5.3.1	Charakterisierung der Phasengrenze zwischen Öl und Wasser zur Emulsionsoptimierung.....	76
5.3.2	Vergleich der beiden Messaufbauten am PAT.....	84
5.3.3	Evaluierung der Messungen am PAT.....	87
5.3.4	Relative Löslichkeit von Phospholipiden in der Wasserphase.....	90
5.3.5	Einfluss unterschiedlicher Öle und Ölqualitäten auf das Adsorptionsverhalten von Phospholipiden.....	93
5.3.6	Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen.....	107
5.4	Proliferationsuntersuchung muriner Tumorzellen.....	111
5.4.1	Inkubation mit Mistelpräparaten abnobaVISCUM®.....	111
5.4.2	Inkubation mit isoliertem Mistellektin I.....	114
6	Schlussfolgerungen.....	117

7 Ausblick.....	123
Literaturverzeichnis	127
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	139
Anhang.....	143
A.1 Verwendete Messparameter	143
A.2 Überblick über die verwendeten Materialien.....	145
A.3 Überblick über erstellte Kalibrationen und Parameterfits.....	148
A.4 Ergebnisse weiterer Analysen	151
Publikationsliste.....	154

1 Einleitung

1.1 Motivation und Ziel dieser Arbeit

Für die gezielte Verkapselung von pharmazeutischen Wirkstoffen stellt die Nanotechnologie einen immensen Fortschritt dar. In diesem Forschungsgebiet ist auch die vorliegende Arbeit angesiedelt. Die Motivation dieser Arbeit wurde sehr treffend in einem Zeitungsartikel der Wirtschaftswoche von Professor Raymond Schiffelers, Nano-Forscher an der Universität Utrecht, zusammenfassend formuliert [3]: „Der Wirkstofftransport mit Nanopartikeln bietet die Chance, die Wirksamkeit von Therapien zu erhöhen und zugleich die Nebenwirkungen zu mindern. Gerade in der Krebstherapie spielt das eine große Rolle, denn Chemotherapien sind alles andere als zielgerichtet. Schließlich muss der gesamte Körper mit dem Zellgift geflutet werden, um den Krebszellen den Garaus zu machen. Auch sich schnell teilende, gesunde Zellen werden dabei getötet. Nebenwirkungen wie Haarausfall, die Schwächung des Immunsystems oder Herzschäden sind die Folge. Die Nano-Taxis steuern dagegen zielsicher nur das Tumorgewebe an. Der Trick ist in diesem Fall, dass die Fähren mit 50 bis 100 Nanometern sogar deutlich größer sind als die Wirkstoffe, die meist nur wenige Nanometer messen. Gelangen Wirkstoffmoleküle unverpackt in die Blutbahn, erreichen sie in der Regel jede Ecke des Körpers. Denn die Wände der Adern sind zwar dicht und undurchlässig für große Teilchen wie Nano-Taxis oder Blutkörperchen, Wirkstoffmoleküle jedoch können passieren. Ganz anders sieht das in krankem Gewebe aus: Adern, die Tumore oder Infektionsherde versorgen, sind löchrig und auch für die Nano-Taxis durchlässig, die so ihre Wirkstofffracht genau am gewünschten Ziel abladen können (vom 20. September 2010).“ Das Ziel dieser Arbeit ist, durch die Entwicklung eines innovativen Herstellungsverfahrens, die vollständige Verkapselung pharmazeutisch relevanter Wirkstoffe in nanoskalige Lipidkapseln – sogenannte Liposomen – für eine

effektive, zielgerichtete und nebenwirkungsarme Verabreichung durch Arzneimitteltransportsysteme, u.a. für die Krebstherapie, zu erreichen. Ausgangspunkt für die Generierung von Liposomen sollen stabile Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionen sein, die durch Emulgatoren stabilisiert und in einem weiteren Verfahrensschritt von einer zweiten Emulgatorschicht ummantelt werden. Der technologische Lösungsansatz basiert auf dem 2003 beschriebenen Verfahren von Pautot *et al.* [1, 2] und wird in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Es gilt verschiedene natürliche Emulgatoren für die pharmazeutische Wirkstoffverkapselung zu testen und geeignete Kandidaten zur Erzeugung nanoskaliger Emulsionen zu erproben, die anschließend in das Herstellungsverfahren für das Flüssig-Flüssig-System der Liposomen einfließen können. Die verfahrenstechnische Umsetzung eines kontinuierlichen Verfahrens setzt dabei die zuvor erfolgreiche Etablierung des Batch-Verfahrens voraus. Hinzukommt, dass geeignete Ölphasen zuvor ebenso ausgewählt und auf ihre Eignung hin untersucht werden sollen. Ein weiteres Ziel stellt somit dar, die eigentlichen Prozessparameter für die Erzeugung der verschiedenen Emulsionstypen sowie der Zentrifugation ausfindig zu machen.

Um die Erzeugung von Emulsionen und deren Stabilisierung mittels der Phospholipidmoleküle verstehen und beschreiben zu können, werden Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten dieser natürlichen Emulgatoren an die Wasser/Öl-Phasengrenzen zusätzlich angestrebt. Diese sollen mit Hilfe tensiometrischer Messungen systematisch durchgeführt werden und Aussagen über die Grenzflächenaktivität der lipidhaltigen Emulgatormoleküle in Abhängigkeit von ihrem Löslichkeitsverhalten in den jeweiligen flüssigen Phasen ermöglichen.

Die Untersuchung des liposomalen Arzneimittels sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stellt einen weiteren Schwerpunkt für das Ziel, der erfolgreichen Entwicklung eines neuen Herstellungsverfahrens für Liposomen, dar. Aus diesem Grund ist für das Entstehen dieser Arbeit die Erprobung des pharmazeutischen Wirkstoffes an geeigneten Tumorzellen ebenfalls vorgesehen und als eine weitere Zielsetzung zu nennen.

1.2 Abgrenzung des Themengebietes

Bei der Erzeugung von Emulsionen, bei denen es sich um thermodynamisch instabile kolloidale Systeme handelt, spielt die Auswahl eines geeigneten Emulgators eine entscheidende Rolle. Dadurch soll das System gegen Entmischungsvorgänge stabilisiert werden, was speziell für den Anwendungsfall der Herstellung von Liposomen im Zentrifugationsprozess von entscheidender Bedeutung für die spätere Produktphase ist. Für Verwendungen im kosmetischen oder medizinischen Bereich, aber auch in der Lebensmittelindustrie, müssen Emulgatoren biokompatibel sein. Phospholipide sind, als Membranlipide im Organismus, wesentlicher Hauptbestandteil der Doppellipidschicht einer Biomembran und stellen aufgrund ihres amphiphilen Charakters biokompatible Emulgatoren dar, die hervorragend für medizinische Anwendungen geeignet sind. Aus dieser Eigenschaft kann die erste Aufgabenstellung dieser Arbeit formuliert werden:

- i. *Erzeugung von Nanoemulsionen stabilisiert mit Hilfe von Phospholipiden und daraus abgeleitet die Herstellung von Liposomen im Zentrifugalfeld*

Neben den mechanischen Anforderungen zur Erzeugung stabiler Emulsionen, stellt die Grenzflächencharakterisierung der Emulgatorschicht einen weiteren Schwerpunkt dar. Diese Untersuchung wird mittels der Tensiometrie durchgeführt und soll Aufschluss über die Anlagerung der Lipide an die flüssige Phasengrenze geben und damit notwendige Formulierungshinweise für die Erzeugung stabiler Emulsionen liefern. Mittelpunkt dieser Arbeit soll daher sein, das Adsorptionsverhalten dieser natürlichen Emulgatoren an der Phasengrenze zwischen Wasser und Öl ausführlicher zu charakterisieren. Über die Bestimmung von Adsorptionsisotherme können, aus den tensiometrischen Messungen, Daten zur minimalen Fläche pro Lipidmolekül und zur kritischen Aggregationskonzentration gewonnen werden. Diese Daten können wiederum in die Berechnung der notwendigen Emulgatordichte für eine Emulsion positiv einfließen und möglicherweise ein besseres Verständnis über den Aufbau und die Struktur der Phospholipidschicht liefern. Im Rahmen dieser Arbeit galt es daher, in Abhängigkeit von verschiedenen pharmazeutisch relevanten Ölphasen, folgende Aufgabenstellungen zu klären:

ii. *Charakterisierung der Grenzflächeneigenschaften verschiedener Phospholipide an der Phasengrenze zwischen Wasser und Öl*

Dazu ist es notwendig Versuche mit variierenden Konzentrationen verschiedener Lipidkomponenten durchzuführen, welche an die Grenzfläche zwischen den beiden nicht-mischbaren Flüssigkeiten adsorbieren können. Abschließend soll aus den gewonnenen Erkenntnissen zu den Adsorptionseigenschaften die Charakterisierung der Grenzfläche erfolgen und Vorschläge zu einer optimierten Emulsionsformulierung abgeleitet werden.

Hinweise zu dem Adsorptionsverhalten von Proteinen können hilfreich sein, wenn es um die Verkapselung von pharmazeutischen Proteinlösungen geht. Des Weiteren kann ein Verständnis über mögliche Interaktionen zwischen den Phospholipiden und Proteinen dabei helfen, die Strukturbildung liposomaler Formulierungen positiv zu beeinflussen. Dafür ist die an das Öl grenzende Wasserphase durch eine pharmazeutisch relevante Wirkstofflösung zu substituieren und geeignete Messbedingungen für diesen tensiometrischen Aufbau zu etablieren. Die abgeleitete Aufgabe lautet:

iii. *Einblick zum Adsorptionsverhalten von Proteinen und Darstellung möglicher Interaktionen zu den Phospholipiden*

In einem weiteren Teil der Arbeit soll auf die Anwendung für die Krebstherapie eingegangen werden. Wie bereits im Ziel der Arbeit formuliert wurde, ist die Untersuchung des liposomalen Arzneimittels *in vivo*, also im TiermodeLL, ein wichtiger Schritt, um die Nanokapseln im Hinblick auf die Immunreaktionen zu erforschen. Aus diesem Grund gilt es folgende Aufgaben zu bearbeiten:

iv. *Aufklärung der Wirkweise und -spezifität von bestimmten pharmazeutisch relevanten Präparaten auf zellspezifischer Ebene.*

Die Zytotoxizität einer Substanz kann beispielsweise durch deren Einfluss auf die Zellteilung und das Zellwachstum, auch als Proliferation bezeichnet, betrachtet werden. Es gilt mit Hilfe eines Proliferationstests die inhibitorische Konzentration von Wirkstoffsubstanzen auf unterschiedlichen Tumorzellen (*in vitro*) zu erproben und geeignete Tumormodelle für die Tierversuche auszuwählen.

2 Stand des Wissens

2.1 Liposomen

2.1.1 Aufbau und Klassifizierung

Liposomen sind kugelförmige Vesikel in einem Größenbereich von etwa 20 bis mehreren hundert Nanometern, die aus einer Doppellipidschicht als Membranhülle aufgebaut sind. Die amphiphilen Substanzen, wie die Phospholipide, aus denen Liposomen aufgebaut sind, ordnen sich so an, dass die hydrophilen Kopfgruppen jeweils zur wässrigen Phase außerhalb und innerhalb des Vesikels gerichtet sind.

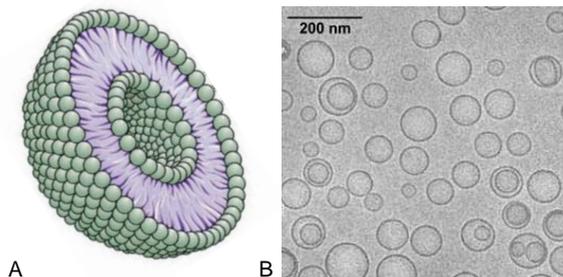


Abbildung 1: Struktur einer Doppellipidschicht. A – Schematische Darstellung von dem Schnitt durch ein Liposom [4]; B – Cryo-TEM Aufnahme von unilamellaren Liposomen [5]

Somit kann in einem Vesikel eine wässrige Phase vorliegen, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung oder Konzentration an gelöster Substanz von der äußeren wässrigen Phase unterscheidet und durch die Membranhülle abgeschottet bzw. durch diese verkapselt vorliegt. In Abbildung 1 sind diese nanoskaligen Liposomen sowohl schematisch, als auch

mittels cryo-TEM Aufnahme dargestellt. Die gezeigten unilamellaren Vesikel (UV) in Abbildung 1 B weisen etwa eine Größe von 80-100 nm Durchmesser auf. Aufgrund ihrer Größe und lamellenartigen Struktur können Liposomen in mehrere Klassen eingeteilt werden. Einschalige Liposomen werden in kleine (small unilamellar vesicle, SUV), große (large, LUV) und sehr große (giant, GUV) Vesikel unterteilt. Die mehrschaligen Liposomen besitzen mehrere Doppellipidschichten mit wässrigem Zwischenraum und werden in oligolamellare Vesikel (OV), multilamellare Vesikel (MV) und multivesikuläre Vesikel (MVV) gruppiert. Ein Überblick über die Einteilung der verschiedenen Lipid-Vesikel kann Abbildung 2 entnommen werden.

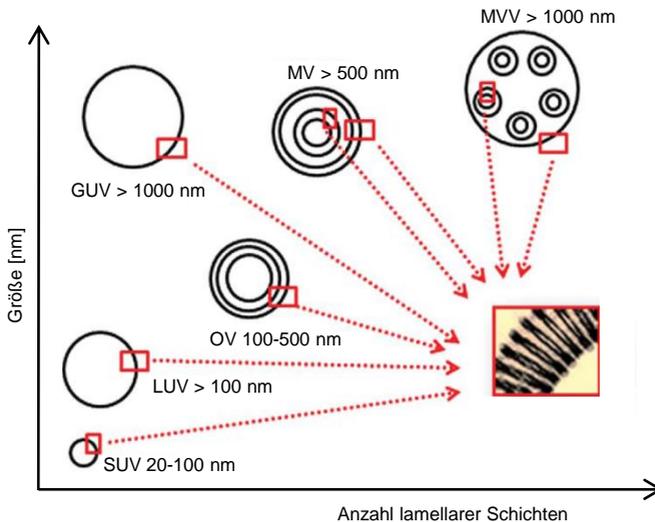


Abbildung 2: Klassifizierung der Liposomen nach Größe und lamellarer Struktur [6]

Erstmals beschrieben wurden Liposomen 1965 vom britischen Hämatologen Dr. Alec D. Bangham, als er die spontane Bildung multilamellarer Membranschichten von Phospholipiden in wässriger Umgebung beobachtete [7]. Seitdem ist der durch Selbstorganisation ablaufende Prozess der unilamellaren Vesikelbildung schon mehrfach beschrieben worden [1] und findet zahlreiche Anwendungen, vornehmlich als Transportsystem für Arzneimittel [8-10].

2.1.2 Anwendungen in der pharmazeutischen Praxis

Da die Membranen der Liposomen aus den gleichen Molekülen (Phospholipide, Cholesterol u.a.) wie biologische Zellmembranen aufgebaut sein können, sind diese in der pharmazeutischen Technologie als biokompatible und bioabbaubare Wirkstoffträger hervorragend geeignet. Sie kommen im kosmetischen sowie vor allem im medizinischen Bereich zum Einsatz. Lipidkapseln werden beispielsweise in Cremes für dermale Applikationen, aber auch für orale Präparate (Tabletten), okulärer Applikation (Augensuspensionen) sowie parenterale Injektionspräparate zur gewebsspezifischen Applikation eingesetzt. Für letzteren Einsatz sind Nanokapseln mit einer vornehmlichen Partikelgrößen von < 200 nm erforderlich [11, 12], um für die „passive“ Akkumulation am Ort erhöhter vaskulärer Permeabilität befähigt zu sein und somit die Nebenwirkungen der verkapselten Substanz verringern zu können [8].

Eingekapselt werden u.a. Enzyme oder Wirkstoffe [13-16], Nukleotide sowie kurze, einzelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle (siRNA) [17, 18]. Eine liposomale Verkapselung von pharmazeutischen Wirkstoffen oder anderen Wirkstoffpräparaten zeigt *in vivo* eine veränderte Verteilung der Substanzen [19] und bietet gegenüber dem direkten Einsatz zudem therapeutische Vorteile, was unter anderem in der Steigerung anti-inflammatorischer Effekte zum Ausdruck kommt [20]. Am Beispiel des in Liposomen verkapselten Zytostatikum Cytarabin konnten erste Verbesserungen der *in vivo* Aktivität und eine signifikante Steigerung der Überlebensrate an Mäusen mit Leukämie demonstriert werden [21, 22]. Eine weitere Besonderheit besteht in der kontrollierten Freisetzung der Wirkstoffe aus den Lipidvesikeln, die eine Art Wirkstoffdepot bilden und somit die Abgabe definierter Konzentrationen über einen bestimmten Zeitbereich hinweg gewährleisten. Hinzu kommt, dass auch der Ort der Freisetzung genau festgelegt und somit eine zielgerichtete Wirkstoffentfaltung (Drug Targeting), durch z.B. Wärme, Ultraschall und Licht oder lokalen Auslösern wie Enzyme oder pH-Änderungen, realisiert werden kann [23]. Ein gezieltes Design von Liposomen je nach therapeutischer Anwendung mit gewünschten Freisetzungsraten wurde u.a. speziell für Formulierungen mit Zytostatika, wie Doxorubicin oder Vincristin, zur Behandlung von Krebserkrankungen bereits mehrfach beschrieben [24-27].

2.1.3 Klassische Herstellungsverfahren

Für die Herstellung solcher Doppellipid-Membranvesikel von geeigneter Größe und Lipidzusammensetzung, existieren unterschiedliche mechanische Methoden. MLVs entstehen durch Hydratisierung eines zuvor erzeugten trockenen Lipidfilms, der bei der Verdampfung des organischen Lösungsmittels (LM), in dem die Lipide zuvor gelöst wurden, zurückbleibt. Dieses Verfahrensprinzip ist in Abbildung 3 A anschaulich dargestellt und repräsentiert den ersten Schritt zur Herstellung von Liposomen. Nach anschließender Ultraschallbehandlung der Vesikelformation können SUVs gebildet werden. Verwendet man anstelle von Ultraschall wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen (3 x) entstehen LUVs mit inhomogener Größe, also hoher Polydispersität. Sind monodisperse Liposomen, also LUVs mit homogener Größe gefordert, können diese mittels Extrusion erzeugt werden.

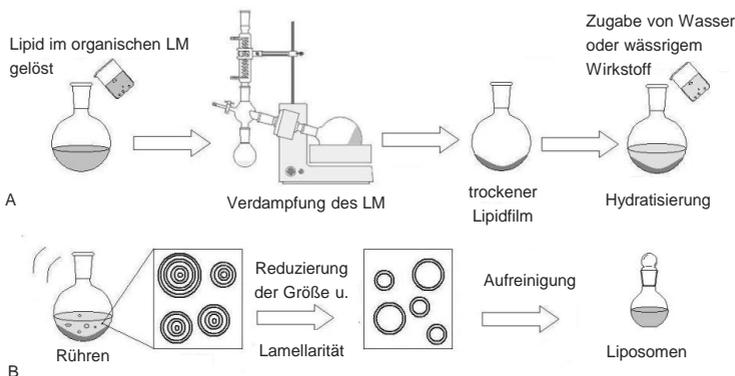


Abbildung 3: Herstellung von Liposomen mittels Lipidfilm-Methode [9]

Das Prinzip der Extrusion ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt und besteht darin, dass große Partikel durch eine Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße gepresst werden [28] und dabei kleinere Partikel mit gleichverteilter Größe entstehen, deren multilamellaren Schichten aufbrechen und somit unilamellare Vesikel bilden (Abbildung 3 B). Neben den hier benannten Methoden, die im Wesentlichen zur Reduzierung der Partikel-

größe und multilamellarer Schichten eingesetzt werden, gibt es unter anderem die Hochdruckhomogenisation und die Mikrofluidisierung, auf die an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

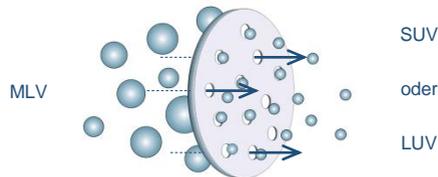


Abbildung 4: Extrusion polydisperser multilamellarer Liposomen durch eine Polycarbonatmembran (Ausschnitt aus Abb. 8 in [29])

Der dritte Schritt bei der Herstellung von Liposomen, nach der Vesikelformation und Reduzierung deren Größe, ist die Aufreinigung bzw. Aufkonzentrierung dieser Vesikel. Dieser Arbeitsschritt kann über Zentrifugation oder Größenausschlusschromatografie bzw. Dialyse oder Ultrafiltration erfolgen. Ein vollständiger tabellarischer Überblick über die verschiedenen Herstellungsverfahren zur Liposomenpräparation wurde bereits zusammengestellt [9] und erläutert die drei genannten Arbeitsschritte nochmals vertiefend.

Was all diese Herstellungsverfahren von Liposomen vereint, ist die geringe Kapazität der Einkapselung der wässrigen und oft kostenintensiven pharmazeutischen Substanzen, die mit maximal 5-15% eine sehr geringe Ausbeute darstellt [30, 31]. Daher gibt es intensive Bestrebungen innovative und effektive Herstellungsverfahren zu entwickeln, die weitere Produktfunktionalitäten und vor allem höhere Effizienz in der Wirkstoffbeladung für die Liposomen mit sich bringen, worauf im nachfolgenden Abschnitt 2.1.4 eingegangen werden soll. Ein weiteres Ziel, welches mit der Herstellung von liposomalen Formulierungen in alternativen Herstellungsverfahren verknüpft wäre, ist die Realisierung einer kontinuierlichen Betriebsweise für einen Prozess mit einer skalierbaren Anlage im Industriemaßstab. Auch auf diesen Aspekt soll im nächsten Abschnitt eingegangen werden.

2.1.4 Anforderungen für innovativere Herstellungsverfahren – Liposomen aus Nanoemulsionen durch Zentrifugation

Die geringe zu erzielende Einkapselungseffizienz, aber auch die aufwendige sowie verlustreiche und damit kostenintensive Aufreinigung der Liposomen in den sich anschließenden Verfahrensschritten, sind zwei Gründe, weshalb in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen wurden, die klassischen Herstellungsverfahren weiter zu entwickeln. Fernerhin spielt auch die Produktfunktionalisierung der inneren und äußeren Lipidschicht der hergestellten Liposomen eine große Rolle, wenn es einerseits um die gezielte Verkapselung von biologischen Wirkstoffen (z.B. für pH- oder Hitze-sensitive Proteinlösungen) im Inneren der Kapsel und andererseits um die Ermöglichung eines Schutzes vor den Reaktionen des Immunsystems und einer verfrühten Freisetzung des Liposomeninhaltes geht. Speziell die Oponierung von Liposomen durch Faktoren des Komplementsystems (Proteinkomplex C5b-9) kann die Stabilität der Nanokapseln im Blutkreislauf erschweren und zu einer ungewollt frühzeitigen Freisetzung der Wirkstoffe im Blut führen [32]. Dieses Phänomen wird in der Literatur als ABC-Effekt beschrieben, für „accelarated blood clearance“ [33, 34]. Dadurch ergeben sich ganz unterschiedliche Anforderungen an den Aufbau und die Funktionalität der jeweiligen Lipidschichten innen und außen. Die äußere Schicht mit Polymeren, z.B. aus Polyethylenglykol (PEG) zu umhüllen, stellt eine Strategie dar, um lang-zirkulierende sogenannte „Stealth Liposomes“ zu erzeugen [35-37]. Aus diesem Grund kann eine gezielte Produktfunktionalität nur über asymmetrische Doppellipidschichten gewährleistet werden, wie sie auch in der Natur, z.B. beim differenzierten Aufbau der Zellmembranen mit unterschiedlicher Lipid-, Protein oder Kohlenhydratzusammensetzung, zu finden sind. Die Doppellipidschichten aus den klassischen Verfahren sind jedoch innen und außen aus den gleichen Lipiden oder verwendeten Lipidmischungen aufgebaut.

Die Ansätze zur Weiterentwicklung der Bildung von Doppellipidschichten gehen bis in die 60-er Jahre zurück [38, 39]. Erste Liposomen aus Emulsionen in einer Benzolphase wurden bereits 1970 von Träuble und Grell hergestellt [40], was letztlich die Grundlage für den von Pautot *et al.* im Jahr 2003 beschriebenen Prozess zur Bildung von asymmetrischen Bilschichten legte [1, 2]. In diesem zweistufigen Verfahren wurden W/O-Emulsionen, die zuvor in Dodecan mit Phospholipiden als Emulgatoren hergestellt wurden, auf eine Wasser- und ölige Zwischenphase aufgeschichtet und anschließend durch Zentrifugation in die unterliegende wässrige Phase überführt.

Der Transport der Wassertröpfchen von der Öl- in die Wasserphase erfolgt aufgrund der Dichtedifferenz beider flüssigen Phasen. Dabei ummanteln sich die Wassertröpfchen beim Durchtritt durch die Grenzphase mit einer zweiten Phospholipidmonoschicht, welche sich an der Grenzschicht zwischen Wasser und der Zwischenphase abgesättigt hatte. Dieses Prinzip nach Pautot *et al.* [1, 2] ist in Abbildung 5 vereinfacht dargestellt.

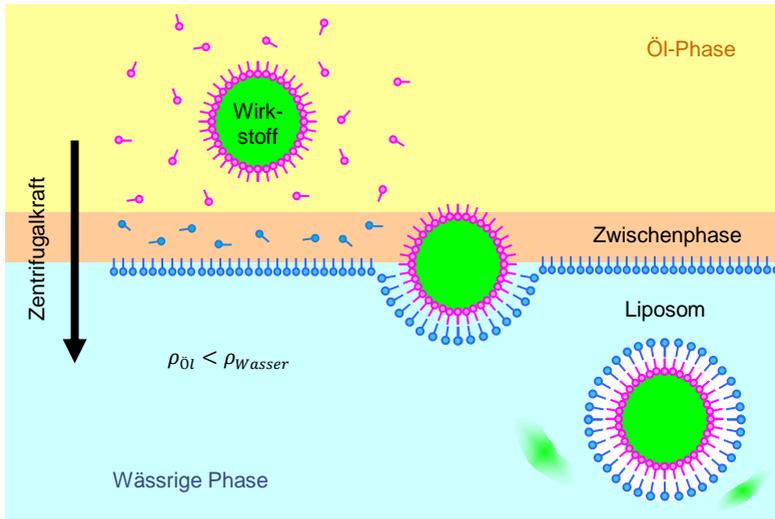


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Liposomenpräparation im Zentrifugalfeld aufgrund der Dichteseparation zuvor erzeugter inverser Emulsionströpfchen

Eine Weiterführung dieser Arbeit erfolgte am Beispiel kationischer Lipide, speziell für negativ-geladene zu verkapselnde Substanzen, im Inneren und neutralen bis leicht negativ-geladenen Lipiden in der äußeren Schicht [41], welche eine unspezifische zelluläre Aufnahme minimieren sollte. In dieser Studie wurde neben Dodecan, auch bereits die organische Phase Squalen getestet und ein höherer Ertrag an erzeugten Liposomen beschrieben, weshalb dieses Öl aufgrund seiner Pharmazulassung und den Vorteilen in der Prozessführung (schnellerer Sedimentationsvorgang durch geringere Viskosität) auch für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt wurde.

2.2 Untersuchung der Phasengrenze von Wasser und Öl

2.2.1 Berechnungen zur Grenzflächenspannung

Bestrebungen die Grenzflächenspannung zwischen zwei nicht-mischbaren flüssigen Phasen berechnen zu können, gehen bis auf das frühe 20. Jahrhundert zurück. Die einfachste empirische Korrelation zwischen den Oberflächenspannungen σ einer Flüssigkeit (L) und einem Fluid (F; zweite Flüssigkeit oder Gas) und ihren korrespondierenden Grenzflächenspannungen wurde 1907 von Antonow beschrieben [42].

$$\sigma_{LF} = \sigma_L - \sigma_F \quad . \quad (1)$$

In vielen Fällen ist die Abschätzung mit dieser Gleichung jedoch nicht ausreichend und hinlänglich korrekt. Durch die Einführung eines empirischen Korrektorkoeffizienten C im Jahr 1957 von Girifalco und Good [43], sollte die Adhäsion zwischen den fluiden Phasen durch die Abschätzung der Interaktionsenergie aufgrund von Dispersionskräften mit berücksichtigt werden

$$\sigma_{LF} = \sigma_L + \sigma_F - 2C\sqrt{\sigma_L\sigma_F} \quad , \quad (2)$$

wobei C Werte zwischen 0,55-1,15 einnehmen kann. Kwok und Neumann führten 2000 einen weiteren Lösungsansatz ein

$$\sigma_{LF} = \sigma_L + \sigma_F - 2\sqrt{\sigma_L\sigma_F}(1 - K(\sigma_L - \sigma_F)^2) \quad , \quad (3)$$

bei dem K an experimentelle Daten angepasst wird [44]. All diese Ansätze können praktisch jedoch nicht verwendet werden, sobald die Stoffsysteme partiell ineinander mischbar sind. Eine allgemeingültige Formulierung einer Korrelation von Oberflächenspannungen und korrespondierender Grenzflächenspannungen auf Grundlage der Gibbsschen Theorie zu definieren, brachte Marmur und Valal 2010 dazu eine effektive Grenzflächenspannung einzuführen [45]:

$$\sigma_{ef} = \sigma_L + \sigma_F - \eta\sigma_L^n\sigma_F^{1-n} \quad \text{mit} \quad (4)$$

$$\cosh\left(\frac{\sigma_{ef}}{\sigma_0}\right) (\sigma_{ef})^{-m} \sigma_{LF} = \cosh\left(\frac{\sigma_L}{\sigma_0}\right) (\sigma_L)^{1-m} - \cosh\left(\frac{\sigma_F}{\sigma_0}\right) (\sigma_F)^{1-m} \quad . \quad (5)$$

In diesen beiden Gleichungen stellen η und n sowie m und σ_0 Konstanten dar, die für verschiedene experimentelle Datensätze unterschiedlicher Stoffsysteme bei 20°C optimiert wurden (Tabelle 4 in [45]).

Diese universell empirische Korrelation bildet, zusammen mit einem ermittelten Set an Parametern, eine Vielfalt an Grenzflächenspannungen für Flüssig-Flüssig-Systeme deutlich besser ab, als es mit den vorherigen Korrelationen möglich war. All diese Abschätzungen sind jedoch nur für reine flüssige Stoffphasen gültig und beziehen die Adsorption von grenzflächenaktiven Stoffen nicht mit ein.

2.2.2 Adsorptionsuntersuchungen

Die kinetische Adsorption von Phospholipiden an der Grenzfläche von Luft und Wasser wurde bereits ausführlich u.a. für Monoschichten aus Phosphatidylcholin verschiedener Fettsäureketten beschrieben [46]. Eine verwendete Methode zur Untersuchung von Oberflächen ist beispielsweise die Ende des 19. Jahrhunderts erstmals in *Nature* erwähnte Schieberinne [47], welche später erweitert und heute als Langmuir-Filmwaage bekannt ist, da Irving Langmuir für seine Entdeckungen in der Oberflächenchemie 1934 dafür den Nobelpreis für Chemie erhielt. Dabei kann die Oberflächenspannung u.a. mit Hilfe einer Wilhelmy-Platte bestimmt werden, bei der die Benetzungskraft einer senkrecht aufgehängten Platte gemessen wird.

Durch die Entwicklung des Tropfen-Profilanalyse-Tensiometers, bei der die Ober- bzw. Grenzflächengestalt berücksichtigt werden, wurden zudem auch die Phasengrenzen zwischen Wasser und einer zweiten flüssigen, nicht-mischbaren organischen Phase zugänglich [48]. Messungen zur dynamischen Grenzflächenspannung mittels der Profilanalyse sind inzwischen ein etabliertes Verfahren, um flüssige Phasengrenzen zu charakterisieren und das Adsorptionsverhalten von grenzflächenaktiven Substanzen, wie beispielsweise Phospholipiden, als Funktion der Zeit sowie der Konzentration genauer zu charakterisieren. Dabei werden die experimentellen Koordinaten des Tropfenprofils an die Gauss-Laplace-Gleichung (entspricht in parametrisierter Form folgenden 3 Differentialgleichungen 1. Ordnung) angepasst und eine integrale Grenzflächenspannung bestimmt, die mit dem theoretisch ermittelten Tropfenprofil übereinstimmen [49].

$$\frac{dx}{ds} = \cos(\beta) \quad , \quad (6)$$

$$\frac{dz}{ds} = \sin(\beta) \quad \text{und} \quad (7)$$

$$\frac{d\beta}{ds} = \frac{1}{r_1} = \pm \frac{\Delta\rho g z}{\gamma} + \frac{2}{B} - \frac{\sin(\beta)}{x} \quad (8)$$

Parameter s beschreibt die Länge der Kurve (Bogenlänge), β den Kontaktwinkel, r den Krümmungsradius und B den Krümmungsradius am Tropfenpol. Die Anpassung an die verschiedenen Profile im kartesischen Koordinatensystem ist in Abbildung 6 anschaulich gezeigt, setzt für die reale räumliche Beschreibung des Tropfens jedoch Achsensymmetrie um die z-Achse voraus. Je nachdem ob es sich um einen aufgrund höherer Dichte „hängenden“ oder durch Auftrieb „stehenden“ Tropfen handelt, ist das Vorzeichen in Gl.(13) negativ bzw. positiv.

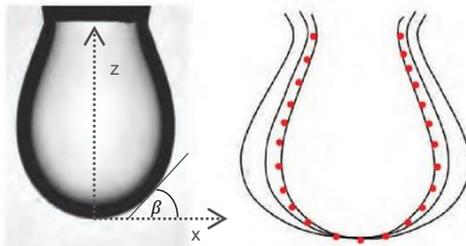


Abbildung 6: Bild eines hängenden Tropfens und schematische Darstellung der Anpassung an die Gauss-Laplace-Gleichung (6)-(8) an die experimentellen Koordinaten (rote Punkte) des Tropfenprofils (Tropfenprofil aus [49])

Diese nicht-invasive Methode liefert fernerhin Informationen über die Aggregat- bzw. Mizellbildung der zur Selbstorganisation neigenden Moleküle und erschließt damit die Löslichkeit des jeweiligen Moleküls in der wässrigen oder nicht-polaren Phase [50, 51]. In einer organischen Phase formen sich jedoch inverse Mizellen [52], was in Abbildung 7 schematisch anhand der 3 Übergangsbereiche dargestellt ist. In geringen Konzentrationen liegen Phospholipide molekular gelöst in der Volumenphase vor (Bereich I) und diffundieren an die Grenzfläche zwischen Wasser und Öl, was bewirkt, dass sich die Grenzflächenspannung für dieses fluide System erniedrigt. Höhere Konzentrationen an Emulgator bewirken eine starke Abnahme der Grenzflächenspannung (Bereich II) bis zu einem Bereich, an dem eine Zunahme

der Konzentration keinen absenkenden Einfluss mehr auf die Grenzflächenspannung ausübt, da an der Grenzfläche die dichteste Packung aufgebaut ist. Diese kritische Aggregationskonzentration (CAC) leitet den Konzentrationsbereich ein, in dem überschüssige Moleküle beginnen, Aggregate in der Volumenphase zu formen (Bereich III).

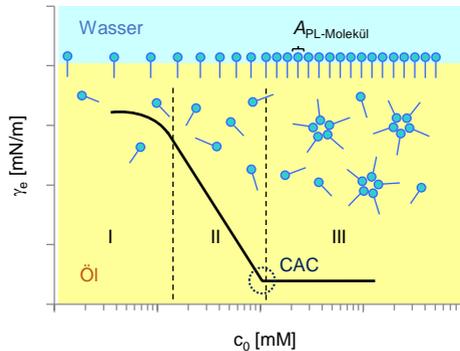


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Adsorptionsisotherme in Bezug auf die Phospholipid (PL) Löslichkeit unterteilt in 3 Bereiche: I – molekular gelöste PL; II – PL adsorbieren an die Grenzfläche bis dichte Packung aufgebaut ist (minimale Fläche A pro PL-Moleküle); III – Aggregatbildung der PL in der Volumenphase ab kritischer Aggregationskonzentration (CAC)

Des Weiteren kann aus ermittelten Adsorptionsisothermen die minimale Fläche berechnet werden, die ein adsorbiertes Molekül, wie in Abbildung 7 gezeigt, an der Grenzfläche einnimmt und somit Rückschlüsse auf den Packungsgrad bzw. die Dichte der geformten Phospholipid-Monoschichten gezogen werden. Ein Vergleich von gebildeten Phospholipid-Schichten an Wasser/Luft-Grenzflächen mit denen an Wasser/Öl-Grenzflächen wurde erstmalig 1988 von Grandell und Murtomäki publiziert [53] und machte deutlich, dass die Adsorptionseigenschaften der Phospholipide in einem Medium nicht direkt auf ein anderes fluides System übertragen werden können. Untersuchungen existieren inzwischen beispielsweise an Grenzflächen von Wasser und n-Dodecan [54], Chloroform [55, 56], 1,2-Dichlorethan oder Triolein [57]. Für pharmazeutisch relevante, d.h. biokompatible, nicht-polare Phasen existieren allerdings kaum umfangreiche Untersuchungen zu dem Adsorptionsverhalten von Phospholipiden.

der Oberfläche der Zellmembran erkennt und so der toxischen α -Kette ermöglicht, in die Zielzelle einzudringen [66]. Aufgrund der immunstimulierenden Wirkung und der hinzukommenden nachweislichen Verbesserung des Allgemeinzustandes von Krebspatienten [67-69], spielen die wässrigen Extrakte von *Viscum album*, vor allem die isolierten und aufgereinigten Mistel-*lektine* [70] eine wichtige Rolle in der adjuvanten Krebstherapie.

2.3.2 Verkapselung von Mistelinhaltsstoffen in Liposomen

Die gezielte Verkapselung von pharmazeutischen Wirkstoffen kann, wie bereits unter 2.1.2 beschrieben, durch Liposomen, erfolgen. Bereits seit 1974 wurden liposomale Formulierungen für die Krebstherapie eingeführt [71]. Für die Mistelinhaltsstoffe empfiehlt es sich ebenfalls eine vor der Immunabwehr schützenden „Hülle“ bereit zu stellen, um beschriebene Effekte, wie den ABC-Effekt, durch die intravenöse Applikation zu minimieren oder gar zu verhindern. Diese gezielte Modifikation der Liposomen kann, wie unter 2.1.4 beschrieben, zum Beispiel durch PEG erfolgen [35-37].

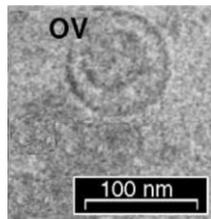


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines oligolamellaren Vesikels (OV) in abnovaVISCUM® (Ausschnitt aus Abbildung 1d [72])

Die Mistelpräparate der Abnoba GmbH, abnovaVISCUM® (aV), werden durch Pressung des pflanzlichen Rohmaterials und anschließender Filtration und Strömung des Mistelextraktes gewonnen. Die Injektionspräparate unterscheiden sich in Bezug auf die Auswahl von 9 verschiedenen Wirtsbäumen, aus denen Arzneimittel mit jeweils eigener Zulassung und eigenem Handelsnamen hergestellt werden. Jedes dieser Arzneimittel wird aus Extrakten einer Sommer- und einer Winterernte des Pflanzenmaterials her-

gestellt und in einem etablierten Strömungsverfahren vereinigt. Alle Herstellungsschritte sind prozessstandardisiert, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Das fertige Arzneimittel, welches im weiteren Produktionsverlauf im Reinraum in sterile Ampullen abgefüllt wird, weist bereits durch natürlich enthaltene Lipide liposomale Strukturen auf, wie in Abbildung 9 zu sehen ist [72].

Um den Mistelsaft bzw. seine isolierten Hauptkomponenten vollständig und gezielt zu verkapseln, ist es nötig diese durch Liposomen zu umhüllen und von dem freien, nicht-verkapselten Wirkstoff zu trennen. Ein Versuch Mistelinhaltsstoffe in verschiedene Lipidmischungen und Lipidkonzentrationen einzukapseln, offenbarte unterschiedliche Strukturen und Aggregationen, bei den durch Extrusion hergestellten Liposomen. Die cryo-TEM Aufnahmen dieser Untersuchung von Manojlovic *et al.* (2008 [31]), sind in Abbildung 10 dargestellt und zeigen je nach Lipidkomposition unterschiedliche Vesikelstrukturen: A – 20 mM DOPC/Chol/DPPC (60:30:10 Mol%) Liposomen, die sphärisch, einschichtige Strukturen aufweisen; B – 20 mM DOPC/Chol/DPPC (40:30:30 Mol%) Liposomen in Form länglicher, adhäsiv aneinander gestapelter Bläschen und C – 100 mM DOPC/Chol/DPPC (40:30:30 Mol%) multilamellare Liposomen.

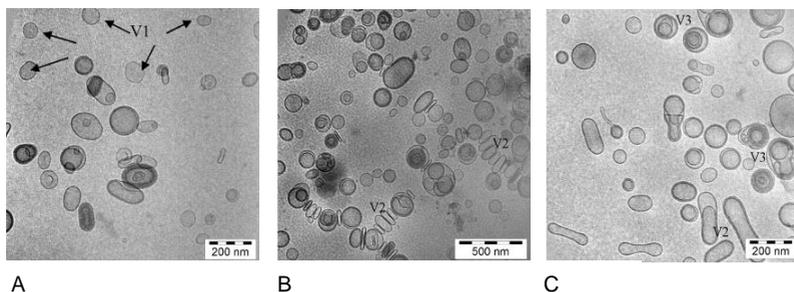


Abbildung 10: Cryo-TEM-Bilder von drei mit Mistellektin beladenen Liposomenproben [31]: A – V1: sphärisch , einschichtige Vesikel ; B – V2: längliche Bläschen; C – V3: multilamellare Vesikel

Die Herstellung der hier dargestellten Liposomen erfolgte über Extrusion durch eine 80 nm Membran mit den verschiedenen benannten Lipidmischungen und Konzentrationen. Die optische Darstellung der Formulierungen deutet auf einen zur Aggregation neigenden Charakter der mit Mistellektin beladenen Liposomen hin. Speziell die Formulierungen mit 20 mM Lipid und höherem Cholesterolgehalt von 30 Mol% weisen Liposomen in Form läng-

licher Bläschen auf, was möglicherweise auf Interaktionen zwischen den Proteinen im Mistelsaft und Bestandteilen der Doppellipidschicht zurückgeführt werden kann.

Diese Beobachtung machte deutlich, dass eine genauere Untersuchung von Phospholipid-Protein-Interaktionen an den flüssigen Grenzflächen und Membranen notwendig ist, um auch das Zirkulieren dieser Transportvesikel im menschlichen Organismus besser verstehen und charakterisieren zu können. Voraussetzung dafür ist zuerst, eine gezielte und umfangreiche Untersuchung der mit Phospholipiden stabilisierten Phasengrenze von Wasser und Öl in den Emulsionen, welche die späteren Liposomen formen sollen, und diese Erkenntnisse auf die Doppellipidschichten zu übertragen.

3 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel soll ein einführendes Verständnis in die Thematik eröffnet und grundlegend relevantes Wissen für das bearbeitete Themengebiet zusammengefasst werden. Die theoretischen Grundlagen zu den Gebieten der Physikalischen als auch makromolekularen Chemie werden im Unterkapitel 3.1 besprochen und geben einen Überblick über die Grenzflächeneigenschaften kolloidaler Systeme [73, 74].

3.1 Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme

Die Grenzflächen- und Kolloidchemie beschäftigt sich mit dem Aufbau und den Eigenschaften von Grenzflächen und Teilchen in kolloiden Dimensionen. Der kolloiddisperse Zustand grenzt physikalisch-chemisch betrachtet an einen Bereich zwischen molekularer Dimension (kleine Moleküle) und makroskopisch unterscheidbare heterogene Systeme (Makroemulsionen, Dispersionen). Die mittlere Partikelgröße, bei der von kugelförmigen Teilchen ausgegangen wird, ist dabei in den konventionellen Grenzen von 1-500 nm festgelegt. Folglich sind Kolloide besonders fein verteilte Systeme, denen aufgrund der geringen Größe ihrer Partikel spezifischen Eigenschaften zugesagt werden können. Der Zustand und die Eigenschaften der Grenzfläche um ein kolloides Partikel sind ausschlaggebend für die Stabilität des gesamten dispersen Systems. Daher ist es von Bedeutung sich der einzelnen beteiligten Phasen der Kolloidchemie bewusst zu machen und deren spezifischen Eigenschaften genau zu kennen. Die verschiedenen kolloidchemischen Erscheinungen, wie z.B. Aerosole, Suspensionen und Emulsionen, ergeben sich aus den verschiedenen Kombinationen der Aggregatzustände der beteiligten Phasen. Daraus resultierend wird die Kontaktfläche zweier nicht-mischbarer Phasen im grundlegendsten Sinne als Grenzfläche bezeichnet. Noch exakter ist die Verwendung des Begriffes Grenzphase, da Moleküle in der Realität auch in der Grenzfläche eine dreidimensionale Ausdehnung besitzen und somit im mathematischen Sinne eine Ebene aufspannen, an der sich zwei kondensierte Phasen berühren.

Von Oberfläche wird konsequenterweise nur dann gesprochen, wenn an einen Festkörper oder eine Flüssigkeit ein Gas angrenzt (Kapitel 1 in [74]).

3.1.1 Emulsionen

Die grenzflächenchemische Erscheinung einer Emulsion ist ein kolloides Phänomen, bei der die beteiligten Phasen einen flüssigen Aggregatzustand aufweisen. In diesem System ist eine Flüssigkeit, auch disperse (vom lat. *dispergere* = zerstreuen, ausbreiten, verteilen) Phase genannt, in einer zweiten Flüssigkeit, der kontinuierlichen Phase, in nanoskaligen Tropfen fein verteilt [73]. Die beiden Flüssigkeiten sind nicht miteinander mischbar. Durch mechanischen Energieeintrag kann eine zu emulgierende flüssige Phase in kleine Tropfen fein verteilt werden, wodurch neue Oberfläche geschaffen wird. Das Resultat kann eine Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsion sein, bei der die disperse Phase eine organische Lösung darstellt, die von der kontinuierlichen Phase Wasser oder einer wässrigen Lösung umgeben ist. Eine Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsion spiegelt den inversen Fall wider. Beide Emulsionstypen sind in Abbildung 11 dargestellt. Je nach Tröpfchengröße können Emulsionen in Makro- und Mikroemulsionen unterschieden werden. Unter dem Begriff Makroemulsionen versteht man Tröpfchen mit einem durchschnittlichen Tropfendurchmesser über 1 μm . Die Mikro- bzw. Nanoemulsionströpfchen sind mit ungefähr 10- 200 nm wesentlich kleiner.

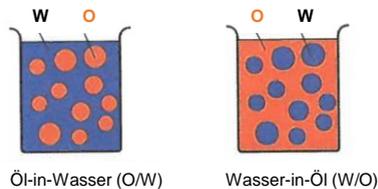


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer O/W- und W/O-Emulsion (Ausschnitt aus Abbildung 4, Kapitel I [49])

Emulgierte Tröpfchen haben allerdings das Bestreben sich wieder zu einer einheitlichen Phase zu vereinigen, da dieser Zustand im thermodynamischen Sinn nicht stabil ist (Kapitel 1.3, 2.2 und 9 in [74]).

3.1.1.1 Destabilisierung „ungeschützter“ Emulsionen

Emulsionen sind thermodynamisch instabile Systeme, in denen die kolloiden Partikel, also die in einer Flüssigkeit fein verteilten Tröpfchen einer zweiten Flüssigkeit, dazu tendieren ihre Oberflächen zu reduzieren, wodurch sich das System wieder in die beiden ursprünglichen flüssigen Phasen separiert (siehe Abbildung 1 in [75]). Der Zerfall von Emulsionen kann durch Aggregatbildung und anschließender Aufrahmung, der leichteren dispersen Phase, bzw. durch Sedimentation, der schwereren dispersen Phase, erfolgen und in der vollständigen Entmischung der beiden Phasen resultieren (siehe Abbildung 12).

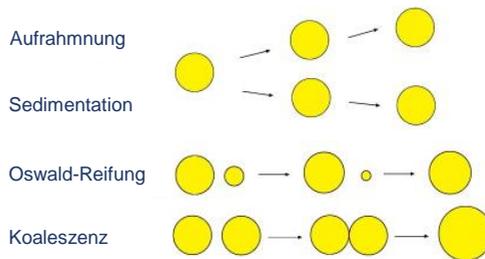


Abbildung 12: Schematische Darstellung möglicher Instabilitätsmechanismen von Emulsionen (Ausschnitt aus Abbildung 1 in [76])

Allerdings wird dieser Vorgang durch die Reibungskraft, welche das Dispersionsmedium auf das Partikel ausübt, vermindert. Der spontan ablaufende Vorgang der natürlichen Alterung einer Emulsion wird Ostwald Reifung genannt und ist ebenfalls in Abbildung 12 dargestellt. Dabei entstehen große Tröpfchen auf Kosten kleinerer. Ein weiterer oberflächenreduzierender Vorgang stellt die Koaleszenz dar (Abbildung 12, unten). Man spricht von Koaleszenz, wenn zwei dispergierte Flüssigkeitstropfen aufgrund ihrer Bewegung in der kontinuierlichen Phase aufeinandertreffen und sich vereinigen. Der neugebildete Tropfen weist dann, bei gleichbleibendem Volumen beider Tropfen zusammen, eine kleinere Ober- bzw. Grenzfläche auf, als die beiden Einzeltropfen. Ursache der Koaleszenz ist also das Streben nach minimaler Oberfläche bei größtem Volumen.

Bei dem Vorgang der Destabilisierung durch Phasentrennung einer emulgierten Flüssigkeiten, besitzt das Partikel aufgrund des Vorzeichens aus der Dichtedifferenz entweder eine nach oben gerichtete Auftriebs- (oder Auf-

rahm)-geschwindigkeit u_A oder unten gerichtete Sedimentationsgeschwindigkeit u_S . Für diese Größen und der getroffenen Annahme der Kugelgeometrie für die kolloiden Tröpfchen kann somit das Stokes-Gesetz angewendet werden:

$$\mathbf{u}_A = \mathbf{u}_S = \frac{2(\rho_1 - \rho_2)r^2 g}{9\eta} . \quad (9)$$

Die Stokessche Geschwindigkeit eines aufsteigenden oder sedimentierenden Partikels ist demnach proportional zu dem Quadrat des Tropfenradius $r (= d/2)$, der Dichtedifferenz der emulgierten Flüssigkeiten $(\rho_1 - \rho_2)$ und der Gewichtskraft g sowie umgekehrt proportional zu dem Viskositätskoeffizienten η , welcher die Reibung mit dem Medium berücksichtigt.

Meist wird die wirkende Kraft auf ein Partikel durch ein Vielfaches von g ausgedrückt. Im Falle der Drehzahlangabe in rpm wird anstelle von g eine Zentrifugalbeschleunigung nach folgender Formel berechnet:

$$\mathbf{a} = \omega^2 \mathbf{r}_{\text{Zentrifuge}} , \quad (10)$$

mit der Winkelgeschwindigkeit $\omega = 2\pi n$. Dabei stellt n die Drehzahl bzw. Frequenz dar, welche in der SI-Einheit s^{-1} angegeben wird, und $r_{\text{Zentrifuge}}$ entspricht dem Abstand der Probe zur Rotationsachse der Zentrifuge.

3.1.1.2 Stabilisierung von Emulsionen durch Emulgatoren

Um der zuvor beschriebenen Entmischung entgegen zu wirken und eine Emulsion zu stabilisieren, können dem System Emulgatoren zugesetzt werden, siehe Abbildung 13. Diese Stabilisatoren werden auch Tenside, Detergentien, grenzflächenaktive Substanzen oder Surfactants (engl. surface active agents) genannt, deren chemischer Aufbau und Eigenschaften im Abschnitt 3.1.2 ausführlich besprochen werden. Der Mechanismus der Grenzflächenstabilisierung geht davon aus, dass das Tensid an der Tröpfchenoberfläche eine Adsorptionsschicht aufbaut, wodurch die Wechselwirkung zwischen den Wasser- bzw. Öltröpfchen verändert und Koaleszenz verhindert wird.

Die Adsorption und Orientierung des Emulgators hängt sowohl von seiner Löslichkeit in der Öl- als auch in der Wasserphase ab. Nach der Regel von Bancroft übernimmt bei Zugabe eines Emulgators diejenige Phase die Rolle des Dispersionsmittels, in welcher sich der Emulgator folglich besser löst.

Mit steigender Löslichkeit des Emulgators vergrößert sich in jeder der beiden Phasen auch die Wechselwirkung der Moleküle mit dem Emulgator. Dies hat zur Folge, dass beide Phasen das Bestreben aufbringen auseinander zu fließen und die Grenzfläche in Richtung der Phase mit der höheren Oberflächenspannung gekrümmt wird. Die Emulgatorzusätze bewirken somit an den Phasengrenzen die Ausbildung von wasser- bzw. ölstabilen Adsorptionsschichten, wodurch die Annäherung von dispergierten Emulsionströpfchen verhindert und Koaleszenz unterbunden wird.

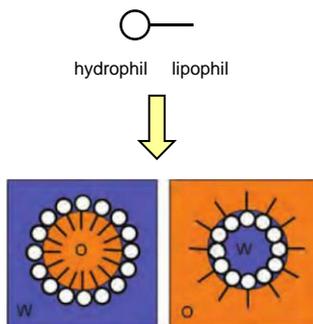


Abbildung 13: Stabilisierung von Emulsionen durch die Verwendung von Emulgatoren (Ausschnitt aus Abbildung 6, Kapitel I [49])

3.1.1.3 DLVO-Theorie

Die theoretischen Grundvorstellungen zur Stabilität kolloider Dispersionen und Emulsionen sind analog und wurden in den Jahren von 1939 bis 1945 von den Wissenschaftlern Derjagin und Landau in der Sowjetunion sowie Verwey und Overbeek in den Niederlanden ausgearbeitet. Allerdings bestehen Unterschiede aufgrund der speziellen Eigenschaften der Systeme selbst. Beim Zerfall von Dispersionskolloiden bleibt die Partikelgestalt weitgehend erhalten, was bei Emulsionen nicht der Fall ist, wenn sich die Tröpfchen durch Koaleszenz vereinigen. Aus diesem Grund werden zur Stabilisierung der Emulsionen, wie bereits diskutiert, Tenside eingesetzt.

Bei den Emulgiervorgängen spielt die elektrische Ladung an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen Öl und Wasser eine besondere Rolle. Dort bilden sich unter anderem durch Reibung der Tröpfchen untereinander

zwei Potentialbereiche aus, mit einem zwar nicht messbaren, jedoch konstantem Oberflächenpotential des starren Anteils der Doppelschicht (Sternschicht) und einem diffusen Anteil der Doppelschicht, in dem das elektrische Potential abfällt (Abbildung 14). Somit liegt um ein durch ein Tensid stabilisiertes Emulsionströpfchen eine elektrochemische Doppelschicht vor, welche Tröpfchen mit gleichem elektrischem Vorzeichen abstößt und Koaleszenz verhindert. Durch Messung der Zeta-Potentiale, welche sich aus der elektrophoretischen Beweglichkeit der Emulsionströpfchen ergeben, kann Auskunft über die Struktur der Adsorptionsschicht an der Phasengrenze erhalten werden. Dieses elektrokinetische Potential (Zeta-Potential) bezieht sich auf die Potentialdifferenz der diffusen Schicht und ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

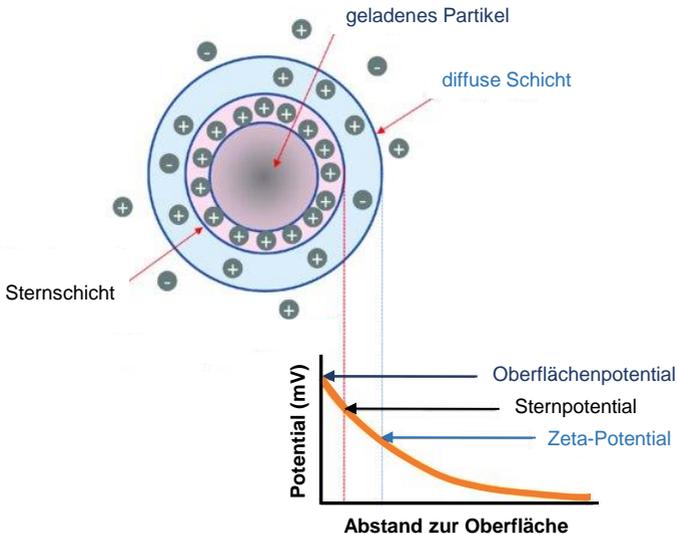


Abbildung 14: Illustration der elektrochemischen Doppelschicht eines negativ geladenen Partikels und des sich ergebenden Zeta-Potentials [77]

Abhängig von der Zusammensetzung der Emulsion können sich unterschiedlich dicke elektrochemische Doppelschichten aufbauen, für die eine Abschätzung angegeben werden kann (Kapitel 9.4 in [74]). Bei W/O-Emulsionen wird von Dicken zwischen 1-5 μm gesprochen, wohingegen O/W-

Emulsionen nur eine Dicke von etwa 10^{-3} μm aufweisen und somit weniger weitreichendere Wechselwirkungen zwischen den geladenen Tröpfchen ausüben, wodurch Koaleszenz der Öltröpfchen nur mit größerem Energieaufwand möglich ist, als es bei den Wassertröpfchen der Fall ist. Die abstoßende Wirkung von Ladungen gleichen Vorzeichens (elektrostatische Abstoßungsenergie) ist daher stark vom Potential der diffusen Doppelschicht abhängig. Die Stabilität einer Emulsion wird allerdings auch von Anziehungs- und Dispersionskräften (Van-der-Waals Kräfte) beeinflusst, in welche die Wechselwirkungsenergien mit dem Dispersionsmittel ebenfalls mit eingehen. Allerdings wird bei der Betrachtungsweise die Wirkung des Dispersionsmediums auf die Teilchenwechselwirkung vernachlässigt, was die Gültigkeit und Aussagekraft der DLVO-Theorie quantitativ einschränkt (Kapitel 9.4 und 10.6 in [74]).

3.1.2 Tenside

Die Tensidchemie stellt einen bedeutenden Sektor in der Chemischen Industrie aber auch in der Lebensmitteltechnik, Kosmetikindustrie und der Pharmazie dar. Daher ist es von Bedeutung das chemische Strukturprinzip und die wesentlichsten kolloid- und grenzflächenchemischen Eigenschaften der Tenside zu kennen, was in den folgenden Unterkapiteln erläutert werden soll.

3.1.2.1 Chemischer Aufbau und physikalische Eigenschaften von Tensiden

Der generelle Aufbau der Tenside kann so beschrieben werden, dass sich das Gesamtmolekül aus einer hydrophilen (polaren) Kopfgruppe und einer hydrophoben (unpolaren) Kohlenwasserstoffgruppe zusammensetzt, was in Abbildung 15 schematisch zu sehen ist.

Der hydrophobe Molekülanteil der Tensidmoleküle richtet sich beim Adsorptionsprozess zur hydrophoben Oberfläche (z.B. Luft) aus und kann Van-der-Waals-Kräfte ausbilden, während sich die hydrophilen Kopfgruppen der Tensidmoleküle zur hydrophilen Phase (z.B. Wasser) ausrichten und Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Bei diesen grenzflächenaktiven Substanzen handelt es sich demnach um amphiphile Substanzen, die an Ober- bzw. Grenzflächen adsorbieren und Monoschichten ausbilden können oder in Volumenphasen ab einer bestimmten Konzentrationen zu Mizellkolloiden aggregieren können. Die Bildung von Mizellen wird unter 3.1.2.2 noch aus-

fürlicher beschrieben und ist in Abbildung 15 ebenfalls angedeutet. Aufgrund der soeben beschriebenen Fähigkeit sind Tenside dazu in der Lage die Benetzungs-, Grenzflächen- oder Adsorptionseigenschaften von Oberflächen gezielt zu beeinflussen, was sich in verschiedenen Anwendungsgebieten zu Eigen gemacht wird. Tenside kommen u.a. als Wasch-, Schmier- oder Dispergiermittel zum Einsatz, aber auch bei der Herstellung von Schäumen. Sie sind des Weiteren Zusatzstoffe in der Papier-, Kunststoff-, Leder- oder Farbindustrie und werden bei der Bildung von Emulsionen, sowie deren Stabilisierung verwendet.

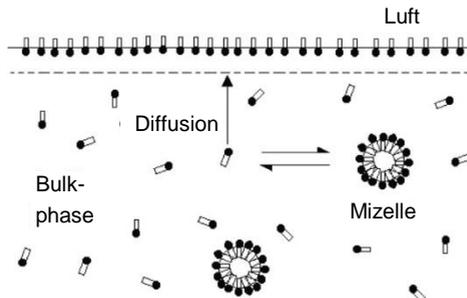


Abbildung 15: Darstellung von Tensiden in wässriger Umgebung, an der Grenze zu Luft und aggregiert zu Mizellen [78]

Anhand der Ladungsstruktur ihrer Kopfgruppe können Tenside in verschiedene Typen klassifiziert werden, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Aber auch aus der Kettenlänge der hydrophoben Kohlenwasserstoffgruppe resultieren spezifische Eigenschaften. Wie bereits 1964 von Lange beschrieben, verschieben sich mit zunehmender Kettenlänge die Werte der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) zu geringen Tensidkonzentrationen (Seite 228 in [74]).

Tabelle 1: Übersicht über die Tensidklassen

Klasse	Ladung der Kopfgruppe	Beispiel
Anionische Tenside	negativ	Natriumalkylbenzolsulfonat
Kationische Tenside	positiv	Cetyltrimethylammoniumchlorid
Amphotere Tenside	positiv + negativ	Dodecylbetain, Phospholipide
Nichtionische Tenside	ungeladen	Polyglykoether

Über den sogenannten HLB-Wert (engl. hydrophilic-lipophilic-balance), einer numerischen Richtgröße aus der von Griffin im Jahr 1949 eingeführten

Bewertungsskala [79], ist es möglich die Tenseideigenschaften der verschiedenen Moleküle zu quantifizieren und ihre Löslichkeit in einem bestimmten Lösungsmittel abzuschätzen [80]. Dabei wird bei nichtionischen Tensiden der lipophile Anteil der Molmasse auf die Gesamtmolmasse bezogen und anschließend auf einen Zahlenbereich normiert. Aus der eingeführten Bewertungsskala des HLB-Wertes von Griffin geht hervor, dass für Werte von 0-9 ein öllösliches Tensid vorliegt, welches anwendungstechnisch für W/O-Emulsionen verwendet wird und von 11-20 ein wasserlösliches Tensid mit der Eigenschaft O/W-Emulsionen zu stabilisieren (Kapitel 5.7 und 7.1-3 in [74]). Der HLB-Wert lässt sich wie folgt berechnen:

$$HLB = 20 * \left(1 - \frac{M_l}{M}\right), \quad (11)$$

wobei M_l für die Molmasse des lipophilen Anteils eines Moleküls steht und M für die des gesamten Moleküls. Für anionische und kationische Tenside lässt sich der HLB-Wert, durch die 1957 vorgeschlagene Methode von Davies, aus Zahlenwerten für die einzelnen chemischen Gruppen eines Moleküls berechnen, wodurch der Einfluss der verschiedenen miteinander wechselwirkenden Gruppen gewichtet wird [81]. Diese Methode ist jedoch weniger gebräuchlich. Die HLB-Werte sind allerdings nur als eine grobe Abschätzung gedacht, denn die spezifischen Eigenschaften der Detergentien entfalten sich erst durch das jeweilige Lösungs- bzw. Dispersionsmittel [82], worauf im folgenden Abschnitt eingegangen werden soll.

3.1.2.2 Mizellkolloide

Mizellkolloide, auch Assoziationskolloide genannt, sind thermodynamisch stabile und hydrophile Systeme, die durch Aggregation von einzelnen Tensidmolekülen in polaren oder apolaren Dispersionsmedien spontan und reversibel entstehen. Diese Aggregate kolloider Dimension bilden sich nach dem Prinzip der Selbstorganisation aufgrund des dynamischen und thermodynamischen Gleichgewichts zwischen den Einzelmolekülen und den Mizellen bei einer definierten Konzentration, der sogenannten CMC.

Neben der Emulgatorkonzentration, dem Elektrolytgehalt und der Temperatur gibt es eine Reihe von Faktoren, welche die Gestalt und Größe der Mizellen, sowie deren Dispersität und Assoziationszahl zusätzlich beeinflussen. Der chemische Aufbau und der Ladungszustand der grenzflächenaktiven Substanz sind weitere wichtige Einflüsse, die im Kapitel 3.1.2.1 näher

erläutert wurden. Des Weiteren besteht ein gewisser Zusammenhang zwischen der Geometrie des Tensidmoleküls und der Geometrie der gebildeten Mizelle. Während zylinderförmige Tensidmoleküle die Bildung flächiger Doppelschichten bevorzugen, bilden kegelförmige bzw. konische Tenside eher „normale“ bzw. „inverse“ kugelförmige Mizellen aus. Die prismen- und keilförmigen Tenside neigen zur Ausbildung von Zylindern, den sogenannten Stäbchenmizellen. Zusätzlich entscheidet die Polarität des Lösungsmittels über die Gestalt einer normalen oder inversen Mizelle, wie in Abbildung 16 vereinfacht dargestellt. Während sich die hydrophilen Kopfgruppen eines Tensids in wässriger Umgebung aufgrund der Amphiphilität zu der Wasserseite hin orientieren, was den normalen Mizellen entspricht, so bilden sich in einem organischen Lösungsmittel nur Mizellen mit umgekehrter, also inverser Orientierung (Kapitel 1.2 in [74]).

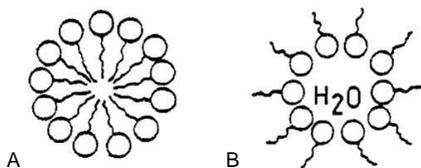


Abbildung 16: Darstellung einer A – normalen und B – inversen Mizelle in zweidimensionaler Darstellung (Ausschnitt aus Abbildung 2 in [83])

Da in dieser Arbeit der Emulgator vorrangig in einem Öl gelöst wurde, wie im Material- und Methodenteil unter 4.1.1 später beschrieben wird, soll an dieser Stelle zur Unterscheidung der gebildeten inversen Aggregate der Begriff der **kritischen Aggregationskonzentration** (CAC) eingeführt werden.

3.1.2.3 Phospholipide als Emulgatoren

Phospholipide sind Verbindungen, bei denen ein Glycerin-Molekül mit zwei Fettsäuremolekülen und einem Phosphorsäuremolekül verestert ist. Die Phosphorsäure ist des Weiteren mit einem organischen Molekül verestert, die zusammen den hydrophilen Teil des Phospholipids repräsentieren. Der organische Rest kann ein Serin, Ethanolamin, Cholin oder Inositol sein und definiert die Einteilung in die verschiedenen Klassen der Phospholipide: Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE, Kephaline) und Phosphatidylcholin (PC, Lecithine) bzw. Phosphatidylinositol (PI).

Exemplarisch ist zur Veranschaulichung das Phospholipid PE schematisch in Abbildung 17 dargestellt. Die beiden angehängten Fettsäureketten können sowohl gesättigt oder ungesättigt sein als auch beides und repräsentieren den hydrophoben Teil des Lipids. In der Abbildung 17 handelt es sich um Stearinsäure, eine gesättigte Fettsäure (oben) und um Ölsäure, eine ungesättigte Fettsäure (unten).

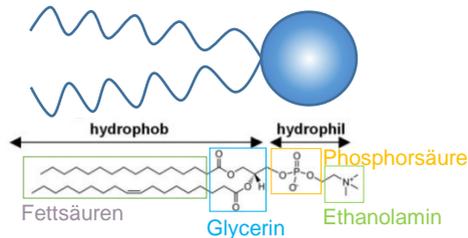


Abbildung 17: Schematische Darstellung und chemische Strukturformel des Phosphatidylethanolamins

Phospholipide sind als Membranlipide im menschlichen Organismus der wesentliche Hauptbestandteil von Biomembranen, die je nach Zelltyp oder Zellorganell eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung aufweisen und neben Phospholipiden auch aus anderen Molekülen wie Proteinen, Glykolipiden und Cholesterol aufgebaut sein können. Während beispielsweise die Membran von Mitochondrien aus etwa 45% PC, 29% PE, 10% PI, 10% Cholesterol, 2% PS und zu 4% anderen Lipiden besteht [84], weist das Myelin, eine Biomembran welche Nervenzellen umgibt, prozentual weit höhere Anteile an Cholesterol (von bis zu 25% des gesamten Lipidgehaltes) auf [85, 86]. Erstmals wurde die Struktur von Biomembranen anschaulich von Singer und Nicolson im Jahr 1972 beschrieben [87]. In diesem Fluid-Mosaik-Modell bildet ein spezifisches Gemisch aus verschiedenen Phospholipiden eine Doppelschicht, in die periphere Membranproteine hineinreichen können und integrale, lateral bewegliche Proteine diese Doppelschicht durchdringen können (Kapitel 6.9 und 17.6 in [74]). Die molekulare Dimension dieser Lipiddoppelschicht ist in Abbildung 18 dargestellt und weist insgesamt eine Größenordnung von etwa 4 nm Schichtdicke auf (Abb. 6-17 (b) aus [74]).

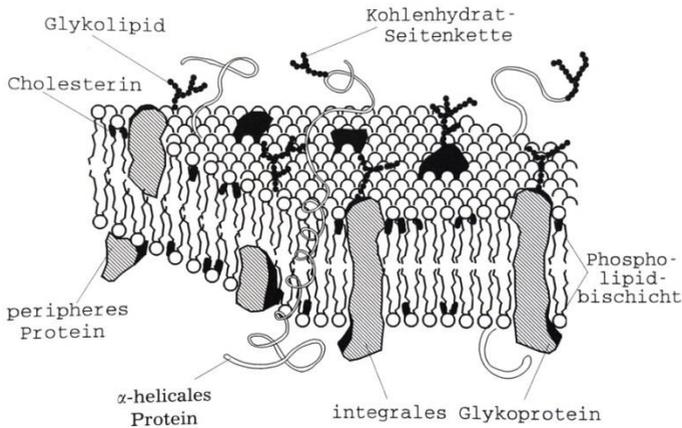


Abbildung 18: Darstellung der Phospholipid-Doppelschicht nach Singer und Nicolson [74]

Auch die chemische Zusammensetzung, wie das Protein/Lipid-Verhältnis einer Biomembran, kann je nach Membrantyp sehr stark variieren oder unterschiedliche Muster aufweisen. So beträgt beispielsweise das Gewichtsverhältnis Protein/Lipid in der Plasmamembran von Bakterien 2,0-3,5 und besteht zu 100% aus PC, wohingegen die Plasmamembran menschlicher Erythrozyten ein Protein/Lipid-Gewichtsverhältnis von 1,3 aufweist und sich u. a. aus 63 Mol% PC, 18 Mol% PE und 2 Mol% PS zusammensetzt (Tabelle 6-1 und 6-2 in [74]). Bei Myelin, um auf das Beispiel zurück zu kommen, ist das Protein/Lipid-Verhältnis sogar $< 0,5$ und weist mit bis zu 70-80% einen besonders hohen Lipidgehalt auf [85, 88]. Bei den Phospholipiden handelt es sich um amphiphile und grenzflächenaktive Substanzen, die an der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl vermitteln können und in wässriger Umgebung Doppellipidschichten, sogenannte Liposomen, ausbilden. Die Grenzflächenstabilisierung beruht, wie schon für Tenside allgemein erklärt, auf der Ausbildung von Adsorptionsschichten.

3.2 Ober- und Grenzflächenspannung von Flüssigkeiten

Da mit der Untersuchung geeigneter Substanzen für die Herstellung von stabilen Emulsionen vorrangig die Charakterisierung flüssiger Phasengrenzen Gegenstand dieser Arbeit ist, werden in dem Ergebnisteil ab 5.3 vornehmlich die Grenzflächenspannung γ zwischen den verschiedenen Öl- und Wasserphasen mit geeigneten Emulgatoren ermittelt und beschrieben. Daher soll deren Theorie im Folgenden kurz behandelt werden.

3.2.1 Theorie zur Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung σ ist eine Kraft an der Oberfläche einer Flüssigkeit, die aufgrund von intermolekularen Anziehungskräften auftritt.

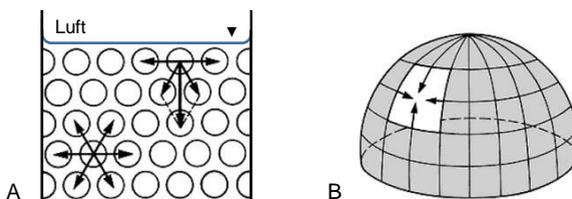


Abbildung 19: Modell zur Deutung der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten. A – Schematische Darstellung der Bindungskräfte zu benachbarten Molekülen und B – kugelförmige Gestalt einer Flüssigkeitsoberfläche (Abbildung 14.10 und 14.11, Kapitel 14.6 [89])

Abbildung 19 A zeigt die zwischen den Molekülen einer Flüssigkeit wirkenden Kohäsionskräfte, die sich im Inneren der Flüssigkeit in einem Kräftegleichgewicht befinden. An der Oberfläche befinden sich diese Kräfte in einem Ungleichgewicht, da die Moleküle zur Gasphase hin keine benachbarten Moleküle haben und somit stärker nach innen gerichtet sind. An jeder Begrenzungslinie einer Flüssigkeitsoberfläche greifen Kräfte tangential zur Oberfläche an, die senkrecht auf die Begrenzungslinie stehen (siehe Abbildung 19 B) und ins Innere der Oberfläche gerichtet sind [89]. Folglich imitiert das Wasser einen äußeren Film, wie eine Art elastische Haut [73], der die Flüssigkeit zusammendrückt und die Oberfläche somit miniert. Aus diesem Grund spricht man bei dieser thermodynamischen Erklärung auch vom Filmdruck Π einer Flüssigkeit.

Die Oberflächenspannung kann als Energie E pro Fläche A

$$\sigma = \left(\frac{dE}{dA} \right)_{p,T} = \left(\frac{dW_{rev}}{dA} \right)_{p,T} \quad (12)$$

verstanden werden und beschreibt die reversible Arbeit W_{rev} die geleistet werden muss, wenn sich die Oberfläche des Systems unter isothermen und isobaren Bedingungen verändert. Die entstehende Grenzfläche zwischen zwei Fluiden wird dabei in Richtung der Phase mit höherer Oberflächenspannung gekrümmt.

Wie unter 2.2.2 beschrieben, kann die Oberflächenspannung beispielsweise mittels einer Wilhelmy-Platte oder der Bügelmethode bestimmt werden. Dabei wird die Kraft F gemessen, welche pro Länge l am Flüssigkeitsfilm sowohl auf der Vorder- als auch auf der Rückseite des Bügels wirkt, siehe dazu Abbildung 20.

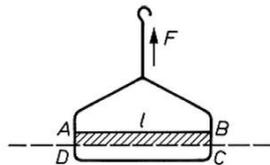


Abbildung 20: Oberflächenspannungsmessung mittels Bügelmethode. ABCD stellt die aus der Flüssigkeitsoberfläche am Messdraht hochgezogene Flüssigkeitslamelle dar (Abbildung 14.12 aus Kapitel 14.6 [89])

Damit stellt Gleichung (13) die mechanische Definition der Oberflächenspannung dar.

$$\sigma = \frac{F}{2l} \quad (13)$$

Die emulsionsbildende Wirkung von Tensiden beruht im Wesentlichen auf der Herabsetzung der Grenzflächenspannungen durch Bildung von Adsorptionsschichten.

3.2.2 Adsorptionsisothermen

Unter dem Vorgang der Adsorption ist die reversible Anreicherung bzw. Anlagerung von Atomen, Ionen oder Molekülen an Ober- bzw. Grenzflächen zu verstehen, die zu einer Veränderung in der Spannung zwischen den beiden Phasen führt. Wenn eine grenzflächenaktive Substanz an der Grenzfläche adsorbiert, werden die Wassermoleküle partiell oder vollständig ersetzt bzw. verdrängt. Daher wird dieser Vorgang auch als Verdrängungsadsorption bezeichnet.

Bei der Verwendung von Emulgatoren spiegeln die Änderungen der Ober- bzw. Grenzflächenspannung die Einstellung des Gleichgewichtszustandes zwischen Oberflächen- und Volumenphase wider. Die Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung ist ein diffusionskontrollierter Prozess, welcher in sogenannten Adsorptionskinetiken verfolgt werden kann und im Wesentlichen von der Konzentration c des Emulgators abhängig ist. Der Vorgang der Anlagerung wird quantitativ in Form von experimentell aufgenommenen Adsorptionsisothermen beschrieben, für die verschiedene Modelle als Grundlage dienen können. Auf drei Isothermen, welche zur Auswertung der tensiometrischen Daten im Ergebnisteil dieser Arbeit ab 5.3 herangezogen werden, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Die Gibbs'sche Adsorptionsisotherme beschreibt thermodynamisch den Vorgang der Adsorption an geladenen und nichtgeladenen Grenzflächen und kann aus der Auftragung der γ -Werte gegen die $\ln c$ -Werte entnommen werden. Aus dem Anstieg der Kurve lässt sich die Grenzflächenkonzentration Γ des Emulgators folgendermaßen berechnen

$$\Gamma = - \frac{d\gamma}{RT \ln c} . \quad (14)$$

Resultierend aus der Auswertung dieser Adsorptionsisothermen kann die Packungsdichte in der Emulgator-Adsorptionsschicht durch die Analyse der Flächenwerte pro Molekül gewonnen werden. Der mittlere molekulare Flächenbedarf A , welcher pro Molekül in der Adsorptionsschicht eingenommen wird, kann unter Einbeziehung der Avogadro-Konstante mit folgender Formel berechnet werden:

$$A = \frac{1}{NT} . \quad (15)$$

Der Eigenplatzbedarf der adsorbierten Teilchen in der monomolekularen Adsorptionsschicht wird in der 1918 veröffentlichten Gleichung von Langmuir

$$bc = \frac{\theta}{1-\theta} \quad (16)$$

berücksichtigt und beschreibt lineare Zusammenhänge zwischen der Volumen- und Grenzflächenkonzentration. Die Symbole b und θ beschreiben den Adsorptionskoeffizienten bzw. den Bedeckungsgrad. Eine Erweiterung der Langmuir-Gleichung stellt die Frumkin-Isotherme

$$bc = \frac{\theta}{1-\theta} \exp(-2a\theta) \quad (17)$$

dar, bei der die zwischenmolekularen Wechselwirkungskräften zwischen den Kohlenwasserstoffketten in der Adsorptionsschicht nicht mehr vernachlässigt, sondern durch die Einführung der Wechselwirkungskonstante α quantitativ erfasst werden.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Phospholipide und Membranbestandteile

Die zur Herstellung von Emulsionen und Liposomen verwendeten Phospholipide, wurden zuvor in geeigneten Konzentrationen als Stammlösungen in entgastem Ethanol gelöst und unter Argon-Atmosphäre im Kühlschrank bei 4°C (maximal einen Monat) gelagert. Gleiches galt auch für den Fluoreszenzfarbstoff LRh-PE. Die Stammlösungen wurden zur Bildung der trockenen Lipidfilme in entsprechenden Konzentrationen in einen Rundkolben pipettiert und das Lösungsmittels wie unter 2.1.3 beschrieben am Rotationsverdampfer entzogen. Anschließend wurde der trockene Lipidfilm in den entsprechenden organischen Phasen gelöst.

Ein Überblick über die verwendeten Phospholipide, sowie deren molare Masse ist in Tabelle A-2.1 im Anhang zusammengestellt. Bei den verwendeten Phospholipiden handelt es sich um hochreine synthetische Lipide, welche die Bestimmungen der pharmazeutischen Industrie erfüllen und unter GMP-Bedingungen (ISO 9001:2008 zertifizierte Anlagen) im industriellen Maßstab hergestellt wurden.

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Reagenzien ist zusammen mit deren Herstellern der Tabelle A-2.2 im Anhang zu entnehmen.

Diese wurden u.a. zur Herstellung der Emulsionen und Liposomen verwendet, sowie zur Charakterisierung der Phospholipid-Monoschichten an den flüssigen Phasengrenzen Öl und Wasser benötigt. Die einzelne Verwendung ist jeweils im Methodenteil näher erläutert. Des Weiteren wurden verschiedene Puffer und Lösungen hergestellt, welche unter anderem für den Phosphat-Nachweis via Bartlett-Assay verwendet worden.

Als organische Phasen für die Grenzflächenuntersuchungen mit Wasser (H_2O) wurden Squalen ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$) und dessen hydrierte Form Squalan ($\text{C}_{30}\text{H}_{62}$) sowie zur Validierung der Messmethode, Chloroform (CHCl_3) verwendet.

4.1.3 Puffer und Lösungen

4.1.3.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 12 g Na_2HPO_4 wurden insgesamt in einem Liter destilliertem H_2O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert ($0,2\ \mu\text{m}$) und bei 4°C für 1-2 Monate gelagert.

Für die Herstellung der Liposomen im Batch-Prozess wurde PBS als Arbeitslösung 1:10 verdünnt aus der Stocklösung eingesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

4.1.3.2 Phosphat-Ascorbinsäure-Puffer (PAA)

20,6 g Na_2HPO_4 und 3,4 mg Ascorbinsäure wurden insgesamt in einem Liter destilliertem H_2O gelöst und der pH-Wert unter Zugabe von 4 M HCl auf 7,4 eingestellt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurde dieser Puffer durch einen $0,2\ \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert.

4.1.4 Glas- und Plastikwaren

Für die Arbeiten in der Zellkultur wurde aus Gründen der Sterilität und zur Reduzierung von Kontaminationen überwiegend mit Einmalware gearbeitet. Ansonsten wurde hauptsächlich mit Glasware gearbeitet, die mit Extran[®] gespült und anschließend im Trockenschrank bei 80°C getrocknet wurde. Eine Auflistung aller verwendeten Ge- und Verbrauchsmaterialien ist in Tabelle A-2.3 im Anhang zusammengestellt.

4.1.5 Geräte und Software

Die verwendeten Geräte und Softwareprogramme sind nachfolgend tabellarisch zusammen mit deren Herstellern aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Autoklav AMB420N	Astell Scientific	Kent, UK
Brutschrank/ Inkubator	Binder	Tuttlingen, DE
Chemdraw	CambridgeSoft Corporation	Cambridge, USA
Extruder Liposofast basic	Avestin Europe	Mannheim, DE
Fluoreszenz-Spektrophotometer Cary Eclipse	Varian	Darmstadt, DE
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA
HPLC Pumpe K-501	Knauer	Berlin, DE
Laborschüttler – Inkubator ES-20	Grant Instruments	Shepreth, UK
Mikroskop Olympus CK2; BH-2	Olympus	Shinjuku, JP
Microplate Reader biochrom EZ Read 400	ISOGEN Life Science	de Meern, NL
Microzentrifuge MC-13 amicon	Heraeus Holding Instruments	Hanau, DE
pH-Meter Checker® HI98103	HANNA® instruments	Sursee, CH
Pipettensatz 1000, 200, 10µl	GILSON®	Villiers le Bel, FR
Pipettierhilfe pipetman	GILSON®	Mettmenstetten, CH
PSS HEMA Bio (Vor)Säule	Polymer Standards Service	Mainz, DE
Pumpe VACUSAFE comfort	IBS Integra Biosciences	Zizers, CH
Rotationsverdampfer ROTAVAC	Heidolph Instruments	Schwabach, DE
Semi-Micro Osmometer 4602	Knauer GmbH	Berlin, DE
Sterilbank CleanAir EF	Telstar® Life Science solutions	Terrassa, ES
Sonorex RK 514 Transistor	Bandelin electronic	Berlin, DE
Tensiometer PAT-1D & IsoFit- Iso- therm Fitting software	SINTERFACE Technologie	Berlin, DE
Thermometer VOLTcraft® K204	Conrad Electronic	Wollerau, CH
Ultraschallsonotrode S1 – UP200S	Hielscher Ultrasonics	Teltow, DE
UV-Vis Spektrophotometer Nano- drop ND-1000	ISOGEN Life Science	de Meern, NL
UV-Vis Spektrophotometer V-630	Jasco	Groß-Umstadt, DE
Zählkammer Bürker-Türk	LO-Laboroptik	Friedrichsdorf, DE
Zentrifugen 3K10 & 1-14K, kühlbar	Sigma Laborzentrifugen	Osterode, DE
Zetasizer nano ZS90 & DTS (nano) software	Malvern Instruments	Worcestershire, UK

4.1.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Alle verwendeten Medien und Lösungen für die Zellkultur wiesen vom Hersteller das Qualitätsmerkmal auf, vor dem Abfüllen und dem Versenden sterilfiltriert und einem Endotoxin-Test unterzogen worden zu sein. Bis auf PBS und Nuklease-freies Wasser, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, wurden alle anderen Medien, Lösungen, Puffer und Chemikalien bei 4-8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die sterilen Arbeitsweise in der Zellkultur essentiell, wurde zum Reinigen von Arbeitsflächen und Labormaterial Ethanol mit einer Reinheit von 96% als 70%-ige Arbeitslösung verwendet und dafür mit einfach destilliertem H₂O verdünnt. Ein Überblick über alle Medien und Lösungen ist zusammen mit deren Herstellern in der Tabelle A-2.4 im Anhang zu finden.

4.1.7 Verwendete Zellen

Die Untersuchungen *in vitro* dienen zur Vorbereitung von Tierversuchen (*in vivo*) zu einem späteren Zeitpunkt des EU-Projektes. Aus diesem Grund wurde ausschließlich mit murinen Zellen gearbeitet, welche im Folgenden beschrieben werden. Bei allen verwendeten Zellen handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen, die also an einer Oberfläche anhaften und sich auf dieser vermehren. Ein Überblick über alle verwendeten Zellen zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Zelllinien (ZL)

Zellen	Herkunft	Zelltyp	Medium
B16-F10	ATCC CRL-6475, Strain C57BL/6J	Murine Melanom-ZL	DMEM, 10% FCS
CT26	CLS 400156, Strain BALB/c	Murine Kolokarzinom-ZL	RPMI, 10% FCS, 10 mM HEPES, 1 mM SP
RAW264.7	ATCC TIB-71, Strain BALB/c	Murine Makrophagen	DMEM, 10% FCS

Bei den B16-F10 Zellen handelt es sich um eine Melanomzelllinie aus C57BL/6J Mäusen, die spindelförmige oder Epithelien-ähnliche morphologische Eigenschaften aufweist und Melanin produzieren kann. Die Zelllinie wurde in 12 ml DMEM mit zusätzlich 10% hitze-inaktivierten FBS kultiviert. Sie stammen aus einem Zellstamm von J. van den Dikkenberg der Universität Utrecht und wurden ursprünglich vom amerikanischen Bio-Ressourcen-Zentrum ATCC (Manassas, USA) unter der Nummer CRL-6475 bezogen. Eine lichtmikroskopische Aufnahme der adhärenz wachsenden Zellen ist in Abbildung 21 zu sehen.

Die Zellen des Typs C26 stellen eine kolorektale Karzinomepithelzelllinie aus BALB/c Mäusen dar, welche in RPMI-1640 Medium mit zusätzlich hinzugefügtem hitze-inaktiviertem 10 % FBS, 10 mM HEPES und 1 mM Natrium-Pyruvate kultiviert wurden. Diese Zellen stammen aus einem Zellstamm der Universität Utrecht (O. Kranenberg, Med. Oncology, UMC Utrecht) und wurden ursprünglich von der Firma Cell Lines Service (CLS in Eppelheim, Deutschland) mit der Nummer 400156 (Colon 26) bestellt.

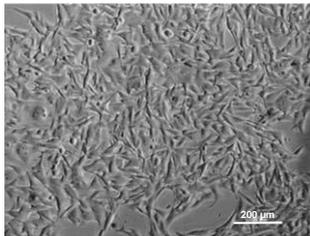


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahme der B16-F10 Zellen 100-fach vergrößert (Abbildung 3 A aus [90])

Bei den RAW264.7 handelt es sich um Makrophagen aus BALB/c Mäusen, welche adhären in Kolonien wachsen. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10% FBS. Diese Zellen stammen aus einem Zellstamm von J. Wenning und wurden ursprünglich von ATCC unter der Nummer TIB-71 bezogen.

4.2 Phosphatbestimmung mittels Bartlett-Methode

Für die Bestimmung der Phospholipidmenge in den Proben wurde, durch indirekten Nachweis der Phosphatkonzentration in wässriger Lösung, nach dem Bartlett-Assay gearbeitet. Die Phosphatquantifizierung basiert auf dem kolorimetrischen Nachweis von anorganischem Phosphat [91]. Dazu wurde die Probe in ein phosphatfrei-gespültes Reagenzglas überführt und im Trockenschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei 160°C getrocknet. Anschließend wurden 0,5 ml Schwefelsäure (5 mol/l) hinzugegeben und das Reagenzglas für mindestens 4 h bei 160°C erneut in den Trockenschrank gestellt. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 50 µl Perchlorsäure (30%), die für 2 h bei 160°C im Trockenschrank erhitzt wurde. Durch Zugabe von 4,6 ml Ammoniummolybdat (2,2 g/l) und 0,2 ml des Reduktionsmittels (0,8 g auf 5 ml) zu den abgekühlten Reagenzgläsern, wurde das anorganische Phosphat in Phosphormolybdänsäure überführt. Diese Verbindung wurde, durch 15 minütiges Erhitzen in einem Wasserbad bei 95°C, in einen blau-gefärbten Komplex reduziert, welcher anschließend, unter Verwendung des UV-Vis Spektrophotometer V-630, bei 830 nm kolorimetrisch vermessen werden konnte. Als Phosphat-Standardlösung wurden 219 mg KH_2PO_4 in 500 ml Schwefelsäure gelöst und 1 ml in 10 ml Was-

ser (10 µg Phosphat/ml) verwendet. Die Standards wurden als Dreifachbestimmungen und Wasserproben in Doppelbestimmung getestet. Eine Darstellung der blau-gefärbten Kalibrieransätze sowie die erstellte Kalibrierreihe sind in Abb.A-3.1 im Anhang zu finden.

4.3 Emulgierung mittels Ultraschall

Die Herstellung von Emulsionen ist mit Energieaufwand verbunden, da neue Grenzflächen, durch das Verteilen der dispersen Phase im umgebenden Medium, geschaffen werden muss. Folglich wurden die verschiedenen Emulsionen, in Ansätzen von 0,5-2 ml, jeweils durch die Beschallung mit Hilfe der Ultraschallsonotrode S1 vom Typ UP 200S (Hielscher) erzeugt. Dabei handelt es sich um einen piezoelektrischen Schallgeber, der elektrische Energie in longitudinale (Druck-) Wellen umsetzt [49]. Durch die Energie, welche in Form von mechanischen Schwingungen von der Ultraschallsonotrode auf die Flüssigkeiten übertragen wird, erfahren die Elemente des beschallten Mediums eine periodische Auslenkung aus ihrer Ruhelage, wodurch zeitliche und örtliche Druckschwankungen auftreten. Wird dabei ein systemabhängiger, kritischer Druck (Kohäsionsdruck) lokal unterschritten, kommt es zum ersten Schritt der Kavitation, dem Entstehen von dampf- oder gasgefüllten Blasen in Flüssigkeiten [49]. In der Überdruckphase des Schallfeldes kommt es zur Flüssigkeitskondensation, was die Blase instabil macht und zum spontanen Kollabieren führen kann. Dieser Vorgang wurde von Behrend [92] sehr anschaulich dargestellt. Kollabieren die Blasen in der Nähe von Emulsionstropfen kann es durch die beschriebenen Effekte der Schwingungskavitation zum Tropfenaufbruch und somit zur Tropfenzerkleinerung von Emulsionen kommen. Des Weiteren entsteht während des Beschallens beträchtliche Wärme, weshalb es notwendig ist, die zu beschallende Probe von außen zu kühlen, um das Erhitzen zu verringern. Dazu wurde die Probe in ein Kühlaggregat gestellt und die Temperatur mittels eines Temperaturlfühlers (VOLTCRAFT® K204, Conrad Electronic) überwacht.

Für die W/O-Emulsion wurde als disperse Phase der wässrige zu verkapselnde Wirkstoff bzw. ein Wirkstoffmarker, meist fluoreszierender Farbstoff (5 µM HPTS in PBS gelöst), verwendet. Als kontinuierliche Phase wurde Squalen eingesetzt, in dem eine definierte Konzentration (0,001-10 mg) an Phospholipiden zuvor gelöst wurde. Zum Detektieren der Phospholipide beim Phasentransfer von der Öl- in die Wasserphase (vor und nach der

Zentrifugation) wurden zusätzlich 0,1-1 Mol% des fluoreszenz-markierten Phospholipids LRh-PE zu dem reinen Phospholipid hinzugegeben und von einer Gleichverteilung der beiden Phospholipide ausgegangen. Das Lösen der Phospholipide in der Ölphase erfolgte entweder über die in 2.1.3 beschriebenen Lipidfilm-Methode oder direkt in das Öl [93]. Anschließend wurde der Rundkolben mit dem trockenen Film oder den eingewogenen Phospholipiden sowie dem Öl für mehrere Stunden in einem Ultraschallwasserbad (Sonorex RK 514 Transistor) homogenisiert und die Ölphase danach zur Emulgierung verwendet.

Die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Emulsionen, sowie deren erreichte Tropfengröße und Polydispersität sind im Abschnitt 5.1 diskutiert und zusammengestellt. Die Beschallungsparameter, wie Amplitude, Intervall und Zeit, mussten zuvor für das Stoffsystem und zu emulgierende Volumen etabliert werden, was ebenfalls unter 5.1 näher beschrieben und zusammenfassend dargestellt ist. Zum Vergleich des Emulgierverhaltens von Phospholipiden als natürliche Emulgatoren, wurde des Weiteren die Erzeugung einer O/W-Emulsion nach theoretischer Grenzflächenbetrachtung optimiert, siehe Abschnitt 5.3.1.3. Für die Emulsion wurde dazu das mit Phospholipid angereicherte Squalen als disperse Phase eingesetzt und in Wasser bzw. PBS emulgiert.

4.4 Herstellung von Liposomen im Zentrifugalfeld

Ausgangspunkt für die Herstellung der Liposomen war die unter 2.1.4 beschriebene Methode von Pautot *et al.* [1, 2], bei der die dispergierten und mit einer Phospholipidmonoschicht stabilisierten Wassertropfen durch Zentrifugalkräfte in eine untergeschichtete wässrige Phase transportiert werden und dabei auf dem Weg durch eine, mit Phospholipiden angereicherte, zweite Ölphase von einer weiteren Phospholipidschicht ummantelt wurden. Dieses Verfahren ist in Abbildung 5 (auf Seite 11) bereits schematisch dargestellt worden. Die W/O-Emulsion wurde dafür in einem Reaktionsgefäß über eine ölige mit Phospholipid angereicherte Zwischenphase, und eine darunter befindliche Wasserphase, geschichtet und anschließend bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Zentrifugationszeit wurde zuvor, unter Annahme einer theoretischen Sedimentationslänge von ~1,6 cm (max. Weglänge im 1,5 ml Reaktionsgefäß) und Berücksichtigung der Viskosität von Squalen, mittels Gl.(9) berechnet, abhängig von den erzeugten Tropfen-

größen der generierten Emulsionen. Eine Übersicht über die ermittelten Zeiten ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Berechnung der Zentrifugationszeit nach Gl. (9) für verschiedene Tröpfchengröße einer W/O-Emulsion bei 20°C ($\eta_{\text{Squalen}}=15 \text{ mPa s}$) und 13.000 rpm*

d [nm]	Sinkgeschwindigkeit u_s [$\mu\text{m/s}^2$]	t [min]
100	0,6	433,1
200	2,5	108,3
300	5,5	48,1
400	9,9	27,1
500	15,4	17,3
525	16,9	15,7
600	22,2	12,0
650	26,0	10,3
700	30,2	8,8
750	34,6	7,7
800	39,4	6,8

verwendete Zeit unter 5.2.1 zur Bestimmung des Verteilungsgleichgewichts des Emulgators

Der während der Zentrifugation ablaufende Prozess einer Flüssig-Flüssig-Trennung, separiert die feinverteilten Tröpfchen der W/O-Emulsion, aufgrund des Dichteunterschiedes zwischen den beiden flüssigen Phasen und der wirkenden zentrifugalen Kraft, jeweils wieder in die ursprünglichen Phasen Wasser und Öl. Zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz von generierten Liposomen werden weitere Methoden benötigt, die in den Abschnitten 4.6.3 und 4.6.4 ausführlich besprochen werden. Im Anhang veranschaulicht das Fließbild der Abbildung A-2.1 alle in diesen Arbeitsschritt einfließenden Methoden.

* entspricht in der Zentrifuge MC-13 von amicon (Radius 6,5 cm) einer Zentrifugalbeschleunigung von 120.464 m/s^2 ($\sim 12.280 \times g$)

4.5 Tropfen-Profilanalyse-Tensiometrie (PAT)

Als Methode für die dynamische Messung von Adsorptionsvorgängen und zur Charakterisierung sowie Optimierung generierter Emulgatordichten an Emulsionströpfchen wurde das PAT von Sinterface verwendet. Das Gerät dient zur softwaregesteuerten Bestimmung der Oberflächenspannung σ bzw. Grenzflächenspannung γ und des Filmdrucks Π einer Monoschicht, die sich an einer Flüssig-Gas- oder Flüssig-Flüssig-Grenzfläche befindet. Ferner lässt sich mit diesem Gerät die Grenzflächenrheologie durch oszillatorische Messungen erfassen und die Dehnungselastizität ε sowie Dehnungsviskosität η einer Monoschicht ermitteln.

Der prinzipielle Aufbau des PAT ist schematisch in Abbildung 22 gezeigt. Mit einer Mikrodosiereinheit wird, je nach dem vorhandenen Dichteunterschied der verwendeten Flüssigkeit oder des Gases, ein hängender oder stehender Tropfen bzw. eine Blase mit definiertem Volumen in einer Gas- oder Flüssigphase erzeugt. Anhand der Tropfenkontur, welche mittels CCD-Kamera auf der Vorderseite des Tropfens und Lichtquelle auf dessen Rückseite abgebildet wird (siehe Abbildung 23), kann unter Berücksichtigung der Young-Laplace-Gleichung

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = \Delta p_0 - \Delta \rho g z \quad , \quad (18)$$

mit dem Radius r , der Druck- Δp und Dichtedifferenz $\Delta \rho = \rho_W - \rho_0$ der Flüssigkeiten, die Ober- bzw. Grenzflächenspannung ermittelt werden.

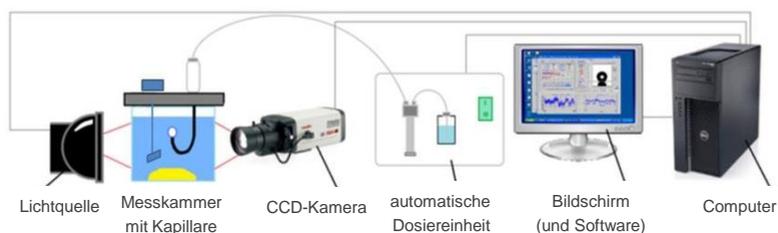


Abbildung 22: Illustration des PAT-Messaufbaus [94]

Um präzise Messungen zu gewährleisten, wurde das Gerät vor den eigentlichen Untersuchungen sorgfältig kalibriert. Die Kalibrierung erfolgt mittels

Edelstahlkugel (Martin & Co, USA), welche einen exakt definierten Durchmesser von 3 mm aufweist und deren Abmessung den Pixeln des Bildes zugeordnet wird. Des Weiteren musste die Fokussierung sowie die optimale Beleuchtung mittels Regelung des Kamera-Objektives bzw. der Lichtquelle für die Abbildung der Tropfenkontur eingestellt werden. Dies setzte auch die Einstellung der erforderlichen Schwarz/Weiß-Werte in der Kalibration des Gerätes voraus. Die maximale Abweichung der Kontur des Sphärenbildes darf bei erfolgreicher Kalibration keinesfalls größer als 5 μm sein.

Damit bei späteren Messungen mit verschiedenen Tropfengrößen eine Volumenabhängigkeit bei den sich ergebenden unterschiedlichen Ergebnissen ausgeschlossen werden kann, muss fernerhin ein optimales Verhältnis c_x/c_z des horizontalen und vertikalen Kalibrationsfaktors bestimmt werden. Dazu wurden mit einer Messflüssigkeit bekannter Dichte, meist hochreines HPLC-Wasser, Messungen durchgeführt, bei der sich das Volumen des Tropfens durch programmierte Sprungfunktionen ständig änderte. Je nachdem ob der zeitliche Verlauf der Oberflächenspannung nach Auswertung dieser Messungen stark anstieg oder abfiel, wurde einer der beiden Faktoren entsprechend geändert, bis eine konstante Oberflächenspannung über die Zeit unabhängig von verschiedenen Tropfenvolumina beobachtet werden konnte. Zusätzlich musste das Gerät auf die jeweiligen Messflüssigkeiten kalibriert werden, sodass die Literaturwerte für die entsprechenden Flüssigkeiten erreicht wurden. Dabei wurde der entsprechende Sollwert σ_0 mit dem Ist-Wert σ in Relation zueinander gesetzt und der neue Kalibrationsfaktor c_{x0} sowie c_{z0} gemäß folgender Formel

$$\frac{c_{x0}}{c_x} = \frac{c_{z0}}{c_z} = \sqrt{\frac{\sigma_0}{\sigma}} \quad (19)$$

berechnet [95]. Alle Messungen erfolgten bei konstanter Temperatur von 20°C, was mit Hilfe einer über ein Thermostat regulierten Messkammer bewerkstelligt wurde. Zusätzlich wurde die gesamte Versuchsanordnung in einem klimatisierten Raum aufgebaut, um sicher zu stellen, dass auch die in der automatischen Dosiereinheit vorgelegten Flüssigkeiten gleiche Temperaturen aufweisen. Ein Überblick über die verschiedenen verwendeten Flüssigkeiten, deren Dichte und Oberflächenspannung bei 20°C sind in Tabelle A-1.3 zusammengestellt. Die verwendeten Lösungen wurden, wie auch in der Literatur zu finden [54], zuvor gegeneinander abgesättigt, d.h. wie beispielsweise bei Wasser und Chloroform in gleichen Volumenanteilen für mind. 72 h äquilibriert.

Zur Reinigung des Systems mussten alle verwendeten Glasküvetten und die Teflonschläuche der Dosiereinheit regelmäßig und gründlich mit einer 70%-igen Ethanollösung gereinigt werden.

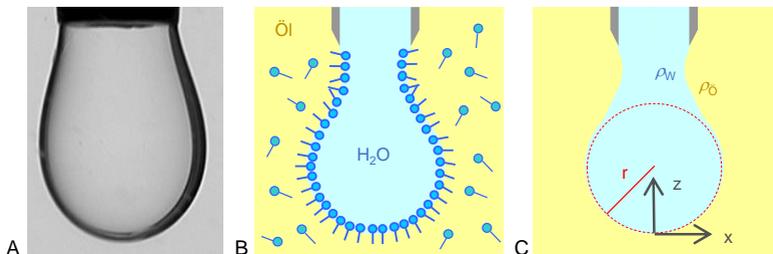


Abbildung 23: Tropfenprofil bei der PAT. A – Typisches Bild des Tropfenprofils aufgenommen mit der CCD-Kamera; B – Schematische Darstellung adsorbierter Phospholipide an der Wasser/Öl Grenzfläche [96] und C – Tropfen mit erläuterten Indizes für Gleichung (18)

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte, indem zunächst die generierten Rohdaten im Programm PAT-1D von Sinterface gefittet und die Messparameter in Excel exportiert wurden.

Anschließend erfolgte die Darstellung der über die Zeit ermittelten Messwerte 1.) für \sqrt{t} und 2.) über $1/\sqrt{t}$ [97]. Mit Hilfe der Gleichung nach Hansen-Joos für die Langzeit-Approximation bei Diffusions-kontrollierter Adsorption [98]:

$$\left[\frac{dy}{d(1/\sqrt{t})} \right]_{t \rightarrow \infty} = \frac{RT\Gamma^2}{c_0} \sqrt{\frac{\pi}{4D}} \quad (20)$$

kann, aus letzterer Auftragung der Messwerte, die Grenzflächenspannung im Äquilibrium γ_e extrapoliert werden. Aus den ermittelten Werten für γ_e erfolgt die Darstellung der Gibbsschen Adsorptionsisothermen entsprechend Gl.(14) und die Berechnung der Fläche pro Lipid-Molekül nach Gl.(15). Für die Bestimmung der Adsorptionsisothermen nach Frumkin und Langmuir wurden die γ_e -Werte mit Hilfe des IsoFit Programms geplottet und der Parameter ω_0 für die Berechnung der Grenzflächenkonzentration Γ_∞ extra-

hiert. Eine Darstellung der Parameterbestimmung mittels IsoFit ist im Anhang in Abbildung A-3.2 zu finden, sowie die ermittelten Werte exemplarisch in Tabelle A-3.1.

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten kann die lineare Abhängigkeit von γ und \sqrt{t} , in der durch Diffusion kontrollierten Adsorption, verwendet werden [99], welche in nachfolgender Gleichung dargestellt ist.

$$\left[\frac{d\gamma}{d\sqrt{t}} \right] = -2RTc_0 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \quad (21)$$

Anhand dieser Gleichung ist es möglich den Diffusionskoeffizienten D ohne Kenntnis der Adsorptionsisothermen, allein durch c_0 zu berechnen und damit die Grenzflächenkonzentration Γ nachfolgend entsprechend Gl.(20) zu ermitteln [97].

4.6 Analytische Messmethoden

4.6.1 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die erzeugten W/O- und O/W-Emulsionen sowie die mittels Batch-Verfahren generierten Liposomen wurden zur Charakterisierung auf Partikelgröße und Polydispersität hin untersucht. Mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist es möglich, Informationen über diese kolloiden Systeme und Aussagen über Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und deren mittlere Molmasse zu gewinnen. Die PCS ist ein hochauflösendes Laserstreulichtverfahren bei der die Geschwindigkeit gemessen wird, mit der kolloidale Teilchen in einem Dispersionsmedium diffundieren. Diese zufällige Bewegung der Teilchen wird durch die Brownsche Molekularbewegung der Moleküle im partikelumgebenden Medium hervorgerufen. Mittels eines im Winkel von 90° angeordneten Photomultipliers wird das gestreute Licht bzw. die Änderungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität über eine bestimmte Zeit gemessen [100]. Daher wird diese Methode auch dynamische Lichtstreuung (DLS) genannt. Die zeitliche Verteilung der detektierten Streulichtintensität wird mit Hilfe der Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = 1 + \exp(-2Dq^2\tau) \quad (22)$$

zur Berechnung der translatorischen Diffusionskonstanten D herangezogen und erlaubt anschließend, unter Einbeziehung der Stokes-Einstein-Gleichung

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (23)$$

, auf die Partikelgrößenverteilung zu schließen. Je langsamer die Diffusion von Partikeln im Medium erfolgt, desto länger bleibt die Streurate konstant und deutet folglich auf große Partikel hin. Kleine Partikel werden durch die Brownsche Molekularbewegung schneller in Bewegung gesetzt und diffundieren somit schneller, was sich wiederum in einer Veränderung der Lichtintensität innerhalb kürzester Zeit widerspiegelt. Die PCS-Messung erfordert konstante Temperaturbedingungen, da die Viskosität der Flüssigkeiten eine temperaturabhängige Größe darstellt. Diese Messanforderung wurde mit einer internen Temperierung des Gerätes auf exakt 20°C realisiert. Die Probe mit den Partikeln oder feinverteilten Tröpfchen wird in eine Küvette gefüllt, in die temperierte Messkammer platziert und für 5 min äquilibriert. Anschließend wird die Probe mit einem monochromatischen, kohärenten Licht eines Lasers bestrahlt und das Streulicht in einem bestimmten Winkel (meist 90°) über den Photodetektor aufgefangen. Die Streurate wird von einem angeschlossenen Rechner über die genannten Gleichungen (22) und (23) ausgewertet und u.a. die mittlere Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (PDI) von dem Programm DTS ausgegeben [100]. Die Polydispersität eines kolloiden Systems beschreibt die Erscheinung, dass die Teilchendurchmesser der feinverteilten Tröpfchen nicht einheitlich sind, sondern mehr oder weniger stark schwanken. Die Polydispersität liegt zwischen 0 und 1, wobei Werte nahe 0 ein sehr homogenes System charakterisieren und Werte nahe 1 eine breit verteilte Tröpfchengröße widerspiegeln.

Die zu untersuchenden Proben wurden 1:5 bzw. je nach Attenuator auch 1:10 in ihrem jeweiligen kontinuierlichen Medium verdünnt eingesetzt. Der Attenuator, welcher ein Maß für die Signalabschwächung darstellt, zeigt dekadisch auf, wie stark das Licht durch die Probe gedämpft wird. Der Wert 11 steht dafür, dass der Laser mit voller Leistung durch die Probe strahlt und die Konzentration der Probe sehr gering ist, währenddessen bei dem Wert 10 nur noch 10% der Lichtintensität nötig ist, da die Probe sehr viel Streulicht liefert. Die verwendeten Einstellungen können der Tabelle A-1.1 im Anhang entnommen werden.

4.6.2 UV-Vis Spektroskopie

Die Proteinanalytik der Mistellektinlösung erfolgte, wie in Abbildung 24 dargestellt, am Nanodrop ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer von Isogen. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven mit einer zu testenden Lösung, musste zuvor die exakte Proteinkonzentration bestimmt werden, damit die erforderlichen Verdünnungen für die Inkubation auf den Zellen vorbereitet werden konnten. Dazu wurden 2 μl Probe auf den Probenhalter pipettiert (Abbildung 24) und nach Initialisierung des Gerätes, sowie Kalibrierung gegen den Probenpuffer, die Messung bei 280 nm gestartet.

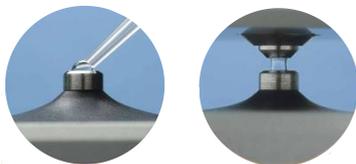


Abbildung 24: Darstellung der UV-Vis Messung mittels Nanodrop ND-1000 [101]

Als Standard wurde eine Kalibrationsreihe mit Albumin mitgeführt, siehe Abbildung A-3.3 im Anhang, gegen welche die eigentliche Bestimmung der unbekanntenen Proteinkonzentration für eine erste Näherung durchgeführt wurde. Die lineare Abhängigkeit der Extinktion E_λ von der Konzentration c und der zu durchstrahlenden Schichtdicke d , wird mittels der quantitativen Beziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes beschrieben:

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda c d = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) , \quad (24)$$

wobei ε_λ den molaren Extinktionskoeffizient, I_0 die Intensität des ungeschwächten Lichts und I_1 die Intensität des durch die Lösung geschwächten Lichtstrahls ausdrückt. Für Albumin ist ein ε von $43,82 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ beschrieben. Aus Literaturwerten ist für Mistellektine ein $\varepsilon^{1\%}=1,41 \text{ \%}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bekannt [102], welches als Absorptionsmaß einer 1%-igen Proteinlösung steht [103] und für die Berechnung der finalen Konzentration herangezogen wurde.

4.6.3 Größenausschlusschromatografie

Zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz der im Batch-Verfahren generierten Proben wurde die Methode der Gel-Permeations-Chromatographie verwendet, welche in Abbildung 25 schematisch dargestellt ist. Dabei wurde der liposomal verkapselte Wirkstoff von dem in der Umgebung der Liposomen befindliche Wirkstoff getrennt, indem die zu untersuchende Probe auf eine HEMA Bio 1000 Säule mit porösem Trägermaterial (Abbildung 25 A) aufgegeben wurde. Das Trägermaterial dieser Säule besteht aus 2-Hydroxyethyl-Methacrylate, welches speziell für hydrophile Sorbentien modifiziert wurde. Die großen Moleküle der Probe, genauer gesagt die Liposomen mit einer Größe von etwa 200-500 nm, laufen mittels eines Fließmittels (PBS-Puffer als mobile Phase) durch die Säule (stationäre Phase) hindurch. Kleinere Moleküle, wie der in Wasser gelöste Wirkstoff, können während ihres Weges durch die Säule auch in die Poren der Matrix hineindiffundieren, was unter B der Abbildung 25 demonstriert wurde.

Die Diffusion der Moleküle in die Poren hat konsequenterweise auch einen längeren Weg durch die gesamte Säule zur Folge, was sich in einer längeren Verweilzeit, auch Retentionszeit genannt, äußert. Der Verlauf einer Probentrennung ist anhand von drei unterschiedlich großen Molekülen, hier rot (hohes Molekulargewicht (MW)), orange (mittleres MW) und gelb (niedriges MW), unter C der Abbildung 25 graphisch abgebildet und verdeutlicht die Trennstrecke durch die Säule bis zur Elution und anschließenden Detektion der Probenfraktionen am Detektor. Dabei wandern die großen Moleküle am schnellsten durch die Säule und werden als erste Fraktion detektiert, was in dem roten Peak des Chromatogramms veranschaulicht wird (Abbildung 25 D). Im Anschluss daran verlassen die kleineren Moleküle nacheinander die Säule und werden von dem Detektor jeweils verzögert erfasst und im Chromatogramm (oranger und gelber Peak in Abbildung 25 D) abgebildet. Dieses Trennprinzip wird auch Größenausschlusschromatographie (SEC) genannt. Dabei ist der gaußförmige Verlauf und der Abstand der Kurven zueinander, wie im Diagramm gezeigt, ein Maß für die Trenngüte des Elutionsvorganges, für den nachfolgend die einzelne Fraktionen aufgefangen werden können. Die Elution der Probenfraktionen erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mittels einer HPLC-Pumpe (K-501 von Knauer). Als Detektor fungierte ein nachgeschaltetes Fluoreszenzspektrometer, was im nachfolgenden Unterkapitel näher erläutert wird.

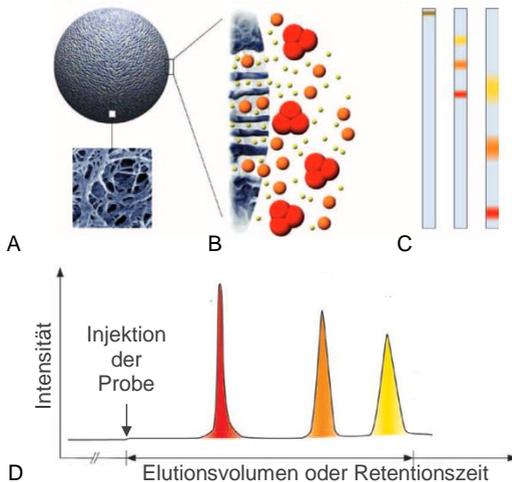


Abbildung 25: Prinzip der SEC. A – Elektronenmikroskopische Vergrößerung der Matrix. B – Schematische Darstellung der Diffusion von Molekülen in die Poren der Matrix. C – Graphische Darstellung der Probentrennung. D – Chromatogramm nach Elution der separierten Probe [104]

Als alternatives SEC-Verfahren wurden Mini-Sepharose-Säulen [105], wie bereits von Fry *et al.* 1978 erstmals beschrieben [106], verwendet, durch welche die liposomale Fraktion von dem freien Wirkstoff ebenfalls getrennt und die Einkapselungseffizienz bestimmt werden konnte (siehe Überblick Abbildung A-2.1). Dazu wurden nachfolgend alle Fraktionen 1:10 mit Ethanol verdünnt, die Liposomen somit aufgebrochen und der verkapselte Inhalt freigelassen. Alle Fraktionen wurden dann erneut fluorometrisch vermessen und die Liposomenfraktion über alle ermittelten Signale gewichtet.

4.6.4 Fluoreszenzspektroskopie

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der generierten liposomalen Formulierungen wurde die SEC mit der Fluoreszenzspektroskopie gekoppelt. Dafür wurde das fluoreszenzmarkierte Phospholipid (LRh-PE) und der fluoreszierende Farbstoff 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure-trinatriumsalz (HPTS) als Wirkstoff verwendet, die nach der Elution aus der HEMA Bio- oder Sepharose-Säule am Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer (Varian) detektiert wurden. Die Höhe des Peaks spiegelt die Intensität der Fluoreszenzstrahlung, also die emittierten Photonen pro Zeit und Fläche,

wieder, die als Maß für die Konzentration der zu detektierenden Substanz in der Probenfraktion herangezogen wird. Grundlage der Fluoreszenz ist die Fähigkeit von bestimmten Stoffen das zuvor absorbierte Licht zu emittieren. Dabei werden Elektronen dieser fluoreszierenden Moleküle in einen energetisch höheren Zustand angehoben (Singulett-Zustand, S_2). Der Übergang von Molekülen aus dem thermisch relaxierten elektronisch angeregten S_2 - in den Grundzustand erfolgt unter Emission von Strahlung, der Fluoreszenz [107].

Die verwendeten Einstellungen für die einzelnen vermessenen Substanzen sind im Anhang in der Tabelle A-1.2 zusammengestellt. Diese Methode diente zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz von in Liposomen verkapseltem HPTS (siehe Überblick Abbildung A-2.1) mit LRh-PE in der Doppellipidschicht.

4.6.5 Kernspinresonanzspektroskopie

Diese spektroskopische Methode erlaubt die Beobachtung von Atomkernen mit Kernspins $I > 0$ in einem äußeren Magnetfeld und liefert Informationen über die Struktur und Dynamik von Molekülen. Dies geschieht zum einen aufgrund sich ändernder Besetzung der Energieniveaus der Kernspins, wenn senkrecht zum Hauptmagnetfeld ein hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld (Resonanz), mittels einer um die Probe befindlichen Induktionsspule, eingestrahlt wird. Die Drehimpulse der Kernspins richten sich in Abhängigkeit ihrer atomaren Umgebung aus. Die Summe der Kernmagnetisierungen kehrt anschließend wieder in ihren Ausgangszustand zurück, was als T_1 -Relaxation (longitudinale Relaxationszeit) bezeichnet wird. Durch die transversale T_2 -Relaxation kann zum anderen der entropische Einfluss der Umgebung über magnetische Wechselwirkungen ausgedrückt werden.

4.6.5.1 Spektren für die Qualitätsanalyse von Squalen

Eindimensionale (1D) ^1H - und ^{13}C -Spektren von reinem Squalen und unterschiedlich oxidierten Squalenproben wurden am 400 MHz-Spektrometer von Bruker (Rheinstetten, Deutschland) bei 20°C erstellt. Zur Probenvorbereitung wurden 200 μl Squalen mit 400 μl deuteriertem Chloroform (CDCl_3 mit einem Deuterierungsgrad von 99,5%) verdünnt, was als spätere Referenz zur Auswertung herangezogen wurde [108]. Die ^1H -Spektren wurden bei einer Frequenzbandbreite von 8012 Hz, mit 16.000 Messpunkten und

256 Durchläufen erstellt. Die invers-entkoppelten 1D-Spektren der ^{13}C -Messung wurden bei einer Frequenzbandbreite von 36 kHz, 32.000 Messpunkten und 8.000 Durchläufen aufgezeichnet. Für die heteronukleare Entkoppelung wurde mit WALTZ-64 [109] bei einer 90° Pulsdauer von 200 μs gearbeitet. Die Pulssequenzen (siehe Abbildung A-1.1 im Anhang) wurden aus dem Bruker-Pool entnommen. Die Spektren werden durch eine Fourier-Transformation, Phasen- und Basislinienkorrektur erhalten. Dazu wurde das Bruker-Software-Paket TopSpin verwendet. Als Referenzwert der Spektren dienten 7,26 ppm des verbleibenden CHCl_3 im zu 99,5% deuterierten Lösungsmittel Chloroform. Die Analyse der Spektren erfolgte unter Verwendung der Software MestReNova 10.0.

4.6.5.2 NMR-Diffusometrie

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D des Lecithin-Moleküls wurden die Proben zur ^1H -Messung wie folgt vorbereitet: 100 mM DPPC wurden in 1 ml CDCl_3 gelöst und die Verdünnungen dazu in seriellen Stufen von 10; 1; 0,1 und 0,01 mM hergestellt. Diese Proben wurden in ein Shigemi Röhrchen überführt und in das homogene Magnetfeld des Spektrometers platziert. Die NMR-Messungen wurden bei 500 MHz ^1H Larmor-Frequenz und 20°C mit einem Avance III HD 500-Spektrometer von Bruker und einer TCI Kryosonde für erhöhte Signalintensität durchgeführt. Das ^1H -Signal von DPPC bei 7,24 ppm wurde auf das ^1H Restsignal von CHCl_3 im 99,95%-igen CDCl_3 bezogen. Um den Diffusionskoeffizienten von DPPC zu bestimmen, wurde ein doppelt-stimuliertes Echo-Experiment [110] mit einer effektiven Gradientenimpulsdauer von 3 ms (genauer 3,072 ms, da „smooth square“) verwendet. Die Diffusionszeit betrug 100 ms und die Wiederholungszeit 1 s.

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wurden die NMR-Daten unter Verwendung des Bruker Software-Pakets TopSpin und Dynamics Center verarbeitet. Diese DOSY-Spektren wurden über die Stejskal-Tanner Gleichung [111] bei 100 mM über einen Einkomponenten-Fit und für alle anderen Verdünnungen über ein Zweikomponenten-Fit analysiert, sodass die Diffusionskoeffizienten als Funktion der Konzentration erhalten wurden.

4.7 Aufreinigung der Ölphase

Zur Reinigung von Squalen wurde 30 ml Öl mit 2 g Florisil® (Magnesiumsilikate $\text{MgO} \cdot x\text{SiO}_2$) für 6 h in einem Laborschüttler inkubiert (25°C bei

130 rpm). Anschließend wurde das Öl-Silikat-Gemisch in eine Kunststoff-spritze aus Polypropylen (30 ml) gefüllt und durch einen 0,2 µm PVDF-Filter unter Verwendung manueller oder pneumatischer Kräfte filtriert. Zur Wiederholung des Reinigungsdurchganges wurde das filtrierte Squalen in eine andere Spritze überführt und erneut mit 2 g frischem Florisil® inkubiert. Nach insgesamt fünf Reinigungsschritten wurde das Öl in ein 50 ml Falcon-Tube filtriert und bei 4°C unter Sauerstoffausschluss (durch Überschichten von Argon) dunkel gelagert. Diese Purifizierungsmethode stellt somit eine Erweiterung der bereits dargestellten Methode mittels Florisil® dar [112, 113], die bisher nur als einstufiges Verfahren beschrieben war.

4.8 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer mit Medium gefüllten Zellkulturflasche mit einer Grundfläche von 75 cm², welche im Brutschrank bzw. CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% Stickstoff platziert wurde.

Entsprechend der jeweiligen Tumor-Zelllinien wurde als Medium zum einen Dulbecco's modifiziertes Adler-Medium (DMEM) mit 4500 mg Glukose, 110 mg Natrium-Pyruvate und 300 mg L-Glutamin pro Liter oder RPMI-1640 Medium mit 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) und 300 mg L-Glutamin pro Liter für die Kultivierung verwendet. Diesen Medien wurde je nach Anforderungen und Bedarf der jeweiligen Zelllinie fötales Rinderserum (FBS), Natrium-Pyruvat (SP) oder weiteres HEPES hinzugesetzt. Das fötale Rinderserum wurde zuvor hitze-inaktiviert und in Aliquote zu je 50 ml abgefüllt. Die Menge der jeweiligen Zusätze sind unter 4.1.7 für die einzelnen Kulturen aufgeführt.

Zum Waschen der Zelllinien wurde Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (D-PBS) ohne Calcium- und Magnesiumchlorid benutzt. Das Ablösen adhärenter Zellen erfolgt durch Zugabe von Trypsin, welches als Arbeitslösung zuvor 1:10 mit D-PBS verdünnt wurde.

Trypsin (10-fach) und hitze-inaktiviertes FBS wurden als Aliquote im Gefrierfach bei -20°C gelagert. Tryphan-Blau wurde als Arbeitslösung 0,5%-ig verwendet und dazu 0,5 g in 100 ml PBS gelöst und anschließend sterilfiltriert, um mögliche Kristalle zu entfernen. Diese Arbeitslösung wurde in Eppendorf-Tubes zu je 1 ml aliquotiert und ebenfalls bei -20°C gelagert.

4.8.1 Passagieren von Zellen

Die kultivierten Zelllinien mussten auf Zelldichte (Konfluenz) geprüft und regelmäßig vereinzelt werden, was in den Verdünnungsstufen 1:6 bis 1:12 erfolgte. Je nach Wachstum der Zellen erfolgte dieser Schritt nach 2-3 Tagen bei einer Konfluenz von ca. 80%, indem die bestimmte Verdünnung der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt wurde. Dazu wurde das alte Medium mit Hilfe einer 2 ml Aspirationspipette abgenommen und die Zellen mit 8 ml PBS gewaschen, welches anschließend ebenfalls wieder abpipettiert wurde.

Für die Zelllinien B16-F10, C166 und C26 erfolgte das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche durch Zugabe von 1 ml Trypsin, einer Serinprotease, welche Proteine an dieser Stelle spaltet. Die Zellen sollten Trypsin nicht zu lange ausgesetzt werden, da sie sonst geschädigt werden können, deswegen erfolgte die Inkubation im Brutschrank nur für 2-3 min. Danach musste die Trypsinierung durch die Zugabe von Medium mit 10% FBS gestoppt werden. Die Zellsuspension wurde dazu im jeweiligen frischen Medium verdünnt und mittels Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Für eine beispielsweise 1:10 Verdünnung wurden 9 ml Medium zu dem einem Milliliter Trypsin hinzugegeben und anschließend 1 ml dieser Suspension in eine neue mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

Bei den RAW 264.7 Zellen wurde kein Trypsin verwendet, da sich diese Zellen sehr einfach von dem Boden der Kulturflasche ablösen lassen. Die Zellen wurden stattdessen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Kulturflasche gekratzt und anschließend in 5 ml PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde anschließend 3 min bei 300 x g und 20°C in der Multifuge 1 S-R zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml PBS mit Hilfe einer 100 µl Pipette resuspendiert. Für beispielsweise eine 1:10 Verdünnung wurden anschließend 100 µl der Suspension in eine neue mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

Alle Arbeiten an den Zellen, wie der Kultivierung, dem Vereinzeln, sowie der Inkubation, wurden unter sterilen Bedingungen in der Laborbank CleanAir mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die von außen in die Sterilbank gebrachten Materialien und Geräte, wie Pipettierhilfe etc. wurden zuvor mit 70 %-igem Ethanol gereinigt.

4.8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die suspendierten Zellen 3 min bei 300 x g abzentrifugiert, in vorbereitetem Einfriermedium (Kulturmedium mit 20% FBS, 5% DMSO) resuspendiert und in 1 ml-Einfrier Röhrchen überführt. Dabei wurden die Zellen auf Eis gelagert und anschließend über Nacht bei -20°C in einer Cryo-Gefriereinheit (CoolCell®) stufenweise eingefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C in flüssigem Stickstoff.

Bei Bedarf wurden die Zellen wieder in Kultur genommen: Nach dem kurzen Antauen der Zellen in einem Wasserbad bei 37°C wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit vorgewärmten Kulturmedium stufenweise verdünnt, sodass das DMSO schnell inaktiviert wurde und die Zellen keinen osmotischen Schock bekommen konnten. Anschließend wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% Stickstoff kultiviert.

4.8.3 Zellzahlbestimmung und Mikroskopie

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Bürker-Türk-Kammer, einer Zählkammer, die eine Kombination der Systeme von Bürker und Thoma darstellt und eine doppelte Netzteilung aufweist. Wie in Abbildung 26 A dargestellt, ist eine Zählkammer ein aus optischem Spezialglas gefertigtes Präzisionsmessgerät, welches zur Bestimmung der Teilchen- bzw. Zellzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit dient. Es besteht aus einer rechteckigen Grundplatte, welche vier parallel zu den kurzen Seiten verlaufende Längsnuten aufweist. Dadurch ist die Platte in einen Mittelsteg, zwei Außenstege und zwei größere Außenstege unterteilt. Der Mittelsteg ist etwas tiefer als die beiden Außenstege, bei der doppelten Ausführung der Kammer nochmals zweigeteilt und weist auf jeder Seite die Gravur eines Zählnetzes für die Analysemöglichkeit auf. Das Zählnetz zeigt insgesamt 9 Großquadrate von je 1 mm^2 , Abbildung 26 C. Jedes Großquadrat ist in 16 Gruppenquadrate mit je $0,2\text{ mm}$ Seitenlänge und somit einem Flächeninhalt von je $0,04\text{ mm}^2$ unterteilt. Im mittleren Großquadrat ist jedes Gruppenquadrat in 16 Kleinstquadrate mit je $0,05\text{ mm}$ Seitenlänge, also demnach einem Flächeninhalt von $0,0025\text{ mm}^2$ geteilt. Unterschiedlich bei der Bürker-Türk Zählkammer ist, dass auch die Außenquadrate noch zusätzlich durch Doppellinien unterteilt sind, wodurch weitere Kleinquadrate mit je $0,05\text{ mm}$ Seitenlänge entstehen [114, 115].

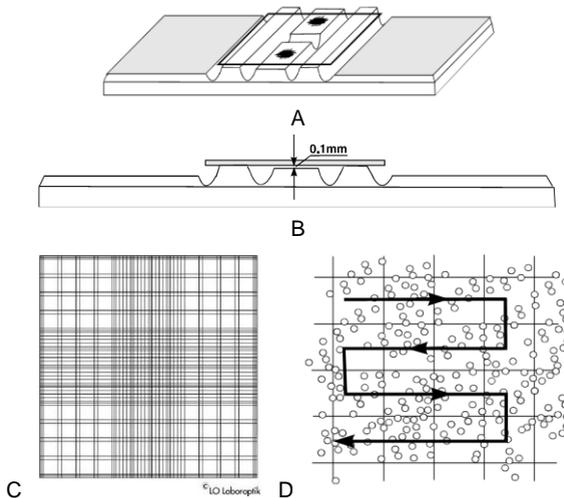


Abbildung 26: Darstellung einer Zählkammer. A – Draufsicht auf doppelte Kammerausführung; B – Profil mit aufgelegten Deckglas und Kapillarspalt; C – Zählnetz der Bürker-Türk-Kammer und D – Darstellung der 16 Kleinquadrate mit empfohlenem Zählschema [116]

Beim Aufschieben eines Deckglases auf die beiden Außenstege entsteht zwischen der Unterseite des Gläschens und dem Mittelsteg der Kammer, wie in Abbildung 26 B angedeutet, ein Kapillarspalt mit einer Tiefe von 0,1 mm. Das Deckgläschen ist richtig aufgesetzt, wenn an Position der Außenstege die Ausbildung von Interferenzlinien, sogenannten Newtonschen Ringen, zu sehen ist. Anschließend wurden 10 µl der auf Zellzahl zu untersuchenden Zellsuspension an die Stelle des Kapillarspalts pipettiert und beobachtet, dass sich der Spalt durch die Kapillarwirkung langsam füllte. Die Zellen wurden zuvor zentrifugiert, das FBS-enhaltende Medium im Überstand entfernt und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension in PBS mit 0,5%-igem Tryphan-Blau 1:2 verdünnt. Tryphan-Blau, auch Benzaminblau genannt, ist ein anionischer Diazofarbstoff mit der die Viabilität von Zellen getestet werden kann, da lebende Zellen über eine intakte Zellmembran verfügen und den Farbstoff nicht ins Innere der Zelle zugänglich machen. Abgestorbene Zellen weisen jedoch eine perforierte, nicht-intakte Zellmembran auf, wodurch der Farbstoff ins Zellinnere gelangen kann und diese dadurch dunkel angefärbt vorliegen. Abbildung 26 D zeigt das Schema nach der die mit Farbstoff versetz-

ten Zellen unter dem Mikroskop visuell gezählt wurden. Dabei wurden jeweils nur die in den Kleinstquadraten sowie an deren linken und oberen äußeren Rändern befindlichen lebenden Zellen für die Zählung herangezogen. Insgesamt wurden die jeweils 16 Kleinquadrate von allen 4 in den Ecken des Zellnetzes angeordneten Großquadrate ausgezählt. Der Mittelwert der nicht-gefärbten hellen (lebenden) Zellen aus den 4 Großquadraten wurde für die Berechnung der Zellzahl wie folgt verwendet:

$$\begin{aligned} \text{Zellen} * \text{Kammertiefe} * \text{Volumen} * \text{Verdünnung} &= \\ \text{Zellzahl (pro 1mm}^2\text{)} * 10 \text{ (mm)} * 1.000 \text{ (}\mu\text{l pro 1ml)} * 2 &= \quad (25) \\ \text{Zellzahl} * 20.000 &= \text{Zellen/ml} \end{aligned}$$

Die Zellzahl sollte zwischen 80-100 Zellen pro Großquadrat liegen und nicht zu stark zu den anderen Großquadraten schwanken. Wenn in einem Kleinquadrat bereits mehr als 10 Zellen gezählt wurden, musste die Zellsuspension stärker mit Tryphan-Blau verdünnt werden, was es in der Formel anschließend als veränderten Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen galt. Um die Viabilität der Zellen in Prozent angeben zu können, mussten die angefärbten (toten) Zellen nach gleichem Schema wie oben beschrieben ausgezählt werden. Mit nachfolgender Formel

$$\frac{\text{Zellzahl lebender Zellen /ml}}{\text{gesamte Zellzahl (lebende + tote Zellen)/ml}} * 100\% \quad (26)$$

wurde die Zellviabilität in der Suspension anschließend berechnet.

4.8.4 Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Kurven

Um die inhibitorische Wirkung einer pharmakologisch relevanten Substanz bestimmen zu können, wurden u.a. Tumor-Zellen mit einer Testsubstanz inkubiert und in Abhängigkeit von verschiedenen angewendeten Konzentrationen sogenannte Dosis-Wirkungs-Kurven der Test-Substanz erstellt. Aus den sigmoidalen Kurvenverläufen kann durch mathematische Modellierung die mittlere Effektivdosis, auch mittlere effektive oder inhibitorische Konzentration IC_{50} genannt, abgeleitet werden. Dieser statistisch errechnete Wert gibt Auskunft darüber, bei welcher Konzentration einer Substanz die Vermehrung, d.h. die Proliferation, von Zellen innerhalb eines Untersuchungszeitraums um die Hälfte gehemmt wurde. Daher wird diese Konzentration auch Hemmkonzentration genannt und üblicherweise in Milli- oder Nanogramm pro Liter angegeben.

4.8.4.1 Aussähen von Zellen auf 96-Well Test-Platten

Damit die Wirkkurven für verschiedene Konzentrationen einer Substanz bestimmt werden konnten, wurde zuvor eine definierte Anzahl an Zellen in die 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen (37°C und 5% Stickstoff) kultiviert. Jede Vertiefung wurde mit 100 µl Medium befüllt. Somit musste berechnet werden, wieviel Zellsuspension, von der die Zellzahl bereits ermittelt wurde, in einem definierten Volumen Medium zu homogenisieren ist. In der Literatur dienten Werte von etwa 4×10^5 Zellen/ml als Orientierung [117-119]. Die Zellzahl musste so gewählt werden, dass exponentielles Wachstum über die Dauer des gesamten Versuches gewährleistet werden konnte, was für jede Zell-linie zuvor bestimmt werden musste. Dieser Vorversuch ist in Abbildung A-3.6 gezeigt und machte deutlich, dass die optimale Zellzahl für Inkubationszeiten bis 48 h deutlich geringer war, als in der Literatur angegeben und im Bereich zwischen 1000-5000 Zellen pro Ansatz lag. Für beispielsweise 2.000 Zellen pro Vertiefung (2×10^4 Zellen/ml) und einer ermittelten Zellzahl von 1,4 Mio. Zellen/ml in der Suspension, mussten für 96 Vertiefungen exakt 137 µl der Zellsuspension in 9,6 ml zellspezifischem Medium bereitgestellt werden.

4.8.4.2 Dialyse

Für die *in vitro* Versuche kam präzipitiertes Mistellektin zum Einsatz, welches zuvor nach beschriebener Methode isoliert wurde [120]. Je nachdem welche Konzentration für ein Experiment benötigt wurde, wurde ein entsprechendes Volumen ausgefallener Proteine zuvor bei 10.000 x g und 4°C für 10 min in der Tischzentrifuge 1-14K zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Pellet in vorgekühltem PBS resuspendiert. Um mögliche Reste entfalteter Proteine zu entfernen, wurde ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Um die Rückstände des Präzipitierpuffers Ammoniumsulfat vollständig zu entfernen, wurde der Überstand nachfolgend in ein Dialyseröhrchen, mit einer Ausschlussgrenze des Molekulargewichts von 8 kDa, überführt. Das Röhrchen wurde, wie in Abbildung 27 gezeigt, mittels Schwimmer kopfabwärts in ein Becherglas mit PBS gehängt, sodass die Dialysemembran vollständig (unter Ausschluss von Luftblasen) mit Puffer benetzt war. Die Dialyse erfolgte für mindestens 48 h bei 4-8°C in PBS.

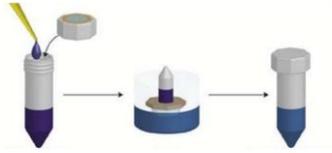


Abbildung 27: Darstellung des Dialyse-Versuchsaufbaus mittels Tube-O-DIALYSER™ [121]

Insgesamt wurde gegen das 1000-fache des eigenen Probenvolumens dialysiert, was durch wiederholte Wechsel des umliegenden PBS realisiert wurde. Nach der Dialyse wurde das in PBS gelöste Protein mit Hilfe einer Spritze aus dem Röhrchen entfernt und zur Vorbereitung für die Zellkulturversuche durch einen 0,2 µm Filter steril-filtriert.

4.8.4.3 Inkubation von Zellen

Für die Inkubation der zu testenden Substanz wurde das Medium-Substanz-Verhältnis von 9:1 stets gewährleistet, um sicherzustellen, dass die Zellen trotz möglicher Inhibierung genügend Nährstoffe und Vitamine zur Verfügung haben, um zu proliferieren. Somit wurde die Substanz bereits 1:10 verdünnt auf den Zellen eingesetzt, was in der Bereitstellung von ausreichend hoher Substratkonzentration und späteren Berechnung des IC₅₀-Wertes berücksichtigt werden musste. Die Ansätze der Substanz wurden für die verschiedenen zu testenden Verdünnungen in Reagiergefäßen von 1,5 ml Volumen unter der Sterilbank vorbereitet und mit entsprechendem Medium so verdünnt, dass die Dosis-Wirkungs-Kurven anschließend erstellt werden konnten. Dann wurde das Kultivierungsmedium von den Zellen abgenommen und die vorbereiteten Ansätze ebenfalls zu je 100 µl Volumen auf die Zellen bzw. in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 24, 48 oder 72 h je nach Experimentanforderungen unter den genannten Bedingungen im Brutschrank.

Um die Auswertung der Daten später gewährleisten zu können, mussten jedoch auch verschiedene Kontrollen berücksichtigt werden. Als Hauptkontrolle wurden Zellen betrachtet, die keine Behandlung mit einer Testsubstanz erfuhren und nur im entsprechenden Medium kultiviert wurden. Sie

dienten als Kontrolle auf Proliferation und wurden als Maß für die Konfluenz von unbehandelten versus behandelten Zellen herangezogen. Des Weiteren musste berücksichtigt werden, in welchem Puffer sich die zu testende Substanz befand und Kontrollen generiert werden, welche die gleichen Verdünnungsstufen wie die Substanzansätze aufwiesen, jedoch nur den verwendeten Puffer beinhalteten. Diese Kontrollen wurden später als jeweilige Referenz zu dem einzelnen Verdünnungsschritt verwendet. Fernerhin wurden freie Vertiefungen ohne Zellen für die anschließende photometrische Auswertung benötigt, die mit entsprechender Testlösung befüllt als Referenz für die Hintergrundabsorption dienen.

4.8.4.4 Zell-Proliferationsassay

Der CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega stellt eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Anzahl von lebenden und proliferierenden Zellen dar. Diese Testmethode beinhaltet die Komponente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium (MTS) und den Elektronenkoppler Phenazin Ethosulfat (PES) in einer gebrauchsfertigen Lösung vereint. MTS-Tetrazolium wird in lebenden, metabolisch aktiven Zellen von Dehydrogenasen mittels NADPH oder NADH zu dem wasserlöslichen Farbstoff Formazan reduziert (siehe Abbildung 28).

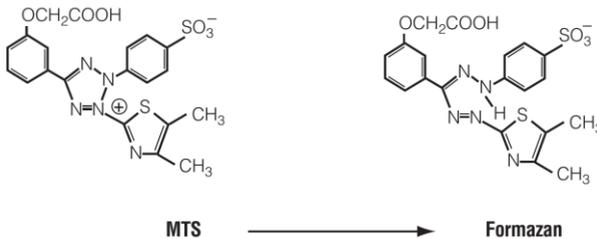


Abbildung 28: Chemische Struktur der MTS-Komponente und ihres Produkts Formazan [122]

Das Produkt Formazan ist im Zellmedium ebenfalls löslich und kann bei einer Wellenlänge von 450-540 nm detektiert werden. Die Menge an gebildetem Formazan-Produkt ist der Anzahl an lebenden Zellen direkt proportional.

Für die Durchführung des Zellproliferations-Assays zur Testung des inhibitorischen Einflusses einer pharmakologisch relevanten Substanz, wurden die Zellen zuvor, wie unter 4.8.4.1 beschrieben, auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und die entsprechenden Kontrollen, wie unter 4.8.4.3 aufgeführt, berücksichtigt. Nach entsprechender Inkubationsdauer des Versuches (24, 48 oder 72 h) wurde das Medium aus den Vertiefungen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Dieser Schritt wurde laut Protokoll nicht zwingend beschrieben, empfahl sich aber, um Interaktionen von Zellmetaboliten mit MTS-Reagenz ausschließen zu können und gleiche Messbedingungen in allen Vertiefungen gewährleisten zu können. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl MTS-Reagenz zu dem entsprechend vorgelegten Medium mit einem Volumen von 100 µl, sodass die Konzentration pro Vertiefung 317 µg/ml MTS betrug. Die MTS-PES-Lösung wurde dann für 1-2 Stunden bei 37°C und 5% Stickstoff solange inkubiert, bis die Absorption der Hintergrund-Kontrollen (3-4 Vertiefungen ohne Zellen) typischerweise 0,2–0,3 betrug. Die Absorption wurde am EZ Read 400 Microplate Reader bei 492 nm gemessen, während die Referenz-Wellenlänge 630 nm betrug. Der Mittelwert dieser Hintergrund-Absorption wurde bei der Auswertung später von allen anderen gemessenen Absorptionen abgezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel 2013 und der Statistik-Software GraphPad Prism 4.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Emulsionserzeugung mit natürlichen Emulgatoren

5.1.1 Einfluss der Beschallungsparameter

Um für den Zentrifugationsprozess möglichst nanoskalige Emulsionen von homogener Größenverteilung zu erzeugen sowie den Einfluss der unterschiedlichen Beschallungsparameter des Ultraschallgerätes auf die Erzeugung von stabilen Emulsionen ausfindig zu machen, wurden die verschiedenen Parameter Amplitude, Intervall und Zeit systematisch variiert und untersucht. Zur Identifikation des optimalen Beschallungsintervalls, wurde exemplarisch eine 0,4 volumenprozentige (Vol.-%) W/O-Emulsion mit 0,3 mg/ml in Squalen gelöstem POPC verwendet. Die Amplitude betrug über die gesamte Beschallungszeit von 20 min 50% der Maximalleistung von 200 W. Die Temperatur T wurde mit Hilfe eines Temperaturfühlers direkt nach der Beschallung aufgenommen. Zur Bestimmung der Auswirkungen der Beschallungsparameter auf die Emulsionserzeugung, wurde die Größe (Durchmesser d), der PDI und die Anzahl (Count rate C_r) der mittleren gezählten, erzeugten Partikel mittels DLS am PCS-Gerät von Malvern bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 bis Tabelle 7 zusammengefasst. Die verwendeten Parameter und Einstellungen der PCS-Messungen sind im Anhang in Tabelle A-1.1 angegeben.

Tabelle 5: Variation des Beschallungsparameters „Intervall“ für die Emulgierung mittels Ultraschall. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind für $n=5$ Messwiederholungen einer exemplarischen W/O-Emulsion dargestellt

Intervall [-]	d [nm]	PDI	C_r [kcps]	T [°C]
0,3	913,9 \pm 81,7	0,183 \pm 0,112	624,8 \pm 19,3	36
0,5	689,1 \pm 49,7	0,246 \pm 0,086	849,6 \pm 16,1	38
0,8	566,1 \pm 27,1	0,212 \pm 0,074	439,4 \pm 19,0	40

Wie in Tabelle 5 zu sehen, konnte mit zunehmender Länge des Intervalls der Tropfendurchmesser um bis zu 38% auf etwa 566 nm reduziert werden,

gleichzeitig schwankte der PDI und erhöhte sich leicht, was für eine inhomogenere Tropfengrößenverteilungen spricht. Des Weiteren nahm die C_r ab, was mit einer Zunahme der gemessenen Temperatur einherging. Letzteres stellt für proteinhaltige Lösungen ein Ausschlusskriterium dar, weshalb für weitere Emulgierungen mit Intervallen $\leq 0,5$ sowie an einer Optimierung der Kühlung gearbeitet wurde. Die zu beschallende Probe wurde, zur Gewährleistung der Kühlung während der Ultraschalleinwirkung, fortan in einem Eisblock platziert und zur besseren Wärmeableitung mit Ethanol umgeben.

Tabelle 6: Variation der Beschallungsparameter „Amplitude“ und „Zeit“ für die Emulgierung mittels Ultraschall. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind für n=5 Messwiederholungen einer exemplarischen W/O-Emulsion dargestellt

Amplitude [%]	t [min]	d [nm]	PDI	C_r [kcps]	T [°C]
30	5	890,7 \pm 71,9	0,176 \pm 0,154	766,8 \pm 12,2	22
30	30	680,5 \pm 63,9	0,166 \pm 0,051	736,2 \pm 28,7	23
30	60	760,0 \pm 47,9	0,098 \pm 0,083	683,6 \pm 21,9	25
50	5	992,0 \pm 75,6	0,211 \pm 0,150	538,5 \pm 11,6	28
50	30	574,0 \pm 25,5	0,128 \pm 0,069	522,4 \pm 16,5	30
50	60	484,3 \pm 29,8	0,127 \pm 0,042	448,2 \pm 22,7	34

Ferner wurde eine 0,4 Vol.-% W/O-Emulsion mit 0,3 mg/ml POPC in Squalen verwendet, um bei einem konstanten Intervall von 0,5 die Parameter „Amplitude und Zeit“ zu variieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst und zeigen den positiven Einfluss der bereitgestellten Kühlung, da über den Beschallungszeitraum von 5-60 min, sowohl bei 30% bzw. 50% Amplitude, keine höheren Temperaturen als 25 bzw. 31°C gemessen wurden. Bei einer Amplitude von 30% konnte durch eine Verlängerung der Beschallungszeit von 5 auf 30 min bzw. 60 min eine Tropfenreduzierung von etwa 15%, bis auf 760 nm, erzielt werden. Bei einer beaufschlagten Amplitude von 50% konnte der Tropfendurchmesser nach 60 min Beschallungszeit um die Hälfte reduziert werden, als nach nur 5 min Beschallung und erreichte folglich etwa 484 nm. Der PDI macht in beiden Fällen deutlich, dass nicht nur der Tropfendurchmesser verringert werden konnte, sondern die Tropfengrößenverteilung auch monodisperser wurde. Da jedoch die Temperatur bei 60 min bereits wieder über 30°C lag und keine merkliche Verbesserung des PDI erzielt werden konnte sowie zudem auch die C_r wieder abnahm, wurden die Parameter 50% Amplitude und 30 min Beschallungszeit für weitere Emulgierungen ausgewählt. Eine Reduzierung der

Tröpfchengröße bis auf etwa 255 nm Durchmesser konnte erst erzielt werden, nachdem der Dispersphasenanteil von 1 Vol.-% auf 0,2 Vol.-% herabgesetzt wurde. Die W/O wurden dazu ebenfalls mit 0,3 mg POPC pro ml stabilisiert und bei einer Amplitude von 50%, einem Intervall von 0,5 und einer Beschallungszeit von 30 min erzeugt. Die Ergebnisse der PCS-Messung sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Zusätzlich ist die Tabelle mit Daten zur Stabilitätsuntersuchung der 0,2 Vol.-%-igen Emulsionen nach 3 und 13 h Lagerung bei Raumtemperatur (RT) bzw. im Kühlschrank (bei 4°C) ergänzt.

Tabelle 7: Variation des Dispersphasenanteils für die Emulgierung mittels Ultraschall und Stabilitätsüberprüfung. Mittelwerte \pm Standardabweichung für n=5 Messwiederholungen einer exemplarischen W/O-Emulsion

Disperser Phasenanteil [Vol.-%]	d [nm]	PDI	C_r [kcps]	T [°C]
1,0	843,2 \pm 67,0	0,205 \pm 0,193	1023,4 \pm 34,3	22
0,4	559,3 \pm 33,0	0,143 \pm 0,107	892,3 \pm 20,1	20
0,2	254,6 \pm 18,3	0,144 \pm 0,060	208,8 \pm 15,5	30
0,2 (nach 3 h bei RT)	282,8 \pm 17,2	0,176 \pm 0,049	27,5 \pm 3,6	-
0,2 (nach 13 h bei RT)	346,9	0,247	7,8	-
0,2 (nach 13 h bei 4°C)	743,4 \pm 62,2	0,347 \pm 0,046	258,8 \pm 20,5	-

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Reduzierung des Dispersphasenanteils auf 0,2 Vol.-%, der mittels POPC stabilisierten Emulsion, eine Tropfengröße von \sim 250 nm erzielt wurde. Eine Wiederholung der Messung nach 3 h bzw. 13 h zeigte jedoch, dass die Emulsion nicht stabil war. Bereits nach 3 h bei etwa 20°C waren zwar immer noch Tröpfchen zu detektieren, die in ihrer Größe lediglich 10% zugenommen hatten, jedoch nahm die mittlere gezählte Anzahl an Partikel um etwa 85% ab. Nach 13 h lag die C_r bereits unter 10 kcps, weshalb aus dem Ergebnis der bei RT gelagerten Probe abgeleitet wurde, dass die Emulsionströpfchen aggregierten und anschließend sedimentierten. Dies führte dazu, dass der überwiegende Anteil der zuvor detektierten Partikel nicht mehr zum Streulichtsignal der Messung beitrug. Ob es sich bei dem Instabilitätseffekt um Oswald Reifung oder um Koaleszenz handelte, konnte nicht näher differenziert werden. Die im Vergleich dazu bei 4°C gekühlt gelagerte Emulsion zeigte nach 13 h eine C_r von 259 kcps sowie eine Zunahme der Tropfengröße um den Faktor 2,9. Fernerhin nahm die Polydispersität um den Faktor 2,4 zu. Aus diesem Ergebnis konnte abgeleitet werden, dass die Beweglichkeit der Partikel in dem, aufgrund der Kühlung, viskoserem Medium verringert werden konnte

und die Emulsionstropfen nicht so stark aggregierten, dass sie in dem betrachteten Zeitraum aus dem Messbereich sedimentierten. Dennoch nahm die durchschnittliche Partikelgröße zu und verdeutlichte die Instabilität der Probe. Somit konnte der Einfluss der Temperatur als die ebenfalls maßgeblich, auf den Emulgierprozess und die Emulsionsstabilität, einwirkende Prozessgröße dargestellt werden.

5.1.2 Tropfengrößenverringering durch Ultraschall-Extrusions-Kombination

Zur Optimierung der Tröpfchengröße wurde eine Kombination von Ultraschall und Extrusionsverfahren, wie unter 2.1.3 beschrieben, etabliert und erprobt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 29 gezeigt. Dazu wurde die Sonotrode durch die kreisförmige Öffnung am Extruder nah an die Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße von 200 nm gebracht. Damit sich die mechanische Schwingung des Ultraschalls über das flüssige Medium bis an die Membran überträgt und so zum gezielten Abreißen der Tröpfchen führen konnte, wurde die Membran von außen mit Öl umgeben, welches durch eine fixierte und gekürzte Pipettenspitze hinzugegeben werden konnte.

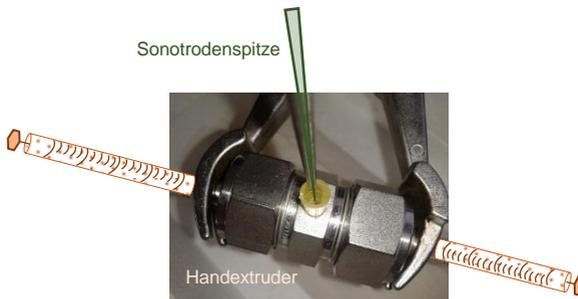


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Ultraschallbehandlung mit gekoppelter Extrusion (Handextruder von Liposfast basic)

Die Ergebnisse der Emulsionserzeugung mit und ohne gekoppelter Extrusion sind in der nachfolgenden Tabelle 8 für W/O-Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil von 2 Vol.-% zusammengestellt.

Durch die Behandlung der 2 Vol.-%-igen Emulsion mit der Ultraschall-gekoppelten Extrusion durch die 200 nm Polycarbonatmembran konnte die

mittlere Tropfengröße d um etwa die Hälfte der ursprünglichen Größe auf etwa 437 nm reduziert werden. Gleichzeitig wurde die Partikelgrößenverteilung homogener, was sich analog dazu in dem halbierten PDI widerspiegelt.

Tabelle 8: Übersicht über die PCS-Messungen einer W/O-Emulsion vor und nach Extrusion durch eine 200 nm Polycarbonatmembran [123]. Mittelwerte \pm Standardabweichung von n unabhängig hergestellten Emulsionen mit 0,3 mg/ml POPC gelöst in Squalen

n	Extrusion	Vol.-%	d [nm]	PDI	C_p [kcps]
7	-	2	$846,8 \pm 147,2$	$0,37 \pm 0,07$	$611,9 \pm 195,7$
2	200 nm	2	$437,2 \pm 63,1$	$0,20 \pm 0,03$	$470,2 \pm 99,4$

Eine absolute Stärke des getesteten Verfahrens ist die deutliche Reduzierung der vorherigen Tröpfchengröße bei gleichzeitigem Erreichen einer homogeneren Partikelgrößenverteilung. Der Nachteil dieser Behandlung ist jedoch der hohe Verlust an Probenmaterial. Eine einzige Extrusion von 500 ml Emulsion führte zu lediglich 200 ± 20 ml. Demnach führte die Ultraschall-Extrusions-Kombination zu geringen Ausbeuten von etwa 40%. Dass sich bei etwa halbiertes Partikelgröße die Anzahl der mittleren gezählten Partikel dabei nicht verdoppelte, sondern mit 470 kcps weniger Partikel detektiert wurden, deutete bereits auf den Verlust von Probenmaterial (von circa 60%) bei der Extrusion hin.

5.2 Liposomen aus Nanoemulsionen mittels Zentrifugation

Für das Zentrifugationsverfahren wurden Ölphasen ausgewählt, die neben ihrer Anwendung im pharmazeutischen Bereich zusätzlich auch eine geringe und möglichst ähnliche Viskosität wie Wasser aufweisen, um den Transport der Emulsionströpfchen in der kontinuierlichen Phase besser realisieren zu können. Häufig verwendete Öle, wie Sonnenblumen- oder Olivenöl haben eine Viskosität von 49 bzw. 84 mPa s [124], die um den Faktor 50-80 über der von Wasser (1 mPa s bei 20°C) liegt. Daher wurde Squalen als Öl mit einer niedrigen Viskosität (12 mPa s) für die Emulsionserzeugung und Liposomenpräparation ausgewählt, welches zudem auch als Adjuvanz für Impfstoffe zugelassen und verwendet wird. Die mittlere Sinkgeschwindigkeit für die nachfolgenden Ergebnisse wurde zuvor mittels Gl.(9) und unter Berücksichtigung der dynamischen Viskosität beider flüssigen Phasen Wasser und Squalen, wie unter 4.4 beschrieben, berechnet. Die

Ergebnisse dieser Berechnung sind für verschiedene angenommene Tropfengrößen in der Tabelle 4 im Material und Methodenteil des Kapitels 4.4 zusammengestellt.

5.2.1 Nachweis des Phasentransfers des Emulgators

Das Verteilungsgleichgewicht des Emulgators POPC wurde untersucht, um die Anreicherung des Phospholipids an der Phasengrenze und somit Aufschluss über den Phasenübergang der Wassertröpfchen zu erhalten. Dazu wurden W/O-Emulsionen erzeugt, die jeweils auf eine untergeschichtete Wasserphase pipettiert wurden. Anschließend wurde die Sedimentation der Wassertröpfchen aus der oberen Emulsion in die untere wässrige Phase durch Zentrifugation herbeigeführt. Als Emulgator der dispersen Phase diente, wie unter 4.3 beschrieben, das Phospholipid POPC mit einer Konzentration von 0,3 mg/ml mit 1 Mol% LRh-PE, welches zuvor in Squalen gelöst wurde. Die Emulsionen wiesen eine Größe von $524,5 \pm 124,5$ nm und einem PDI von $0,229 \pm 0,120$ auf (siehe Tabelle 9), woraus die Sedimentationsgeschwindigkeit und davon abgeleitet die Zentrifugationszeit (min. 10-27 min bei 13.000 rpm, siehe Tabelle 4) berechnet wurde. Der Versuchsaufbau, der aufgeschichteten W/O-Emulsion auf die Wasserphase, ist in Abbildung 30 auf der linken Seite dargestellt.

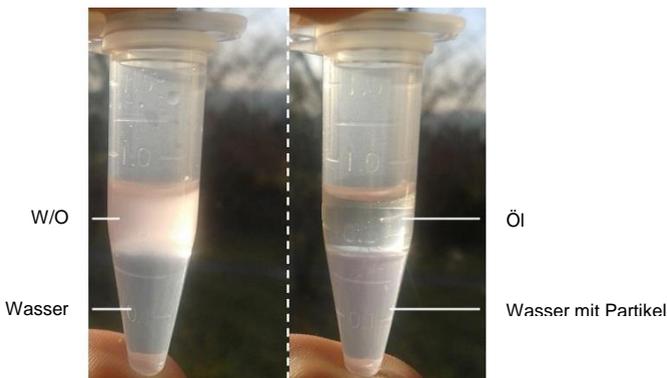


Abbildung 30: Darstellung einer mit 0,3 mg/ml POPC und 1 Mol% LRh-PE-stabilisierten W/O-Emulsion vor (links) und nach (rechts) der Zentrifugation

Beim Aufschichten der W/O-Emulsion auf die Wasserphase lagern sich freie Phospholipide auch an der Grenzschicht zwischen Wasser und Öl an. Die Wassertröpfchen der Emulsion wandern, wie in 4.4 beschrieben, während des Zentrifugationsvorganges aufgrund ihrer höheren Dichte in die unterliegende Wasserphase. Dabei werden die Wassertröpfchen von den Phospholipiden ummantelt, die sich zuvor an der Grenzschicht angeordnet haben, und bilden eine Bilschicht (Liposomen) aus. Aufgrund der Trübung in der unteren Phase (siehe dazu Abbildung 30, rechte Seite) kann auf den zuvor beschriebenen Prozessschritt geschlossen werden. Wie in Tabelle 9 gezeigt, konnten die gebildeten Partikel mittels PCS-Messung mit einer Größe von $287,1 \pm 38,5$ nm und einem PDI von $0,703 \pm 0,136$ nachgewiesen werden. Demnach waren die gebildeten Partikel in der Wasserphase etwa halb so groß wie die Wassertropfen der W/O und zudem deutlich inhomogener in ihrer Größe. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Tropfen auf dem Weg durch die Grenzschicht in kleinere Partikel übergehen oder möglicherweise zerbrechen.

Tabelle 9: PCS-Werte der beteiligten Phasen vor und nach der Zentrifugation. Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen mit 0,3 mg/ml POPC mit 1 Mol% LRh-PE gelöst in Squalen

Probe	d [nm]	PDI	C_r [kcps]
Squalen	$1,2 \pm 0,4$	$0,327 \pm 0,164$	$3,23 \pm 0,17$
Wasser	$105,4 \pm 97,1$	$0,380 \pm 0,147$	$1,40 \pm 0,10$
POPC in Squalen (0,3 mg/ml mit 1 Mol% LRh-PE)	$21,7 \pm 22,2$	$0,550 \pm 0,321$	$5,30 \pm 0,42$
0,2 Vol.-% W/O-Emulsion	$524,5 \pm 124,5$	$0,229 \pm 0,120$	$316,05 \pm 301,08$
Ölphase nach Zentrifugation	$124,9 \pm 165,9$	$0,756 \pm 0,345$	$6,47 \pm 4,41$
Wasserphase nach Zentrifugation	$287,1 \pm 38,5$	$0,703 \pm 0,136$	$658,98 \pm 197,06$

Die an der Bildung der Phasengrenzfläche, zur Stabilisierung der Emulsionen, beteiligten Phospholipide wurden anschließend in der wässrigen Phase mittels Fluoreszenzspektroskopie quantifiziert. Zur Auswertung der jeweiligen Phasen dienten die Kalibrationsreihen von POPC mit 1 Mol% LRh-PE in Squalen bzw. in wässriger Phase, welche im Anhang in Tabelle A-3.4 und Tabelle A-3.5 zu finden sind. Das Verteilungsgleichgewicht des Emulgators, bei dem eine homogene Mischung von POPC und LRh-PE angenommen wurde, zeigt nach der Zentrifugation eine Akkumulation von etwa $43 \pm 10\%$ in der Wasserphase (siehe Tabelle 10). Daraus kann ge-

schlussfolgert werden, dass dieser Anteil des fluoreszenzmarkierten Phospholipids LRh-PE zuvor an die Phasengrenze adsorbierte und beim Transport der Wassertropfchen ebenfalls mit transportiert wurde, während etwa $3,6 \pm 1,7\%$ molekular gelöst in der aufgelagerten Ölphase verbleiben. Diese prozentualen Angaben sind jeweils von dem fluorometrisch bestimmten Phospholipidanteil in mg/ml (Tabelle 10) auf die eingesetzten 0,3 mg/ml POPC mit 1 Mol% LRh-PE bezogen.

Tabelle 10: Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie. Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n \geq 3$ unabhängigen Versuchen der beteiligten Phasen nach der Zentrifugation (siehe Abbildung 30, linke Seite). Auswertung des Phospholipidanteils erfolgte nach Kalibrationskurven in den jeweiligen Phasen, siehe Anhang Tabelle A-3.4 und Tabelle A-3.5

Probe	LRh-PE Intensität [a.u.]	Anteil Phospholipid [mg/ml]
Ölphase	$2,42 \pm 1,15$	$0,011 \pm 0,005$
Wasserphase	$56,27 \pm 12,98$	$0,130 \pm 0,030$

Dass die Ölphase nach der Zentrifugation kaum noch Partikel (Emulsionströpfchen oder gelösten Emulgator) enthält, verdeutlichen auch die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung in Tabelle 9. Vor allem die Anzahl der mittleren gezählten Partikel nahm, von 316 ± 301 kcps in der Emulsion auf $6,5 \pm 4,4$ kcps in der Ölphase, nach der Zentrifugation ab. Somit kann durch den Nachweis des fluoreszenz-markierten Phospholipids in der unteren wässrigen Phase gezeigt werden, dass der Phasentransfer der emulgierten Wassertropfen und somit die Liposomengenerierung im Zentrifugalfeld prinzipiell erreicht wird. Der restliche Anteil der Phospholipide wurde an der Grenzschicht der beiden flüssigen Phasen angenommen, jedoch nicht näher untersucht.

5.2.2 Charakterisierung gebildeter nanoskaliger Liposomen

Als Erweiterung des beschriebenen Nachweises des Emulgatortransportes während der Zentrifugation (in Abschnitt 5.2.1), wurde die Herstellung von Liposomen aus Nanoemulsionen nach der Methode von Pautot *et al.* [1, 2] nachvollzogen. Dieser Schritt ist in Kapitel 2.1.4 und 4.4 ausführlich beschrieben und in Abbildung 5 (auf Seite 11) schematisch dargestellt. Um zusätzlich die Einkapselungseffizienz (EE%) nachfolgend für diesen Ver-

sich bestimmen zu können, wurde bei der Dispergierung der W/O-Emulsionen mit dem fluoreszierenden Wirkstoffmarker HPTS (5 μM in PBS-Puffer gelöst) gearbeitet. Die Ergebnisse emulgierter Tröpfchen in den jeweiligen kontinuierlichen Phasen sowie die Charakterisierung der nach der Zentrifugation erhaltenen Partikel in der unteren Wasserphase sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Die erzeugten Nanokapseln konnten mittels PCS-Messung mit Größen von $499,7 \pm 179,9$ nm und einem PDI von $0,628 \pm 0,252$ nm nachgewiesen werden und sind damit lediglich um den Faktor 1,2 kleiner als die Wassertropfen der W/O-Emulsionen, aus denen sie erzeugt wurden. Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass durch die Anwesenheit der phospholipidhaltigen Zwischenphase, die Emulsionströpfchen effizienter mit der zweiten Phospholipidschicht ummantelt werden können bevor sie die Wasserphase erreichen und nicht, wie zuvor in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, beim Durchtritt durch die Grenzschicht zerbrechen.

Tabelle 11: Übersicht über die PCS-Messungen aller beteiligten Phasen bei der Liposomenherstellung mittels Zentrifugation. Mittelwerte \pm Standardabweichung von ≥ 5 unabhängigen Versuchen mit 0,3 mg/ml POPC + 0,1 Mol% LRh-PE gelöst in Squalen

Probe	d [nm]	PDI	C_r [kcps]
POPC in Squalen (0,3 mg/ml + 0,1 Mol% LRh-PE)	$17,1 \pm 10,6$	$0,707 \pm 0,188$	$4,10 \pm 0,40$
2 Vol.-% W/O-Emulsion mit HPTS	$592,8 \pm 181,9$	$0,428 \pm 0,242$	$405,83 \pm 198,69$
Ölphase nach Zentrifugation	$3,8 \pm 3,1$	$0,323 \pm 0,202$	$3,35 \pm 0,27$
Wasserphase nach Zentrifugation	$499,7 \pm 179,9$	$0,628 \pm 0,252$	$184,20 \pm 95,58$

Die Ölphase weist nach der Zentrifugation keine signifikante Anzahl an Partikel ($C_r = 3,35 \pm 0,27$ kcps) mehr auf, was darauf hin deutet, dass die Wassertropfen diese Phase während der Zentrifugation erneut fast vollständig verlassen haben. Allerdings ist die Anzahl der mittleren gezählten Partikel von 406 ± 199 kcps in der Emulsion auf 184 ± 96 kcps in der Wasserphase abgesunken und der PDI deutet mit Werten von $0,628 \pm 0,252$ auf eine sehr inhomogene Partikelgrößenverteilung hin.

Ferner wurde die Effizienz der Verkapselung des Wirkstoffmarkers HPTS von den generierten Nanokapseln (Liposomen) ermittelt. Dazu wurde die mit Partikeln angereicherte Produktphase mittels SEC in einzelne Fraktionen, wie unter 4.6.3 beschrieben, getrennt und anschließend fluorometrisch analysiert (siehe 4.6.4). Abbildung 31 zeigt exemplarisch eine Trennkurve

der einzelnen zusätzlich gravimetrisch vermessen Fraktionen, durch die anhand des gemessenen Lichtstreuungssignals und des LRh-PE-Signals (Bestandteil der gebildeten Phospholipid-Doppelschicht) die eluierten Liposomen eindeutig zugeordnet werden können. Freies (nicht-verkapseltes) HPTS eluiert aufgrund der Diffusion des kleinen Moleküls in das poröse Trägermaterial später und zeigt eine minimale Intensität der Lichtstreuung und des LRh-PE-Signals. Ein kompletter Überblick über die verschiedenen Methoden, die in diesem Versuch zusammenspielen, ist in Abbildung A-2.1 im Anhang dargestellt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

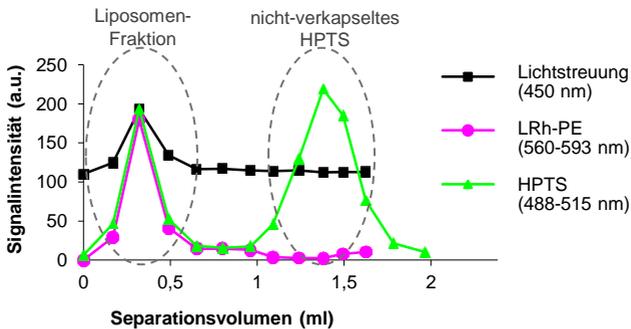


Abbildung 31: Chromatogram einer exemplarischen Elution von Liposomen aus der Wasserphase nach dem Zentrifugationsverfahren. Das Diagramm zeigt Fluoreszenzintensitäten über die gewichteten Fraktionen

Die EE% wurde mittels der Relation zwischen dem in den Liposomen-Fraktionen detektierten HPTS-Signal zu dem insgesamt detektiertem HPTS-Signal berechnet und konnte mit maximal $25,8 \pm 4,9\%$ bestimmt werden. Demzufolge sind über 70% des Wirkstoffmarkers nicht verkapselt worden. Um auszuschließen, dass die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, sowie die erzeugten Partikel eine geringe Affinität zu dem Trägermaterial der Säule haben, wurde zusätzlich die Wiederfindungsrate ermittelt. Diese wurden aus dem Quotienten der Summe aller Signale aus den einzelnen Fraktionen zu dem initialen Signal der auf die Säule geladenen Probe berechnet und wies Abweichungen von $>14\%$ auf. Auch wenn gegenüber der klassischen Extrusion mit Einkapselungseffizienzen von $\sim 1\text{-}3\%$ [31] eine Steigerung der EE%

erzielt werden konnte, wurde durch diese Untersuchungen eine umfassende Problemanalyse des technologischen Lösungsansatzes zur Liposomen-generierung im Zentrifugalfeld nach Pautot *et al.* [1, 2] erstellt. Um die Stabilität der Partikel besser charakterisieren zu können, wurden zusätzlich die Zeta-Potentiale der Partikel ermittelt und in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Charakterisierung der Liposomen in der Wasserphase. Mittelwerte \pm Standardabweichung von ≥ 5 unabhängigen Versuchen (siehe Tabelle 11). Die Einkapselungseffizienz (EE%) wurde mittels SEC aus dem Verhältnis der Liposomenfraktion zu dem gesamten Eluat bestimmt. Die Wiederfindung (WF%) stellt das Signalverhältnis aller Fraktionen zum Signal der Probe vor der SEC dar

Probe	EE%	WF% PL [LRh-PE]	WF% Wirkstoff- marker [HPTS]	Zeta-Potential [mV]
Liposomen in Wasserphase	25,8 \pm 4,9	108 \pm 34	97 \pm 14	-19,6 \pm 10,7

Es wird angenommen, dass der Schritt der Bilschichtbildung am Phasenübergang Öl zu Wasser als kritisch betrachtet werden muss. Das Ergebnis zur geringen und nicht einwandfrei reproduzierbaren EE%, zusammen mit den Erkenntnissen über die Instabilität der erzeugten Emulsionen, legt nahe, dass ein tieferer Einblick und Verständnis über die Monoschichtbildung der Emulsionen an der Phasengrenze nötig ist.

Kenntnisse über die Belegungsdichte der Phospholipide an der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl sind entscheidend, um das unerwünschte Freisetzen von Wirkstoff beim Phasenübergang zu vermeiden oder mittels optimierter Formulierung bzw. Emulgatorkonzentration gar verhindern zu können. Zur Lösungssuche der technologisch genannten Probleme sind daher als grundlegende Methode Untersuchungen mittels Tensiometrie ausgewählt worden. Diese haben zum Ziel ein tieferes Verständnis über die Adsorptionsvorgänge, den Aufbau und die Struktur gebildeter Phospholipidschichten zu erhalten und die Verfahrensschritte bei der Liposomenherstellung mit Hilfe des Zentrifugationsprozesses zu optimieren.

5.3 Grenzflächenuntersuchung an flüssigen Phasengrenzen

5.3.1 Charakterisierung der Phasengrenze zwischen Öl und Wasser zur Emulsionsoptimierung

5.3.1.1 Experimentelle Grenzflächenbelegung

Wie unter 5.1 beschrieben, wurden erste Versuche zur Emulsionserzeugung mit einer Lipidkonzentration von 0,3 mg/ml POPC, in Squalen gelöst, durchgeführt. Da die Tropfengröße durch die verschiedenen Beschallungsparameter nicht bis auf die gewünschte Größe von ~ 200 nm reduziert werden konnte und auch die Stabilität der Emulsion nur innerhalb der 3 h gegeben war, wurde sich dem Problem der Emulsionsoptimierung von Seiten der Grenzflächenbelegung des Emulgators genähert.

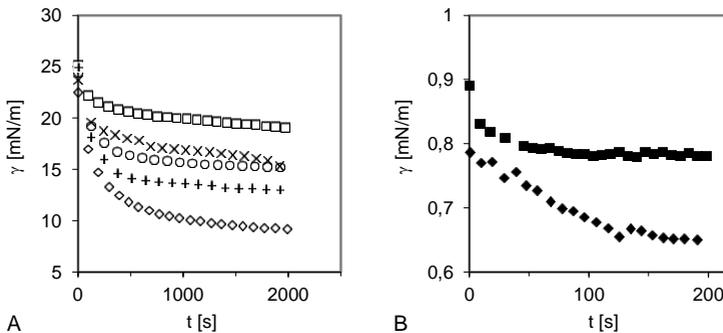


Abbildung 32: Grenzflächenspannung γ als Funktion der Adsorptionszeit t für verschiedene POPC-Konzentrationen in Squalen: A – (\square) 0,0001; (\times) 0,001; (\circ) 0,01; ($+$) 0,015 und (\diamond) 0,3 mg/ml; sowie B – (\blacksquare) 3 und (\blacklozenge) 10 mg/ml [123]

Die Adsorption des biologischen Emulgators POPC an die Grenzfläche von Squalen mit Wasser, wurde mit Hilfe von dynamischen Grenzflächenspannungsmessungen, wie unter 4.5 beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 32 für die Konzentrationsbereiche 0,001-0,3 mg/ml POPC (in A) sowie 3 und 10 mg/ml POPC (in B) als Funktion von t dargestellt. Mit höherer Konzentration kann, wie erwartet, ein stärkeres und auch schnelleres Absinken von γ beobachtet werden, welches in ein Plateau übergeht, da sich ein Gleichgewicht einstellt. Während die Messungen bei Konzentrationen $\leq 0,3$ mg/ml über 2.000 s durchgeführt wurden,

konnte bei höheren Konzentrationen bis 10 mg/ml, wie in Abbildung 32 B gezeigt, nur noch einige hundert Sekunden gemessen werden, bevor der Tropfen aufgrund der starken Abnahme von γ abbriss.

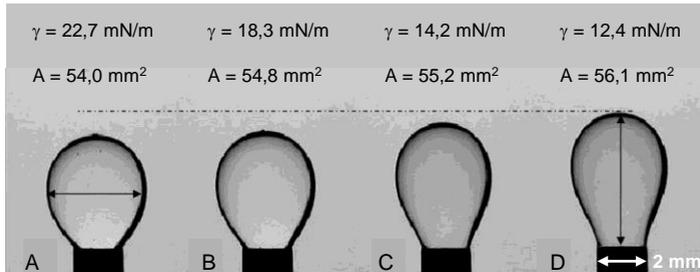


Abbildung 33: Profil eines 40 mm^3 Squalentropfens in Wasser über die Zeit. Änderung der Oberfläche durch Adsorption von POPC ($0,3 \text{ mg/ml}$ gelöst in Squalen) an die Grenzfläche zwischen Wasser und Squalen, aufgenommen nach: A – 0 s, B – 200 s, C – 3000 s und D – 5000 s [123]

Der Einfluss der POPC-Adsorption an die O/W-Grenzfläche auf die Form und Gestalt des Tropfens, ist in Abbildung 33 durch Profilaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Die Fläche des Tropfens mit konstantem Volumen (40 mm^3) nimmt zu, d.h. er wird immer schmaler und maximal gedehnt, bis er durch die reduzierte Spannung letztlich kurz vor dem Abreisen von der Kapillare ist.

Für die Bestimmung der Adsorptionsisothermen wurden die Äquilibriumswerte des diffusionskontrollierten Prozesses, wie unter 4.5 und mittels Gl.(20) beschrieben, durch Extrapolation ermittelt (siehe Abbildung 34 A) und als Funktion der Konzentration dargestellt (siehe Abbildung 34 B).

Die kritische Aggregationskonzentration CAC, bei der keine Konzentrationserhöhung mehr zu einer Änderung von γ führt, da die Grenzfläche des Tropfens vollständig mit adsorbierten POPC-Molekülen belegt ist, wurde mit $3,0 \text{ mg/ml}$ bestimmt. Dieses Ergebnis legte nahe, dass die zuvor erzeugten Emulsionen mit $0,3 \text{ mg/ml}$ nicht die ausreichende Menge an Emulgator zur vollständigen Belegung der Grenzfläche besaßen. Wie im Abschnitt 5.3.2, auf Grund von ergänzenden Messungen mit einem invertierten Messaufbau, noch erläutert werden soll, liegt die exakte CAC und damit die Löslichkeit des Phospholipids POPC bei $1,7 \text{ mg/ml}$ ($1,3 \text{ mM}$; siehe Tabelle 15). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Konzentration des POPCs in

Squalen mindestens um den Faktor 6 höher gewählt muss, um stabile Emulsionen zu erzeugen.

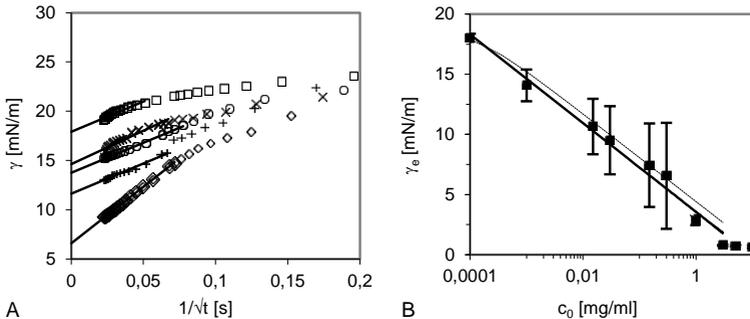


Abbildung 34: γ für POPC in Squalen als Funktion von t sowie c_0 . **A** – $\gamma(1/\sqrt{t})$ mit linearer Regression $t \rightarrow \infty$ für (\square) 0,0001; (\times) 0,001; (\circ) 0,01; $(+)$ 0,015 und (\diamond) 0,3 mg/ml; **B** – $\gamma - \log c_0$ -Kurve mit Isothermen nach: (—) Gibbs und (---) Langmuir für ermittelte γ_e aus A [123]

Um fernerhin die Bildung von Aggregaten im Bereich der ermittelten CAC mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurden POPC-Squalen-Gemische verschiedener Konzentration, die für die Tensiometrie oder Emulgierung vorbereitet wurden (siehe 4.3), mittels DLS vermessen. Tabelle A-4.1 im Anhang zeigt einen Überblick über den durchschnittlich ermittelten Partikeldurchmesser d , PDI und Count rate C_r der vermessenen Konzentrationen 0,3; 3 und 10 mg/ml POPC vor und nach der Behandlung mit Ultraschall im Wasserbad. Als Referenz und zur Orientierung über die Anwesenheit von Aggregaten diene reines Squalen. Durch die Zunahme der detektierten Partikel (C_r) auf 11,1 und einem d von 376,9 nm bei einem PDI von 0,66 konnte gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von 3,0 mg/ml die Bildung von Aggregaten bereits einsetzte, was das Ergebnis der ermittelten Adsorptionsisotherme von POPC an der Squalen/Wasser-Grenzfläche bekräftigt. Ferner wurde deutlich, dass das Einbringen des Phospholipids POPC in die Ölphase, über den zuvor erzeugten Lipidfilm und nach einer Ultraschallbehandlung von 2 h, die zu bevorzugende Methode darstellt, da bei direkter Lösung des Phospholipids und 6 h Beschallung immer noch etwa doppelt so viele und große Aggregate vorhanden waren.

Die nach G.(15) ermittelte minimale Fläche pro Lipidmolekül der Gibbs-Isotherme betrug 253 \AA^2 pro POPC-Molekül. Für die Adsorptionsisotherme

nach Langmuir (Gl.(16)) und Frumkin (Gl.(17)) konnten mit Hilfe des Programms IsoFit 256 Å² bzw. 232 Å² pro POPC-Molekül ermittelt werden. Damit sind die ermittelten Flächen für die Belegung des Lipidmoleküls an der Grenzfläche deutlich größer als erwartet. Sie zeigen zwar, dass die drei verschiedenen Adsorptionsmodelle nicht stark voneinander abweichen, weisen jedoch, mit durchschnittlich 3-fach höheren Werten als im Vergleich für die kompakte Doppellipidschicht bekannten 70 Å² [125], auf keine dichte Packung des Emulgators an der Phasengrenze hin.

Diese Diskrepanz zwischen der erwartet notwendigen und tatsächlich experimentell ermittelten Flächenbelegung führte zu der Überlegung, die Belegung der theoretisch erforderlichen Menge an Emulgator mathematisch abzuschätzen.

5.3.1.2 Theoretische Grenzflächenberechnung

Silvestre [126] berechnete die theoretisch Ölsäuremenge, die zur Synthesierung von Magnetit-Gelen durch Monoschichtbildung der Ölsäure an der Eisenoxidoberfläche des Magnetit-Nanopartikel notwendig ist. Ausgangspunkt für diese Betrachtung war die Abschätzung der spezifischen Oberfläche der Nanopartikel und der Projektionsfläche der Ölsäure-Moleküle, sowie die Annahme der dichtesten Kugelpackung (Faktor 0,74 bei kompletter Oberflächenbedeckung). Dabei wurde von einem zylindrischen Modell des Ölsäuremoleküls ausgegangen, welches mit Hilfe der Software Chemdraw berechnet wurde. Diese Überlegungen wurden hier auf die Phospholipid-Emulgatormoleküle und deren Adsorption an die Grenzfläche der dispergierten Emulsionströpfchen übertragen.

Wie viel Emulgator wird demnach zum Aufbau einer Monoschicht benötigt? Dazu wurde auf die Betrachtung der Adsorptionsfläche übergegangen, d.h. von der Größe der gesamten spezifischen Oberfläche der Emulsionströpfchen:

$$\mathbf{Oberfläche}_{Emulsion} = \mathbf{Anzahl}_{Tropfen} * \mathbf{Oberfläche}_{Tropfen} \quad , \quad (27)$$

welche wiederum von der Größe der Emulsionspartikel und der Menge des zu dispergierenden Mediums ($V_{disp. Phase}$) abhängt und durch folgende Formeln ausgedrückt werden kann:

- $\mathbf{Oberfläche}_{Tropfen}: \quad \mathbf{A_{O_Tropfen}} = \mathbf{\pi d_{Tropfen}^2} \quad (28)$

- **Anzahl Tropfen:** $\Sigma_{Tropfen} = \frac{V_{disp.Phase}}{V_{Tropfen}}$ (29)

- **Volumen Tropfen:** $V_{Tropfen} = \frac{1}{6}\pi d_{Tropfen}^3$ (30)

Daraus ergibt sich folgende Beschreibung der Emulsionsoberfläche:

$$A_{O_Emulsion} = \frac{6 V_{disp.Phase}}{\pi d_{Tropfen}^3} \pi d_{Tropfen}^2 = \frac{6 V_{disp.Phase}}{d_{Tropfen}} \quad (31)$$

Für das Beispiel einer 0,4 Vol.-%-igen Emulsion (20 µl auf 5 ml) mit dispergierten Tropfen von 200 nm Größe, sind demnach 0,6 m² Oberfläche zu bedecken.

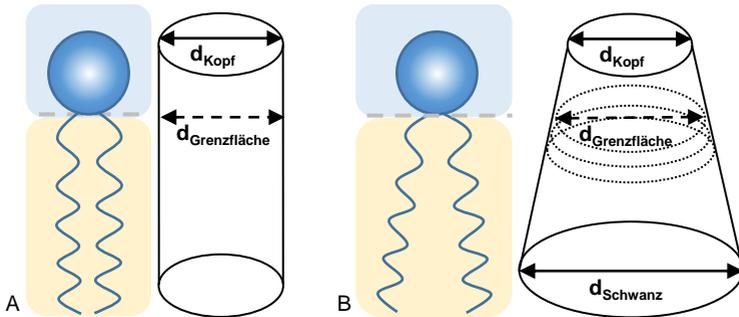


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Platzbelegung von A – gesättigten und B – ungesättigten Phospholipiden

Im Falle einer vollständig ausgebildeten Monoschicht von Phospholipiden (PL) an der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl, ist die Kopfgruppe der Lipidmoleküle die entscheidende Größe für den Platzbedarf der Emulgatormoleküle an der Tropfenoberfläche. Phospholipide können vereinfacht durch einen Zylinder mit der Grundfläche

$$A_{Kopf} = \frac{\pi(d_{Kopf})^2}{4} \quad (32)$$

definiert werden, wie in Abbildung 35 A schematisch dargestellt. Bei ungesättigten Fettsäureketten kann der Zylinder auch eine kubische Form annehmen und die benötigte Fläche des Platzbedarfs an der Grenzfläche erhöhen (siehe Abbildung 35 B). Je nach Größe der Kopfgruppe und Länge der Fettsäurekette ist die Lage der Grenzfläche unterschiedlich, wodurch sich auch der Durchmesser an der Grenzfläche, mit dem die Grundfläche des Platzbedarfs berechnet wird, ändert.

Der jeweiligen Durchmesser des Lipidmoleküls wurde aus der, mit Hilfe der Software Chemdraw (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA) berechneten 3D-Struktur ermittelt und ist im Anhang zu finden (Abb.A-4.2). Die geometrische Anordnung unendlich vieler Kugeln gleicher Größe (hier der Lipidköpfe) im 3-dimensionalen Raum, die sich einander nur berühren und nicht überlappen, stellt eine idealisierte Anordnung dar und kann als dichteste Kugelpackung folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{\pi}{3\sqrt{2}} \approx \mathbf{0,74048} \approx \mathbf{74\%} \quad . \quad (33)$$

Damit lässt sich im Weiteren die theoretisch notwendige Menge an Phospholipiden für eine Monoschicht wie folgt berechnen:

$$\mathbf{Menge}_{\text{Phospholipid}} = \frac{A_{\text{O,Emulsion}}}{A_{\text{Kopf}} N_A} \mathbf{0,74} \quad . \quad (34)$$

Für das Phospholipidmolekül POPC wurde ein d_{Kopf} von etwa 9 Å ermittelt, womit ein Molekül eine Fläche von 63,62 Å² einnimmt. Speziell bei O/W-Emulsionen, bei dem die disperse Phase die Phospholipide beinhaltet, ist es entscheidend, dass die berechnete Menge auf die eingesetzte disperse Phase angewendet wird. Dies soll an einem Beispiel zur Optimierung von O/W-Emulsionen im nachfolgenden Abschnitt 5.3.1.3 nachvollzogen werden. Unter Einbeziehung der Avogadro-Konstante wurden $1,57 \cdot 10^{-6}$ Mol (bzw. 1,19 mg nach Tab.A-2.1) berechnet, die theoretisch zur vollständigen Bedeckung der Emulsionsoberfläche von 200 nm großen Partikeln (bei 20 µl disperser Phase) benötigt werden und $1,16 \cdot 10^{-6}$ Mol (bzw. 0,88 mg), wenn die Krümmung mit einbezogen wird. Der Einfluss dieser Betrachtung auf die Partikelgröße und Stabilität der erzeugten Emulsion, wird nachfolgend dargestellt.

5.3.1.3 Optimierung einer O/W-Emulsion unter Berücksichtigung der molaren Belegung

Bei der Betrachtung der Grenzflächenbelegung der Phospholipidmoleküle sollte, wie im vorherigen Abschnitt dargelegt, nicht die Konzentration, sondern die berechnete Stoffmenge berücksichtigt werden und auf die kontinuierliche oder disperse Phase angewendet werden. Dies ist, wie bereits erwähnt, speziell bei Öl-in-Wasser Emulsionen von entscheidender Bedeutung. Hinzukommt, dass die Phospholipide, welche anhand ihres geringen HLB-Wertes (siehe Tabelle 13) vornehmlich als gute W/O-Emulsionen-Stabilisatoren charakterisiert sind, in der Literatur bzw. Praxis jedoch fast ausschließlich zur Emulgierung von O/W-Emulsionen beschrieben bzw. eingesetzt werden [93, 127, 128].

Tabelle 13: Übersicht über die HLB-Werte verwendeter Phospholipide

Phospholipid	Fettsäurekettenlänge	HLB-Wert nach Gl.(11)
DMPC	14:0-14:0	5,4
DPPC	16:0-16:0	5,0
POPC	16:0-18:1	4,8

Aus diesem Grund wurden die unter 5.3.1.2 berechnete Konzentration von $1,57 \cdot 10^{-6}$ Mol POPC zur Optimierung einer O/W-Emulsion herangezogen. Für eine 0,4 Vol.-%-ige O/W-Emulsion wurde die theoretische Menge somit auf 20 μ l angewendet, was einer Stammkonzentration von 60 mg/ml, deutlich oberhalb der ermittelten CAC von 3 mg/ml POPC in Squalen (siehe 5.3.1.1), entspricht. Die Ergebnisse zur Emulsionsoptimierung sind in der Tabelle 14 exemplarisch sowohl für POPC als auch für DPPC in jeweils Squalen und Squalan dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer Erhöhung der Phospholipidkonzentration in der dispersen Phase, auf die zur vollständigen Belegung an der Grenzfläche theoretisch berechnete Menge, die Größe der erzeugten O/W-Emulsionströpfchen um ~ 90% reduziert werden konnten. Das Ziel, die dispergierten Öltröpfchen zu minimieren, konnte damit erreicht werden. Zusätzlich wurden homogenere Partikelgrößenverteilungen erzielt, was in einem PDI von durchschnittlich $0,23 \pm 0,08$ (Proben I-L) zum Ausdruck kam, als im Vergleich vor der Optimierung mit einem PDI von $0,39 \pm 0,05$ (Proben A-H).

Tabelle 14: PCS-Messungen von O/W-Emulsionen vor und nach Berücksichtigung des berechneten Stoffmengenanteils in der dispersen Phase. Erzielte Tröpfchengröße und PDI von Emulsionen (0,4 Vol.-%) mit verschiedenen Konzentrationen c_0 an Phospholipid (PL) in Squalen bzw. Squalan**

Probe	Öl	PL	c_0 [mg/ml]	r [nm]	PDI
A	Squalen	POPC	0,05	1750,987	0,380
B			0,1	1359,870	0,437
C			2	1366,916	0,392
D			4	1422,996	0,302
E	Squalan	POPC	0,001	1363,500	0,369
F			0,05	2598,829	0,306
G			0,1	1217,042	0,471
H			0,5	1891,495	0,403
nach Optimierung durch berechnete Stoffmenge pro disperser Phase:					
I	Squalen	POPC	60	173,947	0,149
J		DPPC	57	170,135	0,192
K	Squalan	POPC	60	179,380	0,368
L		DPPC	57	149,755	0,208

Im Falle einer W/O-Emulsion führte die theoretische Betrachtung der Grenzflächenbelegung zu keiner nennenswerten Optimierung der Tropfengröße und dessen Verteilung oder Stabilität. Die erwähnte Diskrepanz zwischen der Einordnung von Phospholipiden nach ihrem HLB-Wert und ihrer Verwendung vor allem zur Stabilisierung von O/W-Emulsionen, ging es durch weitere Untersuchungen und Bestimmung tensiometrischer Daten, wie der minimalen Fläche pro Lipidmolekül bei vollständiger Grenzflächenbelegung beim Erreichen der kritischen Aggregationskonzentration, weiter aufzuklären und optimale Formulierungshinweise daraus abzuleiten. Zur Erweiterung des Verständnisses der Phospholipidadsorption und der Optimierung speziell von W/O-Emulsionen, welche für den Zentrifugationsprozess bei der Bildung von Liposomen größenbestimmend sind, empfahl es sich somit, die tensiometrischen Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten auf verschiedene Phospholipide und organische Phasen an der Wassergrenze auszuweiten. Die Ergebnisse dieser Studien sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

** Konzentrationsbereich vor u. nach der ermittelten CAC (Abschnitt 5.3.2; Tabelle 15, linke Seite)

5.3.2 Vergleich der beiden Messaufbauten am PAT

Für die Ausbildung eines Gleichgewichtes ist es theoretisch nicht entscheidend, von welcher Seite kommend die Phospholipide an die Phasengrenze zwischen den beiden nicht-mischbaren Flüssigkeiten adsorbieren. Wie unter 2.2 beschrieben, werden Untersuchungen mittels Tropfen-PAT an flüssigen Phasengrenze, wie in der Literatur gezeigt, mit der Phospholipid-angereicherten organischen Phase im Inneren des Tropfens durchgeführt [53-57, 97]. Dieser Fall ist in Abbildung 36 A schematisch dargestellt.

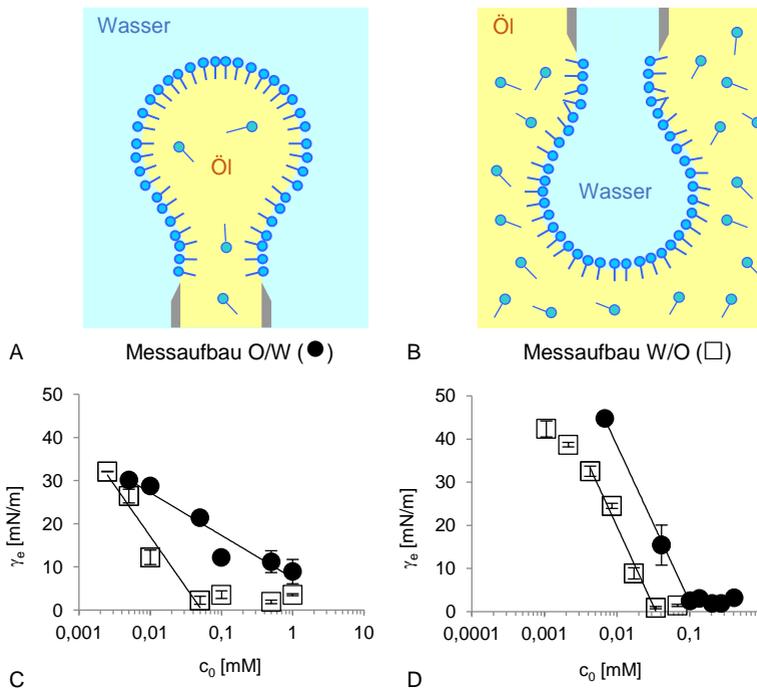


Abbildung 36: Schematische Darstellung der beiden Messaufbauten bei der PAT: A – aufsteigender Tropfen (O/W) und B – hängender Tropfen (W/O) sowie Abbildung der Adsorptionsisothermen mit γ_e als Funktion von c_0 aufgenommen für DPPC in C – Squalen und D – Squalen für die Messaufbauten (●) O/W und (□) W/O [129]

Da jedoch aufgrund der Fragestellung, dem Einsatz von natürlichen Emulgatoren zur Generierung und Stabilisierung von Nanoemulsionen für pharmazeutische Anwendungen, das Interesse bestand sowohl O/W- als auch vornehmlich inverse W/O-Emulsionen zu optimieren, war zusätzlich der Messaufbau von Interesse, welcher letztere Konstellation widerspiegelt. Dieser Fall, des Phospholipid-angereicherten Öls als kontinuierliche bzw. bei der PAT-Messung äußeren Phase, ist in Abbildung 36 B abgebildet. Da für die spezielle Fragestellung der Optimierung von W/O-Emulsionen die organische Phase die kontinuierliche Phase darstellt, wurden zum Vergleich, neben den üblichen Messungen eines in wässriger Umgebung stehenden Öltropfens mit gelöstem Phospholipid, auch Messungen eines invertierten und damit hängenden Wassertropfens in Öl durchgeführt, die signifikante Unterschiede offenbarten.

In Abbildung 36 C und D sind die Adsorptionsisothermen beider Messaufbauten exemplarisch für das Phospholipid DPPC, sowohl in dem Öl Squalen als auch in Squalan dargestellt. Die erwähnten Unterschiede werden zum einen in dem ungleichen Anstieg der Gibbschen-Adsorptionsisotherme und zum anderen in der unterschiedlich erreichten CAC sichtbar. Die Ergebnisse sind in der zweiten Spalte der Tabelle 15 aufgelistet und verdeutlichen, dass die mittels O/W-Aufbau ermittelten Löslichkeit in Squalen um den Faktor 34,4 und in Squalan um den Faktor 3,1 größer ist als bei dem invertierten W/O-Aufbau.

Tabelle 15: Ergebnisse der Grenzflächenspannungsuntersuchung im Vergleich beider möglichen Messaufbauten am PAT für verschiedene Phospholipide (PL) und Öle bzw. der organischen Phasen Chloroform (CHCl₃)

Öl (bzw. organ. Phase)	PL	O/W			W/O		
		$\Gamma_{max} \times 10^{-6}$ [mol/m ²]	A [Å ²]	CAC [mM]	$\Gamma_{max} \times 10^{-6}$ [mol/m ²]	A [Å ²]	CAC [mM]
Squalen	POPC	0,658	253	3,947	1,394	119	1,259
	DPPC	-	-	-	3,788	44	0,103
Squalan	DPPC	1,579 ^(*)	105 ^(*)	1,549 ^(*)	3,996 ^(*)	42 ^(*)	0,045 ^(*)
	POPC	23,049	7	0,136	6,064	27	0,002
	DPPC	6,449	26	0,098	6,544	25	0,032
CHCl ₃	DMPC	7,499	22	0,219	7,323	23	0,091
	DPPC	2,891	58	0,019	1,918	87	0,020

^(*)aus Hildebrandt *et al.*, 2016 [129] mit aufgereinigtem Öl (siehe Abschnitt 5.3.5.2)

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die CAC des O/W-Aufbaus erst später erreicht wird und de facto mehr DPPC benötigt wird, um die Grenzfläche des etwa gleich großen Tropfens (ca. 30 μl) vollständig zu belegen. Gleicher Trend wurde auch für das Phospholipid POPC in Squalen und Squalan beobachtet sowie für DMPC in Squalan. Die ermittelten Größen für diese genannten Phospholipidadsorptionsuntersuchungen sind ergänzend für beide Messaufbauten in der Tabelle 15 gegenübergestellt.

Des Weiteren fiel auf, dass die berechnete molekulare Fläche, welche von DPPC in Squalen bei dem O/W-Aufbau eingenommen wurde, um den Faktor 2,5 größer ist, als im Vergleich zum Messaufbau W/O, und das trotz höherer DPPC-Konzentration beim Erreichen der CAC. Aber ist es möglich, dass wirklich mehr Phospholipid zur Flächenbelegung, die zudem zu keiner kompakten Monoschichtbildung führt, benötigt wird oder handelt es sich hierbei um einen messbedingt herbeigeführten Effekt? Diese Frage sollte mit weiteren Untersuchungen anderer Phospholipide und Ölphasen gelöst werden. Ein vollständiger Überblick über alle Messungen mit verschiedenen Phospholipiden in unterschiedlichen Ölen bzw. organischen Phasen ist, wie bereits erwähnt, ebenfalls in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt. Die Zusammenstellung zeigt die aus den unterschiedlichen Adsorptionsisothermen resultierenden Eigenschaften, wie der ermittelten Grenzflächenkonzentration im Äquilibrium, der molekularen Flächendichte sowie der CAC und damit der Löslichkeit des jeweiligen Phospholipids in den unterschiedlichen organischen Phasen. Für die Untersuchungen von DPPC in Squalen und Squalan, also jeweils einem ungesättigten und gesättigtem Öl, wird bereits deutlich, dass das Verhalten der Phospholipide an der Grenzfläche von der organischen Phase abhängt, in welcher sie gelöst sind. Darauf soll in den nachfolgenden Kapiteln unter 5.3.5 noch stärker eingegangen werden. Die mittels W/O-Messaufbau in Squalen ermittelte Flächendichte von 42 \AA^2 pro DPPC-Molekül, stellt, verglichen mit Werten, die an der Grenzfläche von Wasser und Luft beschrieben wurden [130], einen realistischen Größenbereich dar. Dieses Ergebnis legt ebenfalls nahe, dass der invertierte Messaufbau W/O glaubwürdigere Messdaten liefert. Um die Ergebnisse jedoch besser zu verstehen und in weiteren Bezug zu Literaturwerte setzen zu können, wurde eine Evaluierung der Messmethode mit dem bekannten Stoffsystem Chloroform (CHCl_3) und Wasser durchgeführt.

5.3.3 Evaluierung der Messungen am PAT

Die Ergebnisse der Evaluierung zum Vergleich beider Messaufbauten sind in Abbildung 37 A gezeigt und ergänzend in Tabelle 15 (letzte Zeile) aufgenommen. Wie durch Abbildung 37 A deutlich wird, weichen die ermittelten CAC für beide Messaufbauten nicht voneinander ab, jedoch weisen die Adsorptionsisothermen unterschiedliche Anstiege auf, wodurch abweichende molekulare Flächen pro Phospholipidmolekül berechnet wurden. Dass die ermittelten 58 \AA^2 für DPPC in der organischen Phase Chloroform und dem üblicherweise verwendeten Messaufbau O/W mit publizierten Ergebnissen übereinstimmen [97]; siehe Tabelle A-3.1 im Anhang), sichert die Reproduzierbarkeit unserer Messgenauigkeit und unterstreicht, dass die Ergebnisse des invertierten Messaufbaus glaubwürdig zu behandeln sind. Chloroform ist ein gutes Lösungsmittel für Phospholipide und weist dennoch nur eine geringe CAC von etwa $0,02 \text{ mM}$ auf. Die ermittelten Konzentrationen der vollständigen Monoschichtbelegung und Aggregatbildung in Squalen und Squalan sind im W/O-Aufbau um den Faktor 1,6-2,3 höher, im O/W-Aufbau sogar um den Faktor 7,8-77,5. Um die Aggregatbildung von DPPC in Chloroform mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurden verschiedene Verdünnungen am 500 MHz-Spektrometer (Bruker) vermessen und, wie in Abbildung 37 B gezeigt, der Diffusionskoeffizient D aus dem akquirierten Protonen-Signal (siehe dazu 4.6.5.2) ermittelt.

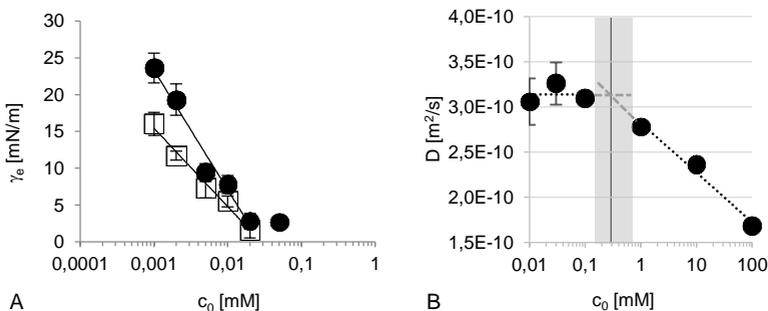


Abbildung 37: Ergebnisse der Messungen von DPPC in Chloroform. A – γ_e als Funktion von c_0 an der Phasengrenze zu Wasser mittels PAT für die Messaufbauten (●) Chloroformtropfen in Wasser und (□) Wassertropfen in Chloroform; B – ermittelter D als Funktion von c_0 aus der NMR-Diffusometrie [129]

Mit abnehmender Konzentration kann ein zunehmender D nachvollzogen werden, welcher jedoch im Konzentrationsbereich von 0,01-0,1 mM etwa konstant bei $3,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ist und die molekulare Löslichkeit des DPPC-Moleküls in Chloroform widerspiegelt. Diese Betrachtung ist möglich, da über die bekannte Viskosität des Lösungsmittels und der Stokes-Einstein Gleichung (Gl.(23)) auf den hydrodynamischen Radius der gemessenen Partikel geschlossen werden kann, der kleiner wird, wenn sich die Aggregate auflösen und die Beweglichkeit der Moleküle zunimmt. Der grau markierte Bereich in Abbildung 37 B symbolisiert den Bereich, in dem mittels NMR-Diffusometrie die Aggregationskonzentration bestimmt werden konnte, welche bei etwa 0,3 mM angenommen werden kann. Da diese Messungen, wie in Chloroform gezeigt, mit den Ölen nicht möglich waren (zu viel ^1H -Signal vom Öl aufgrund der vielen CH_2 - und CH_3 -Gruppen, sowie zu geringes Phosphorsignal bei der ^{31}P -NMR), wurden als komplementäre Methode PCS-Messungen durchgeführt, um die tensiometrisch ermittelte CAC durch Streulichtexperimente zu ergänzen und um einen Positiv-Nachweis zur Bildung von Lipidaggregaten zu führen.

In Abbildung 38 A-C sind die PCS-Ergebnisse für verschiedene Konzentrationen von DPPC in Squalen, Squalan und Chloroform abgebildet und zeigen jeweils oberhalb einer individuell kritischen Konzentration eine Zunahme in C_r und d . Dieser Bereich wurde grau markiert und soll den Konzentrationsbereich kennzeichnen, indem die CAC anhand dieses optischen Messverfahrens angenommen werden kann. Folglich können Partikelaggregate auch erst dann identifiziert werden, wenn sie sich gebildet haben, was die Vermutung nahe legte, dass die mittels PCS ermittelten Konzentrationen auch über den mittels PAT bestimmten Werten liegen. Letztere sind durch die vertikalen Linien sowohl für den O/W- als auch den W/O-Aufbau abgebildet. Für DPPC, welches in Squalan und Chloroform gelöst wurde, trifft der beschriebene Fall zu (siehe Abbildung 38 B und C), wohingegen in Squalen deutlich wird, dass die mittels W/O-Aufbau bestimmte CAC mit dem Bereich aus der PCS-Messung korreliert und das Ergebnis bekräftigt (siehe Abbildung 38 A). Fernerhin wird in dieser Graphik ebenso deutlich, dass die mittels invertierten W/O-Messaufbau ermittelten CAC immer kleiner ausfallen, als mit dem etablierten Aufbau. Dies ist selbst bei Chloroform der Fall, wo sich die CAC kaum unterscheiden, wohl aber die aus den Adsorptionsisothermen abgeleiteten molaren Flächen mit $87 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ für den Aufbau Wasser in Chloroform bzw. $58 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ für Chloroform in Wasser, siehe Tabelle 15.

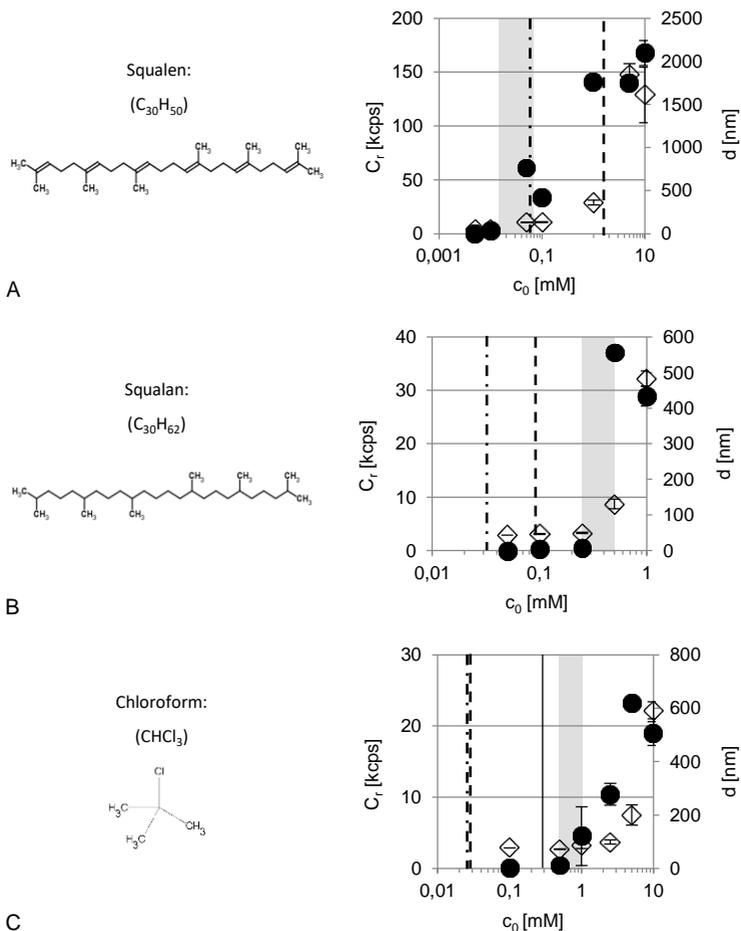


Abbildung 38: PCS-Messungen von DPPC in A – Squalen; B – Squalan und C – Chloroform [129]. Dargestellt sind: (●) C_r und (◇) d über c_0 sowie als Vertikale, die ermittelte CAC des (---) O/W- bzw. (- · -) W/O-Messaufbaus. C zeigt zusätzlich die mittels Diffusometrie bestimmte CAC (—)

5.3.4 Relative Löslichkeit von Phospholipiden in der Wasserphase

Da die unter 5.3.2 gezeigten Gibbsschen Adsorptionsisothermen für den hinzugekommenen invertierten Messaufbau zum Teil nach links verschoben waren und demnach kleinere Aggregationskonzentrationen abgeleitet wurden als für den etablierten Messaufbau (siehe Tabelle 15), ließ sich die Behauptung aufstellen, dass ein Löslichkeitseffekt die Konzentrationsunterschiede herbeiführt. Wenn Phospholipide trotz ihrer geringen Löslichkeit im Wasser die Ölphase verlassen und somit eine Abreicherung der Phospholipide aus dem Inneren des Tropfens verursacht wird, kann mit der angenommenen Volumenkonzentration nicht mehr das gleiche Absinken der Grenzflächenspannung herbeigeführt werden. Die Konsequenz daraus ist, dass scheinbar höhere Phospholipidkonzentrationen nötig sind, um eine vollständige Belegung der Grenzfläche zu erreichen.

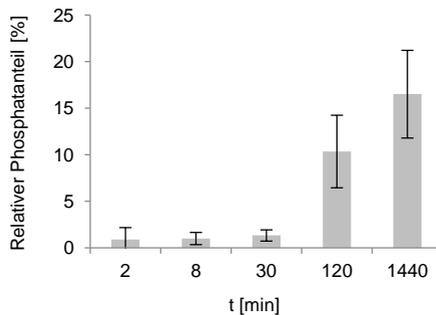


Abbildung 39: Relativer Phosphatanteil der Wasserphase nach der Inkubation mit Phospholipid-haltigem Squalen (3 mg/ml POPC) [129]

Um einen Nachweis dieser Hypothese über den Verlust von Phospholipiden von der organischen Ölphase in die wässrige Umgebung zu erbringen, wurde mit Phospholipid angereichertes Squalen auf eine Wasserphase geschichtet und für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert. Der Verlust von Phospholipid wurde indirekt über die Anreicherung von Phospholipid in der Wasserphase, wie in Abbildung 39 gezeigt und unter 4.2 beschrieben, nachgewiesen und konnte nach 90 h mit bis zu $16,5 \pm 4,7\%$, relativ zu den eingesetzten 3 mg/ml Phospholipid (POPC) bestimmt werden. Der Anteil, welcher

nach etwa 30 min bis 2 h, also im zeitlichen Rahmen stattfindender PAT-Messungen, in der Wasserphase zu detektieren ist, liegt im Bereich von $1,3 \pm 0,6\%$ bis $10,3 \pm 3,9\%$. Es wurde bereits von Li *et al.* diskutiert [97], dass die Phospholipidkonzentration aufgrund der Adsorption der Moleküle an die Oberfläche des Tropfens signifikant reduziert wird, was im Besonderen für extrem geringe Konzentration zutrifft. Zur Kompensierung dieses Effekts empfehlen sie eine Korrektur für die Volumenphase anzuwenden (Gl. 2 in [97]), welche aus dem Quotient von Fläche/Volumen des Tropfens resultiert und zu einer flacher ansteigenden Adsorptionsisotherme als im Vergleich zu den experimentellen Daten führt.

Die Ergebnisse des Evaluierungsversuches von DPPC in Chloroform zeigten, wie bereits erwähnt, für den O/W-Aufbau eine gute Übereinstimmung der experimentellen und korrigierten Daten, auch im unteren Konzentrationsbereich, was in der gleichen Grenzflächendichte und CAC wie bei den publizierten Daten von Li *et al.* [97] zum Ausdruck kam. Dennoch wurden Unterschiede in den Anstiegen der Adsorptionsisothermen gefunden, die trotz Korrektur auf eine weitere Abflachung der Kurve hindeutet. Wie in Abbildung 37 A unter 5.3.3 zu sehen ist, verläuft die Isotherme des W/O Aufbau nochmals flacher als die des O/W-Aufbaus. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Korrektur allein durch den Konzentrationsverlust durch die Monoschichtbildung nicht ausreicht und eine weitere Betrachtung notwendig ist, die den oben beschriebenen Effekt der Abreicherung mit einschließt. Diese Erweiterung sollte, mit anderen Worten, den möglichen Transfer von Phospholipiden von der organischen in die wässrige Phase mit einbeziehen, der vor allem maßgeblichen Einfluss auf die Konzentration haben kann, wenn das im Vergleich zur Umgebung kleinere Tropfenvolumen das Reservoir der Phospholipide bildet, wie es im O/W-Aufbau der Fall ist. Da die Löslichkeit der Phospholipide für die jeweiligen Stoffsysteme unterschiedlich sein kann, ist es nicht möglich diesen Effekt quantitativ auszudrücken oder in Form eines Korrekturfaktors zu berücksichtigen, jedoch kann durch die Wahl eines geeigneten Messaufbaus positiv darauf eingegriffen werden, um den Verlust und damit notwendige Konzentrationskorrekturen zu minimieren. So kann zum Beispiel mit dem invertierten Aufbau, zugunsten der Phospholipid-angereicherten organischen Phase in der Umgebung, der Verlust von Phospholipiden in den Wassertropfen minimal gehalten werden. Dies ist bei dem bisher etablierten Messaufbau nicht möglich und erklärt die Unterschiede in Abbildung 36 C und D sowie Abbildung 37 A. Hinzu kommt, dass die molare Gesamtmenge an Phospholipiden, bei gleicher

Konzentration, in der Umgebung etwa um den Faktor 100 höher ist. Das Tropfenvolumen bei den PAT-Messungen beträgt ca. 30 μl , währenddessen in der Küvette und somit in der Umgebung des Tropfens ein Volumen von 3 ml vorliegt. Aus diesem Grund können Verluste aus dem größeren Reservoir in den kleineren Wassertropfen hin zum Erreichen eines thermodynamischen Gleichgewichtszustandes besser ausgeglichen werden.

Diese Betrachtung wurde bisher bei der akkuraten Bestimmung von Grenzflächenspannungen noch nicht beschrieben oder berücksichtigt, weswegen diese Hypothese, ihre experimentelle Verifikation und die abgeleiteten Schlussfolgerungen in einer eigenen Veröffentlichung zusammengefasst wurden [129]. Dadurch wurde die Kapazität amphiphiler Moleküle aufgezeigt, sich auch in der wässrigen Phase zu lösen und somit zu enormen Änderungen der Konzentration in der Volumenphase zu führen. Um diese entsprechenden Änderungen in der CAC zu bewerten, wurden neben der Tensiometrie, auch PCS- und NMR-Messungen durchgeführt (Abbildung 37 B und Abbildung 38).

Insgesamt kann gesagt werden, dass die hier präsentierten Unterschiede in den Adsorptionsisothermen von Phospholipiden abhängig von dem jeweiligen instrumentellen Messaufbau am Tensiometer waren und sich daraus verschiedene Effekte auf Grenzflächendichte und Löslichkeitsgrenze ergaben. Die Ergebnisse zur Löslichkeit zeigten, dass das Volumenverhältnis von Öl zu der umgebenden Wasserphase entscheidend war. Fernerhin hängt die Löslichkeit von den Materialeigenschaften, also u.a. der Hydrophilie und Hydrophobie, ab und ist für die meisten Materialzusammensetzungen nicht vorhersehbar. Die vorgeschlagene Korrektur der Phospholipid Volumenkonzentration allein [97] ist nicht ausreichend, um eine genaue Berechnung der Gibbsschen Adsorptionsisotherme und Zuordnung der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung zu den entsprechenden Lipidkonzentration durchzuführen. Zur Verbesserung der Genauigkeit der Ergebnisse dieser Methodik wird empfohlen, einen invertierten Messaufbau zu verwenden, bei dem ein Wassertropfen in der Phospholipid-angereicherten organischen Umgebung am Tensiometer vermessen wird. Da diese Phase um den Faktor 100 größer ist als das Volumen und somit das Reservoir an Phospholipiden im herkömmlichen Messaufbau, sind Verlusteffekte durch Löslichkeiten von Phospholipiden in die wässrige Phase dadurch marginal und Grenzflächenspannungen, CAC und minimale Fläche pro Phospholipidmolekül können exakter bestimmt werden.

5.3.5 Einfluss unterschiedlicher Öle und Ölqualitäten auf das Adsorptionsverhalten von Phospholipiden

5.3.5.1 Bedeutung von oxidativen Verunreinigungen für die Grenzflächenbelegung am Beispiel Wasser/Squalen

Die dynamische Grenzflächenspannung $\gamma = \gamma(t)$ von nicht-aufgereinigtem Squalen (Sqe^{n.p.}) zu hochreinem Wasser ist in Abbildung 40 A exemplarisch dargestellt und zeigt die Abnahme von 24 mN/m zu Beginn der Messung auf etwa 17 mN/m nach 1.000 s (siehe Kurve mit schwarz gefüllten quadratischen Symbolen). Durch die $\gamma = \gamma(1/\sqrt{t})$ -Darstellung in Abbildung 40 B wurde die Grenzflächenspannung im Gleichgewicht für $t \rightarrow \infty$ mit 16,5 mN/m (siehe Tabelle 16) bzw. für mehrere Messungen gemittelt mit $15,3 \pm 1,1$ mN/m ermittelt. Letztere Angaben sind in der ersten Zeile (Probe I) der Tabelle 17 zusammengestellt.

Wie im einleitenden Kapitel zum Stand des Wissens unter 2.2.1 beschrieben, gibt es bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts Bestrebungen, die Grenzflächenspannung zwischen zwei Flüssigkeiten abzuschätzen bzw. zu berechnen. Durch den Ansatz von Marmur und Valal [45] konnte für Squalen und Wasser eine empirische Korrelation unter Berücksichtigung der Oberflächenspannungen der reinen Stoffe und den von ihnen ermittelten Konstanten aus experimentell bestimmten Datensätzen durchgeführt werden, siehe Gl.(4) und (5). Nach dieser Abschätzung wurde, im Vergleich zu dem oben genannten experimentell ermittelten Wert, eine theoretische Grenzflächenspannung von 47,6 mN/m (basierend auf allen Datensätzen) bzw. 53,1 mN/m (basierend auf Parametersätzen drei verschiedener Flüssigkeitsgruppen) berechnet.

Diese Gegenüberstellung zeigte, dass Sqe^{n.p.} eine signifikante Menge grenzflächenaktiver Verunreinigung enthalten muss, welche an die Grenzfläche zwischen Wasser und Squalen adsorbiert und die Grenzflächenspannung dadurch deutlich herabsetzt. Aus diesem Grund wurde Squalen, wie unter 4.7 beschrieben, mittels Inkubation mit Magnesium-Silikat (Florisil®) in mehreren Stufen, aufgereinigt. Diese Purifizierungsmethode, welche als einstufiges Verfahren in der Literatur bereits dargestellt ist [112, 113], wurde für die Aufreinigung des Squalenöls als nicht hinreichend ermittelt und daher um weitere sich wiederholende Reinigungszyklen erweitert, was nachfolgend erläutert wird.

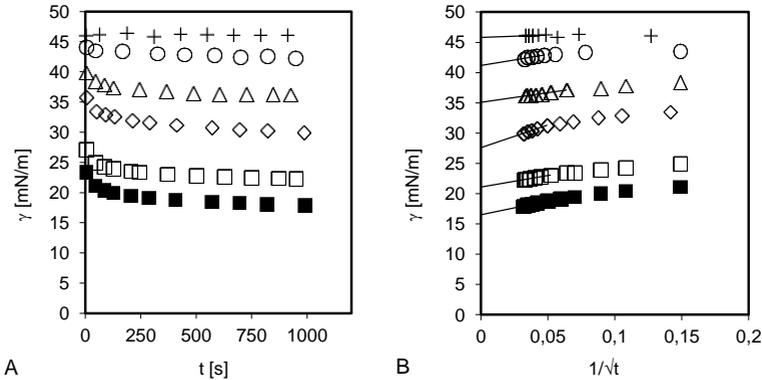


Abbildung 40: $\gamma = \gamma(t)$ als Funktion der Adsorptionszeit dargestellt für (■) nicht-aufgereinigtes Squalen sowie entsprechend nach den Reinigungsstufen (□) 1, (◇) 2, (Δ) 3, (○) 4 und (+) 5 (siehe Supporting Information in [96]).
A – experimentelle Daten und **B** – lineare Regression für $t \rightarrow \infty$ aus der graphischen Darstellung $\gamma = \gamma(1/\sqrt{t})$ zur Bestimmung von γ_e

Die Auswirkungen eines jeden Reinigungsschrittes auf die dynamische Grenzflächenspannungsmessung der schrittweisen Reinigungsprozedur mit Florisil® sind beispielhaft in der Abbildung 40 A (offene Symbole) abgebildet. In Tabelle 16 ist die entsprechende Inkubationszeit mit Florisil® sowie die extrapolierte γ_e und der Korrelationskoeffizient der linearen Regression (R^2) für jeden Reinigungsschritt aus einer beispielhaften PAT Messung der Abbildung 40 B zusammengefasst. Dass γ_e nach jedem vollzogenen Reinigungszyklus ansteigt, verdeutlicht, dass die ursprünglich vorhandenen Verunreinigungen zunehmend eliminiert werden konnten.

Tabelle 16: Übersicht über die Grenzflächenspannungen im Gleichgewicht während des Prozesses der Squalen-Aufreinigung für $t \rightarrow \infty$, siehe Abbildung 40 B [96]

Reinigungs-schritt	Inkubations-zeit [h]	γ_e [mN/m]	R^2
-	-	16,5	0,9909
1	6	21,1	0,9951
2	12	27,6	0,9902
3	18	35,1	0,9856
4	24	41,0	0,8361
5	24	45,9	0,9984

Um nahe alle grenzflächenaktiven Verunreinigungen aus Squalen zu entfernen, wurden insgesamt fünf Reinigungszyklen als hinreichend ermittelt. Die Grenzflächenspannung der aufgereinigten Probe nach diesen fünf Zyklen nahm über den betrachteten Messzeitraum nicht mehr ab. Nach dem fünften Reinigungsschritt konnte für $t \rightarrow \infty$ durchschnittlich ein γ_e von $46,6 \pm 1,1$ mN/m ermittelt werden, siehe purifiziertes Squalen ($Sqe^{p:}$) in der zweiten Zeile (Probe II) der Tabelle 17, was dem theoretisch berechneten Wert nach dem vollständigen Datensatz des Marmor und Valal Ansatzes entspricht. Die Änderungsrate der Grenzflächenspannung betrug demnach nur noch $\Delta\gamma/\Delta t = 0,35 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$ und nicht wie vor der Purifizierung $3,45 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$ (siehe Tabelle 17). Eine GC-Analyse vor und nach dem fünften Reinigungsschritt ergab eine Effizienz der Aufreinigung von etwa 60%, da die Fläche der unbekanntes Spezies, die bei einer Retentionszeit um Minute 14 detektiert wurde, von 0,81% auf 0,32% verringert werden konnte (siehe Abbildung A-4.1).

Tabelle 17: Überblick über die Grenzflächenspannungen verschiedener Öle an der Grenzfläche zu Wasser und deren Lagerbedingungen [96]. Gemittelte Werte zum Beginn der Messung ($\gamma(0)$), nach 2.000 s ($\gamma(2000)$) und im Gleichgewicht (γ_e) für $t \rightarrow \infty$ sind mit entsprechender Standardabweichung für n unabhängige PAT-Experimente aufgeführt. Untersuchte Ölproben: nicht-purifiziertes Squalen ($Sqe^{n:p:}$), purifiziertes Squalen ($Sqe^{p:}$) sowie nicht-purifiziertes Squalan ($Sqa^{n:p:}$); Lagerung: Raumtemperatur (RT), Argonatmosphäre (Ar), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie Luft (O_2)

Öl	Bemerkung	$\gamma(0)$ [mN/m]	$\gamma(2000)$ [mN/m]	γ_e [mN/m]	n	$\Delta\gamma/\Delta t$ [$\mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$]
I	$Sqe^{n:p:}$	$23,9 \pm 0,7$	$17,0 \pm 0,8$	$15,3 \pm 1,1$	3	3,45
II	$Sqe^{p:}$	$47,4 \pm 1,3$	$46,7 \pm 0,8$	$46,6 \pm 1,1$	3	0,35
III	$Sqe^{p:} + \text{Ar} + \text{RT}$ (7 Tage)	$46,2 \pm 0,3$	$42,1 \pm 0,8$	$39,5 \pm 1,1$	2	2,65
IV	$Sqe^{p:} + \text{Ar} + 4^\circ\text{C}$ (16 Monate)	$47,2 \pm 1,6$	$39,5 \pm 1,2$	$36,7 \pm 0,9$	3	3,93
V	$Sqe^{p:} + 0,2\% H_2O_2$ (18 h)	$45,3 \pm 0,3$	$38,3 \pm 0,4$	$36,1 \pm 0,5$	2	4,55
VI	$Sqe^{p:} + 2\% H_2O_2$ (18 h)	$43,8 \pm 1,8$	$36,8 \pm 2,5$	$35,1 \pm 1,9$	2	5,30
VII	$Sqe^{p:} + O_2 + \text{RT}$ (21 Monate)	$7,4 \pm 0,01$	$5,9 \pm 0,03$	$5,5 \pm 0,05$	3	20,75
VIII	$Sqa^{n:p:}$	$46,1 \pm 1,7$	$44,6 \pm 1,8$	$44,2 \pm 1,5$	3	0,75

Um die Ursache bzw. die Herkunft der grenzflächenaktiven und ursprünglich vor der Aufreinigung vorhandenen Verunreinigungen zu klären, wurde aufgereinigtes Squalen verschiedenen Lagerbedingungen ausgesetzt und eine beabsichtigte Oxidation durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) herbeigeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind ebenfalls in Tabelle 17 (Proben III-VII) zusammengestellt. Eine Lagerung unter oxidationsverringenden Bedingungen durch Überschichtung des Squalens mit Argon

führte bei Raumtemperatur (RT) nach 7 Tagen zu einer durchschnittlichen Absinkrate von $\Delta\gamma/\Delta t = 2,65 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$ und einem γ_e von $39,5 \pm 1,1 \text{ mN}/\text{m}$ (Probe III in der Tabelle 17). Probe IV, die neben der Lagerung in dem reaktionsträgen Argon zusätzlich noch bei 4°C gekühlt wurde, zeigte nach 16 Monaten eine Absinkrate von $\Delta\gamma/\Delta t = 3,93 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$, welche mit der nicht-aufgereinigten Probe I verglichen werden kann. Der Äquilibriumswert für $t \rightarrow \infty$ konnte selbst nach dieser langen Lagerzeit unter den genannten oxidationsverringenden Bedingungen mit $\gamma_e = 36,7 \pm 0,9 \text{ mN}/\text{m}$ bestimmt werden und war somit immer noch knapp $20 \text{ mN}/\text{m}$ höher als der Äquilibriumswert der nicht-aufgereinigten Probe I mit $15,3 \pm 1,1 \text{ mN}/\text{m}$. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Lagerung des Öls unter Argonatmosphäre und gekühlten Temperaturen zu empfehlen ist, wenn es gilt die Zunahme von grenzflächenaktiven Komponenten nach einer Purifizierung zu verhindern bzw. zu minimieren. Da es sich bei Squalen um eine ungesättigte Verbindung mit sechs Doppelbindungen (=) handelt (siehe Abbildung 43), kann Squalen durch Anlagerung von Sauerstoffmolekülen oxidiert werden. Durch Inkubation von zuvor aufgereinigtem Squalen mit 0,2%-igem H_2O_2 (Probe V) bzw. 2%-igem H_2O_2 (Probe VI) wurde für 18 h eine beabsichtigte Oxidation initiiert, was sich in einer Reduzierung des Äquilibriumswertes auf $\gamma_e = 36,1 \pm 0,5 \text{ mN}/\text{m}$ bzw. $35,1 \pm 1,9 \text{ mN}/\text{m}$ äußerte. Gleichzeitig konnte gegenüber den Proben I-IV eine Zunahme der Absinkrate von $\Delta\gamma/\Delta t = 4,55 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$ bei Probe V bzw. $5,30 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$ bei Probe VI beobachtet werden. Diese Beobachtung ist auf eine Zunahme an grenzflächenaktiven Verunreinigungen durch Oxidation des Öls zurückzuführen. Eine weitere Probe von zuvor aufgereinigtem Squalen wurde unter Missachtung der oben genannten und empfohlenen Lagerbedingungen (RT und Argon-schutz) gelagert, siehe Probe VII in Tabelle 17. Wie zu erkennen, ist die ermittelte Grenzflächenspannung sowohl zu Beginn der Messung als auch nach 2.000 s deutlich herabgesetzt und zeigt mit $\gamma(0) = 7,4 \pm 0,01 \text{ mN}/\text{m}$ und $\gamma(2000) = 5,9 \pm 0,03 \text{ mN}/\text{m}$ signifikant kleinere Werte als vor der Aufreinigung mit Florisil®. Die Rate der Grenzflächenspannungsänderung für die Probe VII betrug $\Delta\gamma/\Delta t = 20,75 \mu\text{N}/\text{m}\cdot\text{s}$. Damit wird deutlich, dass in der nicht-aufgereinigten Probe bereits oxidative und vor allem grenzflächenaktive Substanzen vorhanden waren, die die Grenzflächenspannung erniedrigten, da man diese Tendenz durch die beabsichtigte Oxidation noch verstärken konnte. Durch diese Untersuchungen der verschiedenen Ölqualitäten, der Aufreinigung von Squalen sowie der gezielten Oxidation und Ana-

lyse der Lagerbedingungen konnten die grenzflächenaktiven Verunreinigungen durch Effekte, welche auf Oxidation zurückzuführen sind, beschrieben werden. Fernehrhin zeigte die Purifizierung mit Florisil® eine Elimination der oxidativen Verunreinigungen.

Zur genaueren Untersuchung der chemischen Zusammensetzung, der Struktur und den grenzflächenaktiven Komponenten von verschiedenen Ölqualitäten, wurden 1D ^1H - und ^{13}C -Spektren ermittelt (siehe 4.6.5.1). Abbildung 41 A zeigt die vier Hauptpeaks des Squalens und den des deuterierten Chloroforms (CDCl_3) einer frisch aufgereinigten Probe (rot; siehe Probe II in Tabelle 17) und einer nach der Aufreinigung 21 Monate gealterten und absichtlich unter Luftsauerstoff oxidierten Squalenprobe (schwarz; siehe Probe VII in Tabelle 17). Die Zuordnung der Peaks für die chemisch funktionellen $=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ (cis) and $-\text{CH}_3$ (trans)-Gruppen, sowie für CDCl_3 erfolgte durch einen Vergleich mit existierender Literatur [131, 132]. Die entsprechenden Spektren der beiden Proben zeigen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Öls. Der spektrale Bereich der Olefine und sauerstoffhaltigen Verbindungen (Ether, Alkohole, Ester) von 2,2-6,0 ppm ist in Abbildung 41 B vergrößert dargestellt und zeigt eine stärkere Präsenz dieser Gruppen in der gealterten Squalenprobe (schwarze Linie) gegenüber der frisch purifizierten Squalenprobe. Zusätzlich ist eine geringfügige Verschiebung in der Region der $=\text{CH}-$ Gruppen zu beobachten, die auf Veränderungen an den Doppelbindungen des Moleküls über die Lagerzeit von 21 Monate zurückzuführen ist, sofern keine oxidationsreduzierenden Maßnahmen (Argonatmosphäre und Kühlung bei 4°C) ergriffen wurden. Des Weiteren sind in der gealterten Probe neue Peaks erkennbar, die aufgrund von angebrachten Methylprotonen an den Kohlenstoff von Epoxidringen entstehen können, wie bereits von Naziri *et al.*, 2014 beschrieben [132]. Dieser Spektralbereich von 0,4-1,7 ppm, wo die Methylen (CH_2)- und terminalen Methylgruppen (CH_3) wiederzufinden sind, ist in Abbildung 41 C vergrößert dargestellt und zeigt prominente Unterschiede zwischen dem frisch aufgereinigten und gealterten Squalen.

Die ^{13}C -Spektren der vermessenen Squalenproben zeigten keine Unterschiede in ihren Intensitäten und Peakverläufen, was darauf schließen lässt, dass die Kohlenstoffverbindungen während der 21-monatigen Lagerung vollständig intakt geblieben ist und keine Brüche in den Ketten stattfanden.

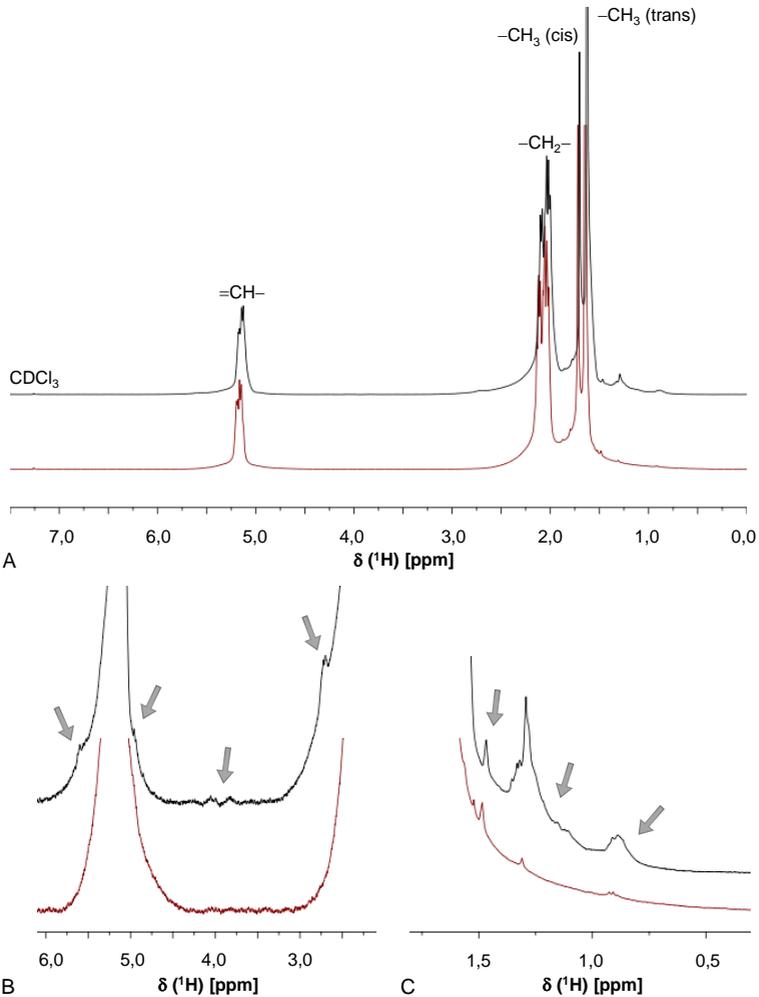


Abbildung 41: ^1H NMR Spektren von Squalen bei 400 MHz [96]. A – vier Hauptpeaks von Squalen und der des CDCl_3 der Proben I (rot) und VII (schwarz), siehe Tabelle 17. Vergrößerung der spektralen Regionen: B – Olefine und sauerstoffhaltige Verbindungen; C – CH_2 und CH_3 -Gruppen

Die Untersuchungen zu den Auswirkungen oxidativer Substanzen auf das adsorptive Verhalten der Phospholipide sind in 5.3.5.2 und 5.3.5.3 gezeigt und wurden vergleichend mit $\text{Sqe}^{\text{n.p.}}$ und $\text{Sqe}^{\text{p.}}$ durchgeführt.

5.3.5.2 Einfluss der Phospholipidsättigung und unterschiedlicher Ölphasen auf das Löslichkeits- und Adsorptionsverhalten an der Grenzfläche Wasser/Öl

Aus der Grenzflächenuntersuchung verschiedener Phospholipide in Squalen und Squalan wurden, wie bereits unter 5.3.2 erwähnt und in Tabelle 15 zusammengestellt, unterschiedliche Ergebnisse für die Adsorptionsisotherme im Äquilibrium, der minimalen molekularen Flächenbelegung und der Löslichkeitsgrenze erhalten. Diese Betrachtungen werden in diesem Abschnitt nun um die Ergebnisse im purifizierten Squalen erweitert und diskutiert. Wie in den Kapiteln 5.3.2 bis 5.3.4 ausführlich besprochen, erfolgten die Untersuchungen für den zu bevorzugenden Messaufbau eines Wassertropfens in Phospholipid-angereicherter Ölphase. Abbildung 42 zeigt den Verlauf der Gibbsschen Adsorptionsisotherme für POPC und DPPC jeweils im nicht-aufgereinigten sowie aufgereinigten Squalen. Die daraus berechneten Werte sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

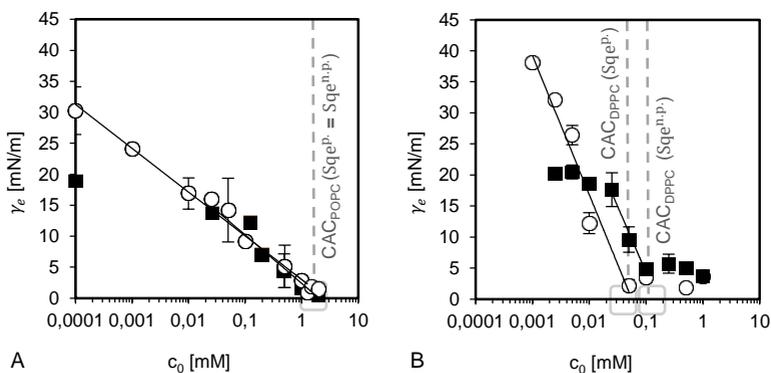


Abbildung 42: $\gamma_e - \log c_0$ -Kurve mit Gibbsscher Adsorptionsisotherme und gekennzeichnete CAC in (■) nicht-purifiziertem Squalen ($Sqe^{N.P.}$) und (○) purifiziertem Squalen ($Sqe^P.$) für: A – das ungesättigte Phospholipid POPC und B – das gesättigte Phospholipid DPPC [96]

Es wird bereits anhand der Abbildung 42 A deutlich, dass im Falle des ungesättigten POPCs keine prominenten Unterschiede in dem Adsorptionsverhalten resultieren, da sowohl die ermittelte CAC bei $\sim 1,26$ mM und die

molekulare Dichte von 119 bzw. 132 Å² etwa ähnliche Werte aufweisen. DPPC in Squalen verhält sich dagegen deutlich anders als POPC. Die molekulare Flächendichte ist in nicht-aufgereinigtem bzw. aufgereinigtem Squalen im Falle des gesättigten DPPCs mit 44 und 42 Å² etwa im gleichen Bereich, wohingegen sich die CAC um etwa den Faktor 2,3 unterscheidet (siehe Abbildung 42 B). So wird im Falle des nicht-aufgereinigten Squalens etwa die 2,3-fache Menge an DPPC benötigt, um die gleiche Grenzflächenaktivität zu erzielen, wie für DPPC in aufgereinigtem Squalen.

Tabelle 18: Vergleich der Ergebnisse der Grenzflächenspannungsuntersuchung für das ungesättigte Phospholipid POPC und das gesättigte Phospholipid DPPC jeweils im nicht-aufgereinigten (-) und aufgereinigten (+) Squalen [96]

Phospholipid	Purifizierung mit Florisil®	A [Å ²]	CAC [mM]
POPC	-	119	1,259
	+	132	1,256
DPPC	-	44	0,103
	+	42	0,045

Da POPC und DPPC identische hydrophile Kopfgruppen besitzen und sich ausschließlich in einer ihrer beiden Fettsäureketten unterscheiden, können die gefundenen Unterschiede lediglich auf die C=C Doppelbindung an der Oleoylkette des POPC-Moleküls zurückgeführt werden. Da die Löslichkeit von POPC im Vergleich zu DPPC um den Faktor 12,2 im nicht-aufgereinigten bzw. 27,9 im aufgereinigten Squalen erhöht ist, wurde geschlussfolgert, dass anziehende Interaktionen zwischen POPC und dem Öl höher sein müssen als bei DPPC. Gleichzeitig gehen die erhöhten Interaktionen zwischen dem ungesättigten Phospholipid und Squalen mit einer 3-fach größeren benötigten Fläche einher, also einer 3-fach geringeren Flächendichte an der Grenzfläche als bei DPPC.

5.3.5.3 Interaktionen zwischen Phospholipiden und organischer Phase und deren Einfluss auf die Löslichkeit und das Adsorptionsverhalten an der Grenzfläche Wasser/Öl

Die zuvor beschriebenen Interaktionen zwischen den Doppelbindungen des ungesättigten Phospholipids und den Doppelbindungen des ungesättigten Öls Squalen, sind in Abbildung 43 schematisch dargestellt und verdeutlichen den beschriebenen Effekt der π - π -Interaktionen [96], auf welchen im Abschnitt 5.3.5.4 noch näher eingegangen werden soll.

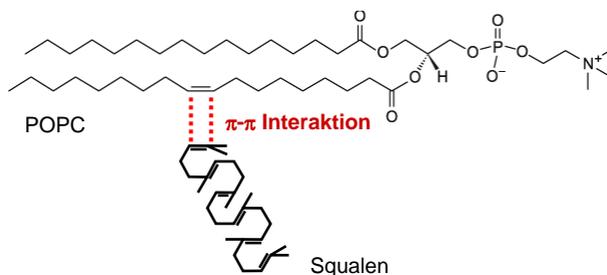


Abbildung 43: Schematische Darstellung der π - π -Interaktionen zwischen dem ungesättigten Phospholipid POPC und dem ungesättigten Squalen [96]

Um die Hypothese über die π - π -Interaktionen allgemeingültiger beschreiben zu können bzw. andere mögliche Effekte, wie dynamische Eigenschaften der Nicht-Sättigung [133, 134] und der sterischen Abstoßung durch entropische oder enthalpische Effekte [135] ausschließen oder quantitativ abgrenzen zu können, wurden gleiche Untersuchungen auch in dem gesättigten Öl Squalan durchgeführt.

Die Adsorptionsisotherme nach Gibbs ist für POPC, DPPC und dem nur 14-C-Atome kurzen Phospholipid DMPC in Abbildung 44 gezeigt und die daraus ermittelten Werte in Tabelle 19 zusammengestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Steigungen dieser Kurven alle identisch sind und die Phospholipide somit durchschnittlich eine minimale Fläche von $\sim 25 \text{ \AA}^2$ pro Molekül aufweisen.

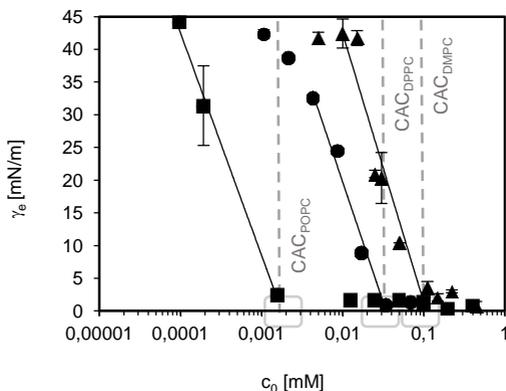


Abbildung 44: $\gamma_e - \log c_0$ -Kurve mit Gibbsscher Adsorptionsisotherme und gekennzeichnete CAC für: (■) POPC; (●) DPPC und (▲) DMPC in Squalan [96]

Wie in Abbildung 44 deutlich wird, unterscheiden sich nur die erreichten CACs voneinander. Hervorzuheben ist dabei, dass die Phospholipide in Squalan alle eine sehr viel geringere Löslichkeit aufweisen als im ungesättigten Squalan und diese Löslichkeit nur mit abnehmender Kettenlänge leicht zunimmt. DPPC hat im Vergleich zu POPC eine 18,9-fach höhere Löslichkeit. DMPC ist im Vergleich zu DPPC nochmals um den Faktor 2,8 löslicher und vergleichend zu POPC 53,4-fach mehr löslich. POPC in Squalan hat im Vergleich zu Squalan eine 740-fach geringere Löslichkeit (siehe Tabelle 18), was hier mit dem Nichtvorhandensein der π - π -Interaktionen korreliert. Die Löslichkeit von DPPC in Squalan ist, je nach Reinheitsgrad, nur um den Faktor 1,4 bzw. 3,2 geringer als in Squalan, was dafür spricht, dass die Doppelbindungen in der Oleoylkette von POPC entscheidend für die Interaktion mit dem ungesättigten Squalan sein muss.

Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse der Grenzflächenspannungsuntersuchung eines ungesättigten Phospholipids (POPC) und zwei gesättigter Phospholipide (DPPC und DMPC) in Squalan [96]

Phospholipid	A [\AA^2]	CAC [mM]
POPC	27	0,0017
DPPC	25	0,0322
DMPC	23	0,0907

(= Referenz für Abbildung 46)

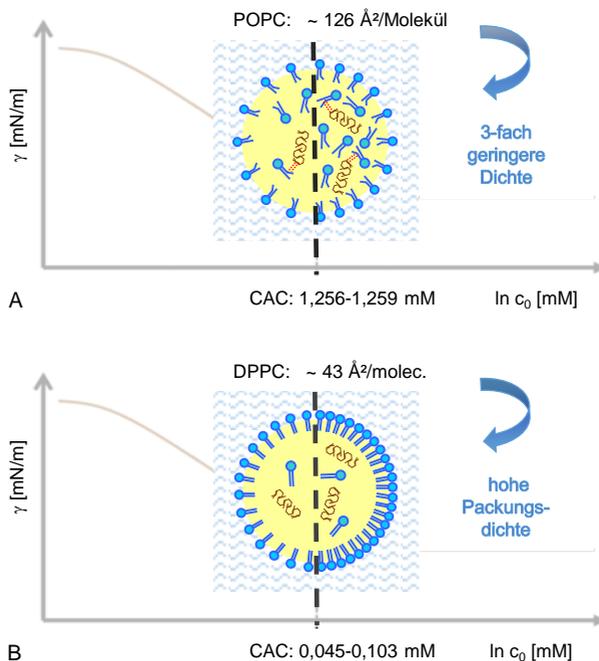


Abbildung 45: Schematische Darstellung eines Öltropfens mit adsorbierten und gelösten Phospholipiden vor (linke Seite des Modelltropfens) und nach (rechte Seite des Modelltropfens) Erreichen der CAC [96]. A – POPC mit expandierter Monoschicht durch die π - π -Interaktionen an den C=C Doppelbindungen; B – DPPC mit kondensierter Monoschicht aufgrund schwächerer Interaktionen der P=O und C=O π -Bindungen

Die Auswirkungen der π - π -Interaktionen auf die Löslichkeit und molekulare Flächendichte sind am Beispiel eines Squalentropfens vor und nach Erreichen der CAC für den Fall des ungesättigten POPCs in Abbildung 45 A und für den Fall des gesättigten DPPCs in Abbildung 45 B schematisch dargestellt. Diese Illustration soll veranschaulichen, wie das Verhalten der amphiphilen Moleküle sowohl in Lösung als auch an der Grenzfläche durch die Interaktion mit dem Lösemittel sein kann.

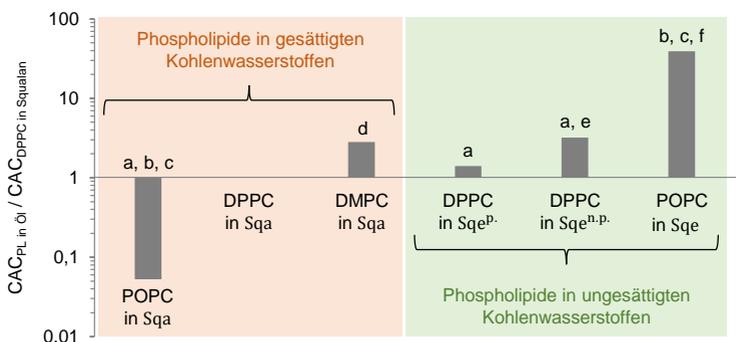


Abbildung 46: Löslichkeiten von gesättigten und ungesättigten Phospholipiden (PL) in verschiedenen gesättigten Ölen in Relation zu der CAC von DPPC in Squalan [96]. Bei den ungesättigten Ölen wird zwischen nicht-purifiziertem Squalan (Sqa^{n,p}) und purifiziertem Squalan (Sqa^e) unterschieden.

Potenzielle Effekte zur Löslichkeitsvermittlung sind folgendermaßen gekennzeichnet: a) sterische Abstoßung; b) dynamische Eigenschaften der Nicht-Sättigung; c) Interaktion der π -Bindungen zwischen den Fettsäureketten der ungesättigten PL, d) entropische undenthalpische Energiezunahme durch kürzere Fettsäureketten; e) Solubilisierung durch oxidiertes, grenzflächenaktives Squalen; und f) π - π -Interaktionen zwischen Phospholipid und Öl

Die eingeführte Übersicht in Abbildung 46 soll zudem die verschiedenen Löslichkeitsgrenzen gesättigter und ungesättigter Phospholipide in jeweils gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen vergleichen und zu der mutmaßlich interaktionsfreien Stoffkombination DPPC in Squalan, die als Referenz herangezogen wird, in Bezug setzen [96]. Diese Anordnung ermöglicht es, den Einfluss verschiedener Effekte in Relation zueinander zu betrachten. Wie erkennbar ist, variiert die Löslichkeit von POPC am meisten und ist 39-fach höher als die Referenz in Squalan, jedoch um den Faktor 0,053 (also 19-fach) niedriger in Squalan. Dort sind die Effekte a) bis c) möglich. Effekt a) stellt die repulsiven Kräfte dar, welche zwischen Lösungsmittel und der gelösten Substanz wirken können und in Wasser bereits beschrieben wurden [135]. Die hypothetisch mögliche Interaktion b) ist ein weiterer Effekt, der die Löslichkeit des ungesättigten Phospholipids mindern kann. Sie entsteht durch die dynamischen Eigenschaften zwischen den C–C und den Doppelbindungen in der molekularen Struktur des Moleküls, die eine hohe Flexibilität aufweisen (Torsionsverdrehung) und auch in Membranen eine Rolle spielen [134]. Ein weiterer Effekt c), der die Löslichkeit beeinflussen kann, sind die Interaktionen der C=C Doppelbindungen zwischen

den Phospholipidmolekülen untereinander. Leider ist es nicht möglich, zwischen den einzelnen wirkenden Effekten der ersten Spalte zu unterscheiden [96]. Der Unterschied zwischen DPPC und DMPC in der zweiten und dritten Spalte wird einer entropischen und enthalpischen Energiezunahme aufgrund der kürzeren Kohlenstoffkette bei DMPC zugeschrieben, hier definiert als Effekt d). Um die Löslichkeit der Phospholipide in dem ungesättigten Squalen zu erklären, kann ebenfalls Effekt a) herangezogen werden, da der geringere Ordnungszustand des Öls repulsive Kräfte auf die zu lösenden Moleküle ausübt. In der vierten und fünften Spalte wird jedoch auch deutlich, dass oxidiertes und grenzflächenaktives Squalen die Löslichkeit des ungesättigten Phospholipids erhöht [96], hier Effekt e). Der enorme Anstieg in der Löslichkeit von POPC in Squalen kann neben den genannten Effekten, wie der dynamischen Flexibilität und den eigenen Interaktionen von Doppelbindungen zwischen den POPC-Molekülen, noch von einem weiteren Effekt beeinflusst werden. Da die CAC von POPC am meisten variiert und in Squalen 39 mal höher als die Referenz, jedoch in Squalen 19-fach geringer ist als die von DPPC, zeigt dies, dass dieser Effekt von den π -Bindungen im ungesättigten Öl herrührt, welche die π -Bindungen des ungesättigten Phospholipids anziehen. Für den enormen Anstieg der Löslichkeit von POPC in Squalen um bis das 740-fache in Squalen, kann also zum überwiegenden Teil den π - π -Interaktionen zugeordnet werden.

5.3.5.4 Übertragung der Ergebnisse auf die Humanphysiologie und Stabilität von Emulsionen

Wie eingangs erwähnt, sind für ölige Verbindungen, die für medizinische Anwendungen eingesetzt werden, umfassende Beschreibungen zu den Grenzflächeneigenschaften und den Adsorptionsmechanismen von Phospholipiden während des Emulgiervorganges selten in der Literatur zu finden. Im Allgemeinen sind die Grenzflächenspannung und der Filmdruck von Monoschichten an Wasser/Öl-Grenzflächen, welche aus physiologisch relevanten Lipiden zusammengesetzt sind, ein Kernthema im Fettstoffwechsel des menschlichen Körpers. In Lipoproteinen und Chylomikronen emulgierten Phospholipide und Cholesterin meistens Triglyceride und Cholesterinester, wie beispielhaft für ein Lipoprotein in Abbildung 47 A illustriert. Diese natürlichen Mischungen sind, um molekulare Wechselwirkungen aufzuklären, oft zu komplex, weshalb für erste Betrachtungen gerne Modellsubstanzen zum Verständnis einiger grundlegender Eigenschaften von

Phospholipid-Emulsionen, speziell den Liposomen, herangezogen werden. Die erzielten Ergebnisse mit Squalen und Squalan, welche aufgrund ihrer chemischen Einfachheit als Modellsubstanz von Triglyceriden angesehen werden können, offenbaren spezifische Wechselwirkungen zwischen den Phospholipiden und den gesättigten bzw. den ungesättigten Fettsäuren, die wiederum auf den hydrophoben Kern aus Triglyceriden in Lipoproteinen übertragen werden können.

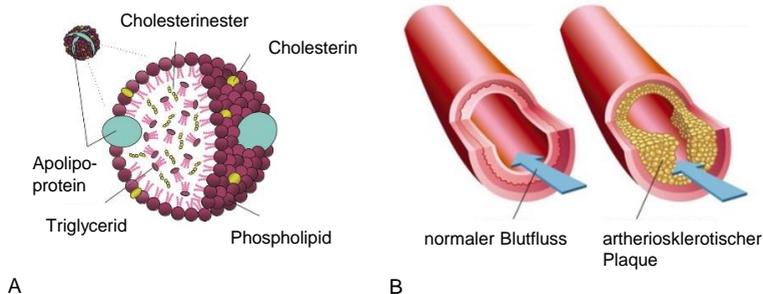


Abbildung 47: A – Aufbau eines Lipoproteins [136]; B – gesunde Vene (links); pathologischen Konsequenz destabilisierter Lipoproteine (rechts) [137]

Wie unter 5.3.5.1 beschrieben, verringern Oxidationsprodukte im Squalen die Grenzflächenspannung. Diese Oxidationsprodukte können jedoch in Anwesenheit einer bestimmten Konzentration an PL verdrängt werden. Allerdings wurde unter 5.3.5.2 auch dargestellt, dass die CAC und somit Löslichkeit von gesättigten Phospholipiden in Anwesenheit dieser Oxidationsprodukte, um den Faktor 2,3 gegenüber hochreinem Squalen, erhöht ist. Überträgt man dieses Wissen auf die Oxidation von Triglyceriden in Lipoproteinen, kann eine erhöhte Löslichkeit von gesättigten Phospholipiden, welche u.a. die Hülle der Lipoproteine ausbilden und somit eigentlich die Grenzschicht dieser komplexen Fetttröpfchen darstellen, genau diese Grenzschicht destabilisieren und die Koaleszenz solcher Lipoproteine begünstigen. Dies hat aus pathologischer Sicht zur Folge, dass sich an den Wänden von Blutgefäßen arteriosklerotische Plaques ausbilden können (siehe Abbildung 47 B), die zu Entzündungen sowie im Endstadium zu Arteriosklerose führen können [138].

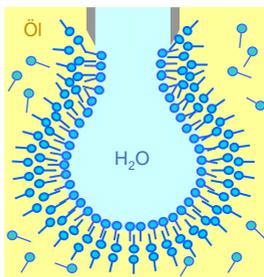


Abbildung 48: Darstellung von Phospholipid-Multischichten [96] in Korrelation zu den hohen detektierten Grenzflächenspannungen in Squalan (Tabelle 19)

Die Ergebnisse zeigten des Weiteren, dass auch die Dichte und Ausdehnung der adsorbierten Phospholipidschichten stark von der Sättigung – zum einen der Phospholipide selbst und zum anderen von der Sättigung der organischen Volumenphase – abhängig ist. Wie am Beispiel von Squalan dargestellt werden konnte, formen Phospholipide, in vollständig gesättigten Kohlenwasserstoffen als Volumenphase, Multischichten mit sehr hoher Grenzflächendichte. Dies ist schematisch anhand des Wassertropfens in Abbildung 48 gezeigt. Wie bereits 1981 von Rydhag und Wilton beschrieben wurde [139], können O/W-Emulsionen ab einer Schichtdicke der Grenzfläche von ca. 80 \AA^2 stabil erzeugt werden. Diese molekulare Dimension korreliert mit der Schichtdicke zweier Doppelschichten, woraus geschlossen werden kann, dass auch die Bildung von Multischichten, wie im Fall von Squalan ermittelt, ein Vorteil in der Herstellung von stabilen Emulsionen sein kann.

5.3.6 Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen

Wie unter 2.3.2 beschrieben, wurde bei der Einkapselung von Mistellektin in Liposomen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Lipiden (DOPC, DPPC ohne bzw. mit Cholesterin) beobachtet, dass bei einem höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren Agglomeration und Deformierung der Partikel auftritt. Diese Beobachtung wurde auf mögliche Interaktionen zwischen den Phospholipiden und Proteinen zurückgeführt.

Da Hinweise zum Adsorptionsverhalten von Proteinen und deren mögliche Interaktion mit Phospholipiden hilfreich sein können, um die Verkapselung

von pharmazeutischen Proteinlösungen mit hoher Einkapselungseffizienz realisieren zu können, wurden des Weiteren Untersuchungen mittels Tensiometrie als sinnvoll erachtet. Ein weiteres Argument für die Notwendigkeit einer detaillierten Untersuchung dieser Interaktionen kann mit dem Ziel, möglichst lang zirkulierende Liposomen herzustellen, begründet werden. Proteine, welche kompetitiv mit den Phospholipiden an die Grenzfläche adsorbieren würden und somit Bestandteil der Phospholipid-Doppelschicht sein können, wären schnelle und leichte Ziele z.B. für die Makrophagen der Immunabwehr des Körpers.

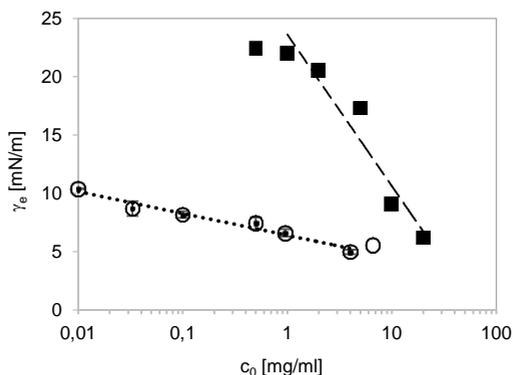


Abbildung 49: $\gamma - \log c_0$ -Kurve mit Gibbsscher Adsorptionsisotherme für: (○) Albumin und (■) Gesamtproteine aus Mistelsaft (abnobaVISCUM Pini) vermessen gegen Squalen ohne Zugabe von reinen Phospholipiden

Für diese Messungen wurde die an das Öl grenzende Wasserphase durch eine pharmazeutisch relevante Wirkstofflösung substituiert und Mistelextrakt vom Wirtsbaum Kiefer (abnobaVISCUM® Pini) vermessen. Zum Vergleich wurde zusätzlich das 66 kDa große Modellprotein Albumin tensiometrisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt und die ermittelten Daten in Tabelle 20 zusammengestellt. Wie zu erkennen ist, senkt Albumin die Oberflächenspannung auch in kleinen Konzentrationsbereichen deutlich stärker ab, als es die Proteinmischung des Mistelextraktes tut, wodurch auf eine höhere Grenzflächenaktivität von Albumin geschlossen werden kann. Zusätzlich konnte eine 3,6-fach niedrigere CAC ermittelt werden, was ausdrückt, dass weniger Proteinmoleküle notwendig sind, um die Grenzfläche zwischen Wasser und Öl vollständig zu besetzen. Gleichzeitig wurde aus der ermittelten Gibbsschen Adsorptionsisotherme für

Albumin eine molekulare Grenzflächenbelegung von 499 \AA^2 bestimmt. Im Fall des Mistelsaftes kann von einer bekannten Molekülgröße von 63 kDa für das vorkommende Mistellektin und von 5 kDa für die Viskotoxine ausgegangen werden kann. Hier gilt es jedoch darauf hinzuweisen, dass der verwendete Mistelsaft neben Lektinen und Viskotoxinen weitere nicht genauer quantifizierte Mengen an Proteinkomponenten aufweist, weswegen eine eindeutige Zuordnung der charakteristischen Grenzflächenaktivität gegenüber dem Modellprotein Albumin nicht vollständig bzw. eindeutig möglich ist. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der verwendeten Proteinlösungen hier auch in der $\gamma - \log c_0$ -Auftragung (Abbildung 49) nicht wie sonst üblich in Molar angegeben, sondern in Milligramm pro Milliliter.

Tabelle 20: Ergebnisse der Grenzflächenspannungsuntersuchung von Proteinlösungen gegen Squalen mit (+) und ohne (-) kompetitive Adsorption des Phospholipids POPC

POPC	Protein	$\Gamma_{max} \times 10^{-6}$ [mol/m ²]	A [\AA^2]	CAC [mol/l]
-	Mistelsaft	-	-	0,349
-	Albumin	0,333	499	0,098
+	Albumin	1,285	129	0,585
+	-	1,209 ^(*)	137 ^(*)	1,373 ^(*)

(*) Vergleich POPC in Squalen in

5.3.2 (siehe Tabelle 15, rechts): 1,394 119 1,259

Da Albumin die Grenzflächenspannung deutlich mehr beeinflusst und zudem auch nicht die oben genannte Schwierigkeit weiterer Komponenten aufweist, wurde dieses Protein für den Versuch zur kompetitiven Adsorption mit einem Phospholipid herangezogen. Des Weiteren konnte in dem Abschnitt 5.3.5.2 ausführlich beschrieben werden, dass im Falle der Adsorption des ungesättigten Phospholipids POPC die Qualität des Squalens keine Unterschiede bewirkte. Daher wurde dieser Versuch mit POPC in nicht-aufgereinigtem Squalen durchgeführt. Abbildung 50 zeigt das Ergebnis einer Vergleichsmessung von POPC in Squalen gegen einen Wassertropfen mit und ohne Albumin. Dazu wurde Albumin in einer Konzentration von 0,03 mg/ml (0,0005 mM) verwendet.

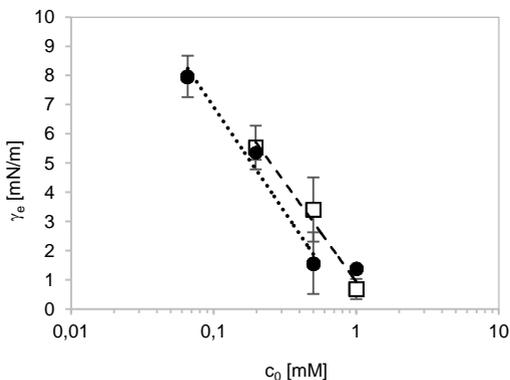


Abbildung 50: Gibbsche Adsorptionsisotherme der $\gamma - \log c_0$ -Kurve für POPC in Squalen gegen: (□) Wasser und (●) kompetitiv gegen eine Albuminlösung (0,0005 mM)

Wie durch diese Ergebnisse deutlich wird, unterscheiden sich die Anstiege der Adsorptionsisothermen und somit die ermittelten Flächendichten in beiden Fällen kaum voneinander. Die berechneten Werte sind ebenfalls in Tabelle 20 in den unteren beiden Zeilen aufgeführt. Ein Vergleich zu den bereits in Kapitel 5 dargestellten Daten soll die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Bezug auf einen weiteren unabhängigen Versuch verdeutlichen. Die Fläche, welche POPC nach Adsorption an die Squalen/Wasser-Grenzfläche einnimmt, konnte mit $128 \pm 9 \text{ \AA}^2$ pro Molekül ermittelt werden und stellt somit einen Abweichung von 7% dar. Somit lag die ermittelte Flächendichte von POPC bei der zusätzlichen Anwesenheit des Proteins Albumin im Bereich messbedingter Schwankungen und kann als gleich angesehen werden. Die gemittelte CAC für beide Versuche konnte mit $1,316 \pm 0,057 \text{ mM}$ angegeben werden oder allgemein ausgedrückt mit einem Fehler von etwa 4%. In Anwesenheit von Albumin wurde eine 2,3-fach niedrigere kritische Aggregationskonzentration ermittelt, was bedeutet, dass trotz etwa gleicher molekularer Flächendichte der adsorbierten Phospholipidschicht ungefähr 2,3 mal weniger Lipid nötig ist, um die vollständige Flächenbelegung zu erreichen. Dies lässt darauf schließen, dass größere Moleküle, wie Albumin, vermutlich Teil der Monoschicht geworden sind und Phospholipide kompetitiv verdrängen.

5.4 Proliferationsuntersuchung muriner Tumorzellen

Nach erfolgreicher Etablierung des Proliferationstests (MTS-Assay) für die Durchführung von 48-stündigen Inkubationsversuchen, wurden alle nachfolgend beschriebenen Ergebnisse jeweils mit einer Anzahl von 2.000 Zellen pro Versuchsansatz ermittelt (siehe Untersuchung zur genauen Zellzahlbestimmung unter 4.8.4.1).

5.4.1 Inkubation mit Mistelpräparaten abnobaVISCUM®

Für die Untersuchungen zur Inhibierung der Zellproliferation durch die Inkubation von Mistellektin (ML)-haltigen Präparaten auf murinen Tumorzellen, wurden drei verschiedene aV-Zubereitungen zu je 20 mg Gesamtpflanzenextrakts ausgewählt. Die Extrakte unterscheiden sich sowohl in ihrem ML- und Viskotoxin (VT)-Gehalt, als auch in ihrer ML-Zusammensetzung. Während aV Fraxini und aV Quercus mittlere bis hohe Konzentrationen und hauptsächlich die Isoform ML I aufweisen, ist der ML- und VT-Gehalt des aV Pini Präparats sehr niedrig konzentriert und überwiegend von der ML-Isoform III dominiert. Eine Übersicht über die entsprechenden Konzentrationen und die ML-Zusammensetzung der verwendeten Präparate ist in Tabelle 21 tabellarisch zusammen gestellt.

Tabelle 21: Übersicht über die getesteten aV Präparat-Chargen, deren ermittelte ML- und VT-Konzentration und überwiegende Lektin Isoform [140]

Charge (20 mg)	Wirtsbaum	ML [$\mu\text{g/ml}$]	VT [$\mu\text{g/ml}$]	Lektin-Isoform
aV Fraxini – 404 A25	Esche	10,9	79,9	ML I
aV Quercus – 405 A26	Eiche	8,4	66,4	ML I
aV Pini – 405 E31	Kiefer	0,27	1,2	ML III

Das Ziel dieser Studie war die proliferationshemmende Wirkung der verschiedenen aV Präparate zu untersuchen. Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der getesteten Substanzen wurde die Anzahl der lebensfähigen (proliferierenden) Zellen nach einer 48 h Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz ermittelt. Über die Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven konnte die entsprechende inhibitorische Konzentration (IC_{50}), wie unter 4.8.4 ausführlich beschrieben, bestimmt werden. Diese sind in Tabelle 22

zu finden. Des Weiteren sind exemplarisch für die B16-F10 Zellen die erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven in Abbildung 51 dargestellt. Die Kurven repräsentieren jeweils drei unabhängige Experimente und zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Viabilität (d.h. Zellproliferation) von jeweils vier Ansätzen pro Versuchsdurchlauf. Im linken Diagramm (Abbildung 51 A) ist der sigmoidale Kurvenverlauf der Proliferation, auf das Trockengewicht (TG) des Gesamtpflanzenextrakts von 20 mg bezogen, dargestellt.

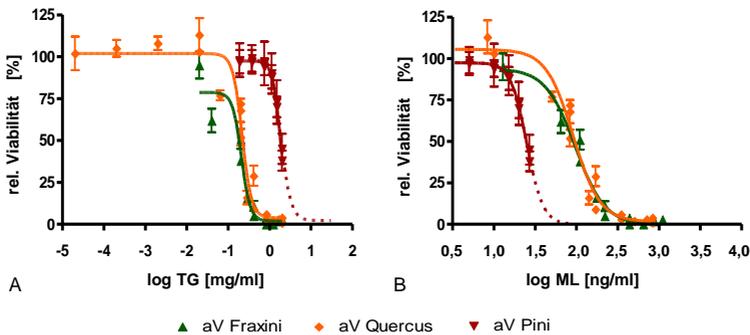


Abbildung 51: Relative Viabilität der B16 -F10 Zellen nach 48h Inkubation mit aV (20 mg) [140]. Logarithmische Darstellung: A – im Bezug zum eingesetzten Trockengewicht (TG) des Gesamtpflanzenextrakts in mg/ml; B – bezogen auf die tatsächliche ML-Konzentration in ng/ml (Tabelle 21)

Das Ergebnis der TG-basierten Auswertung für die Melanomzellen zeigt eine 20-fach niedrigere IC_{50} für aV Fraxini und aV Quercus im Vergleich zu dem dritten getesteten Präparat aV Pini (siehe Tabelle 22). Da diese beiden Präparate eine höhere ML- und VT-Konzentrationen als aV Pini aufweisen, war eine hohe zytotoxische Wirkung zu erwarten. In Abbildung 51 B sind die gleichen Proliferationsergebnisse bezogen auf die tatsächliche ML-Konzentration (siehe dazu Tabelle 21) des jeweiligen aV Präparates aufgetra-

gen. Bei dieser Betrachtung wurde die halbmaximale Proliferationsinhibierung bei einer fast 4-fach niedrigeren Konzentration von aV Pini beobachtet als im Vergleich durch aV Fraxini und aV Quercus. Obwohl das Präparat vom Kieferwirtsbaum die geringste Konzentration an ML aufweist, zeigte es dennoch den potentiell höchsten inhibitorischen Effekt auf dem untersuchten Zelltyp. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf die Wirkweise der verschiedenen Lektin-Isoformen und kann auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Präparate zurückgeführt werden. Das überwiegend ML III-dominierte Präparat aV Pini zeigt eine höhere proliferationshemmende Wirkung auf den murinen Tumorzellen als die Präparate, die vornehmlich ML I angereichert sind.

Das gleiche Experiment wurde auch für die Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 durchgeführt und führte zu einem ähnlichen Trend des Ergebnisses. Hier lieferte aV Pini bis zu 5-fach niedrigere IC_{50} -Werte als die anderen getesteten Präparate (siehe Tabelle 22), was für eine stärkere inhibitorische Wirkung des ML III-dominierten Präparates auch auf diesem Zelltyp spricht.

Tabelle 22: IC_{50} -Werte für die getesteten aV Präparate bezogen auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bzw. der ML-Konzentration [140] für ≥ 2 unabhängige Versuche

Zelllinie	Bezug	aV Fraxini	aV Quercus	aV Pini
B16-F10	TG [mg/ml]	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1
	ML [ng/ml]	98,9 ± 2,4	95,2 ± 17,4	25,2 ± 0,9
RAW264.7	TG [mg/ml]	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2
	ML [ng/ml]	114,9 ± 16,6	107,7 ± 19,9	23,4 ± 1,7

Ein Vergleich zwischen den beiden Zelllinien wies für alle getesteten Präparate jeweils ähnliche Werte des IC_{50} auf. Bei aV Fraxini und aV Quercus ist der IC_{50} -Wert der Melanomzellen um einen Faktor von 1,2 bzw. 1,1 niedriger als der, der Makrophagen. Für das Präparat aV Pini ist der IC_{50} -Wert der Makrophagen um einen Faktor von 1,1 gegenüber den Melanomzellen abgesenkt. Diese Abweichungen konnten keinem molekularbiologischen Effekt zugeordnet werden und wurden Messungenauigkeiten zugeschrieben.

5.4.2 Inkubation mit isoliertem Mistellektin I

Das Ziel dieser Studie war die proliferationshemmende Wirkung des isolierten ML I zu untersuchen und eine möglichst sensitive Tumorzelllinie für weitere *in vivo* Versuche zu identifizieren. Die in Abbildung 52 präsentierten Kurven wurden von zwei unabhängigen Experimenten sowie zwei unabhängig extrahierten Chargen von ML I erstellt und zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung (Fehlerbalken) der relativen Viabilität von jeweils vier gemessenen Ansätzen pro Versuch. Die IC_{50} -Werte wurden wiederum aus den sigmoidalen Kurvenverläufen, wie in Abschnitt 4.8.4 ausführlich beschrieben, ermittelt und in Tabelle 23 für alle untersuchten Zelltypen zusammengestellt. Isoliertes und aktives ML III stand für diese Untersuchung nicht zur Verfügung.

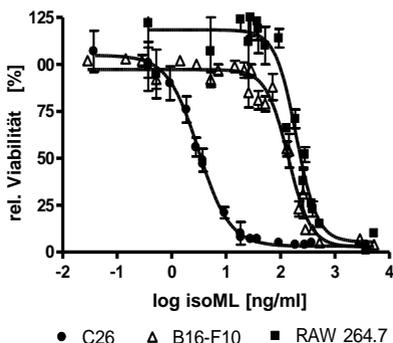


Abbildung 52: Effekt der proliferationshemmenden Wirkung von isoliertem ML I auf drei untersuchten murinen Zelllinien [140]

Im Vergleich zu den Melanomzellen B16-F10 und den Makrophagen RAW264.7, zeigte die Kolonkarzinomzelllinie C26 mit $3,4 \pm 0,3$ ng/ml etwa 45 bis 56-fach geringere inhibitorische Konzentrationen. Die Untersuchung des ML-Extrakts aus der Esche zeigte somit, dass die C26 Zellen am empfindlichsten auf den proliferationshemmenden Stimulus reagierten, weshalb die murinen Dickdarmtumorzellen als möglicher Kandidat für die weiterführenden *in vivo* Versuche ausgewählt wurden.

Ein Vergleich der ermittelten inhibitorischen Konzentration zwischen den Zelltypen B16-F10 und RAW264.7 ergab einen Unterschied um den Faktor 1,2. Wie auch schon bei dem Vergleich der aV Präparate Fraxini und Quercus wurde dieses Ergebnis auf keinen signifikanten biologischen Effekt, sondern auf messbedingte Schwankungen zurückgeführt.

Tabelle 23: Übersicht über die gestesteten Zelllinien und die ermittelten inhibitorischen Konzentration für isoliertes ML I für ≥ 2 unabhängige Versuche

Zelllinie	B16-F10	RAW264.7	C26
IC ₅₀ -Wert ML I [ng/ml]	151,8 ± 14,0	188,9 ± 44,9	3,4 ± 0,3

Die vergleichsweise hohen IC₅₀-Werte der Makrophagen RAW264.7 deuten auf eine geringere Sensitivität dieser Zellen gegenüber der proliferationshemmenden Wirkung des isolierten ML I hin. Da Makrophagen zum zellulären Immunsystem gehören und eine zentrale Rolle bei der Initiation und Regulation von Abwehrreaktionen haben, kann dieser Zelltyp als Entzündungsmodell betrachtet werden. Dass die Inhibierung der Makrophagen so gering ausfällt (siehe Tabelle 23), könnte möglicherweise eine Anpassung von therapeutischen Konzentrationen auf einen Bereich ermöglichen, der zwar zytotoxisch für die Tumorzellen ist, die Immunzellen aber nicht hemmt oder tötet.

6 Schlussfolgerungen

Nachfolgend werden die erreichten Ziele der einzelnen Aufgabengebiete zusammenfassend erörtert:

- i. *Erzeugung von Nanoemulsionen stabilisiert mit Hilfe von Phospholipiden und daraus abgeleitet die Herstellung von Liposomen im Zentrifugalfeld*

Die Untersuchungen zur Liposomenherstellung aus Emulsionen ergaben, dass die erzielten Partikelgrößen in der wässrigen Phase nach der Zentrifugation durchschnittlich kleiner waren, als die zugrunde liegenden Tropfengrößen der W/O-Emulsion. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die Wassertröpfchen mit ihrer Phospholipidmonoschicht bei dem Transfer durch die Phasengrenze nicht direkt von der zweiten Phospholipidschicht zwischen Öl und Wasser ummantelt wurden, sondern vorher zugunsten der vollständigen Phospholipidbelegung in kleinere Partikel aufbrachen. Diese Behauptung wird von den geringen Einkapselungseffizienzen, die gegenüber gängigen Literaturangaben zwar gesteigert werden konnten, aber mit ~ 26% verhältnismäßig gering ausfiel, gestützt und zeigte einen deutlichen Optimierungsbedarf dieser Methode auf. Fernerhin konnte mit Hilfe der Zeta-Potential-Messungen, die Werte im Bereich von etwa -20 ± 11 mV ergaben, ein Einblick in die sterische Stabilität der erzeugten Partikel gewonnen werden. Die Wassertropfen der W/O-Emulsionen waren mit ~ 600 nm, zur Herstellung von pharmazeutischen Nanokapseln mit angestrebten 200 nm, noch deutlich zu groß und, wie beschrieben, während des Phasentransfers nicht stabil. Für eine Optimierung des innovativen Verfahrens wird eine reproduzierbare und einstellbare Erzeugung von Emulsionen mit definierter Tropfengröße sowie möglichst homogener Tropfengrößenverteilung voraussetzt. Diese Anforderungen waren zum Teil noch nicht erfüllt, was die Erprobung des Zentrifugationsverfahrens zur Herstellung asymmetrischer

Liposomen erschwerte und den Fokus dieser Arbeit auf die Charakterisierung und Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Phospholipiden an Wasser/Öl-Grenzflächen verlagerte.

ii. *Charakterisierung der Grenzflächeneigenschaften verschiedener Phospholipide an der Phasengrenze zwischen Wasser und Öl*

Um die Phospholipide auf ihre Emulgierfähigkeit hin zu untersuchen, wurde die Tensiometrie als Methode der Wahl angewendet. Abhängig vom verwendeten Messaufbau wurden Unterschiede in den detektierten Adsorptionsisothermen, der ermittelten CAC und minimalen Fläche pro Lipidmolekül ermittelt. Diese Unterschiede wurden auf Verarmungseffekte zurückgeführt, die speziell dann dominierten, wenn das Tropfenvolumen als beschränktes Reservoir an Phospholipiden verwendet wurde. Diese Hypothese wurde durch Quantifizierung der Phosphatkonzentration in der Wasserphase, nach einer Inkubation von beiden (fast) nicht miteinander mischbaren Phasen für verschiedene Zeitpunkte, überprüft. Die Kinetik zeigte eine Zunahme von Phospholipiden in der wässrigen Phase, die als Nachweis für die Änderungen in der Volumenkonzentration herangezogen wurde. Dieser Befund war in Übereinstimmung mit der detektierten höheren CAC und der damit gewissermaßen „verzögerten“ Monoschichtbildung. Neben dem Verlust von Lipiden durch Adsorption an die Grenzfläche, welche für einen hängenden Tropfen annähernd berechnet werden kann, muss folglich zusätzlich die Löslichkeit von Phospholipiden in der wässrigen Phase berücksichtigt werden. Es kann daher der Schluss gezogen werden, dass die Phospholipidschicht, welche an die Grenzfläche zwischen organischer Phase und Wasser adsorbiert, als Ergebnis des Gleichgewichtszustandes zwischen den beiden nahezu nicht mischbaren Flüssigkeiten, in denen beide Flüssigkeiten als Lösungsmittel für die Phospholipide wirken, betrachtet werden kann. Unterschiede in der Fähigkeit, Phospholipide entweder in der wässrigen oder organischen Phase in gleicher Weise zu lösen, wurden diskutiert. Für den invertierten Messaufbau, welcher in dieser Arbeit zusätzlich untersucht wurde, war der Verlust an Phospholipiden aus der organischen Phase, aufgrund des 100-fach größeren Volumens als im Vergleich zum üblichen kleineren organischen Tropfen als Phospholipidreservoir, relativ gering. Folglich ist der umgekehrte Messaufbau eine geeignetere und genauere Methode, um Grenzflächenspannungen mit zuverlässigen Massenkonzentrationen

onen an gelöstem Phospholipid, CAC sowie minimaler Flächen pro Lipidmolekül zu bestimmen und wurde daher empfohlen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben der PAT zusätzliche analytische Messungen mit PCS und NMR nützlich sind, um einen tieferen Einblick und die Unterscheidung zwischen molekularer Löslichkeit und Mizellarer Dispersion von Phospholipiden in verschiedenen Medien zu erhalten.

Mittels der durchgeführten Untersuchungen zwischen den gesättigten und ungesättigten Phospholipiden in jeweils gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen, konnte ein Vergleich der verschiedenen, auf die Löslichkeit vermittelnd wirkenden, relativen Effekte aufgezeichnet werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass die π - π -Wechselwirkungen einen zusätzlich Effekt darstellen, der signifikant zu den großen detektierten Unterschieden in der Löslichkeit von ungesättigten Phospholipiden in gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen beiträgt sowie Auswirkungen auf die molekulare Flächendichte von Phospholipidschichten an flüssigen Phasengrenzen hat. Die CAC von POPC variierte, in Übereinstimmung mit der Hypothese, am stärksten und war in Squalen 39 mal höher und in Squalan 19-fach geringer als die CAC von DPPC in Squalan, die als „interaktionsfreie“ Referenz herangezogen wurde. Der Effekt der π - π -Interaktion zwischen dem Lösungsmittel und dem gelösten, ebenfalls Doppelbindungen enthaltenden Molekül, erweiterte das Spektrum wirkender Effekte, um eine für Phospholipide und ungesättigte Öle bisher noch nicht beschriebene Interaktion. Gleichzeitig konnte durch die gefundene erhöhte Löslichkeit gesättigter Phospholipide im Falle oxidierten Squalens auf ein für die Humanphysiologie interessantes Phänomen geschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oxidation von Triglyceriden im Inneren der Lipoproteine zu einer erhöhten Löslichkeit von gesättigten Phospholipiden führen kann, welche sonst die Hülle der Lipoproteine darstellen und stabilisieren. Diese erhöhte Löslichkeit kann wiederum einen Beitrag zur Erklärung der Destabilisierung von Lipoproteinen, insbesondere der „low density lipoproteins“ (LDL), leisten. In der medizinischen Diagnostik und in experimentellen *in vitro* Untersuchungen wird die Koaleszenz der LDL häufig beobachtet. Die initiale Instabilität der LDL kann terminal zur Bildung arteriosklerotischer Plaques führen. Eine zukünftige Berücksichtigung der beschriebenen π - π Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff kann zur Reduzierung von Diskrepanzen zwischen experimentellen tensiometrischen Daten und der molekularen Modellierung von Lipoproteinen führen.

Fernerhin könnten therapeutische oder ernährungsphysiologische Maßnahmen, die zu einer Minimierung der Grenzflächenspannung und dadurch zur kinetischen Stabilität von Lipoproteinen beitragen, unter der Berücksichtigung des beschriebenen Effektes der π - π -Interaktion erwogen werden. Die Ergebnisse unterstreichen die hohe Bedeutung ungesättigter Fettsäuren von Nahrungsfetten und der in der Nahrung enthaltenen Phospholipide in der Prävention arteriosklerotischer Plaques.

Des Weiteren wurde durch die Untersuchungen an den flüssigen Phasengrenzen und der daraus ermittelten minimalen Fläche pro Lipidmolekül herausgefunden, dass Phospholipide an der Squalan/Wasser-Grenzfläche Monoschichten unterschiedlicher Packungsdichte formen, während dessen sich an der Squalan/Wasser-Grenzfläche Multischichten ausbilden können. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass die unterschiedlichen Kombinationen der Sättigung von Lösungsmittel oder gelösten Stoffen die Bildung und Stabilität von Nanoemulsionen beeinflussen. Je nach Kombination können sowohl expandierte als auch kondensierte Monoschichten bzw. Multischichten hervorgerufen werden.

iii. Einblick zum Adsorptionsverhalten von Proteinen und Darstellung möglicher Interaktionen zu den Phospholipiden

Das Ergebnis zur möglichen Protein-Lipid-Wechselwirkungen von POPC mit BSA an der Squalan/Wasser-Grenzfläche lieferte ein erstes Verständnis über die mögliche Beeinflussung von Phospholipid-Monoschichten bei der gezielten Verkapselung von Proteinen und der Komplexität der Interaktionsmöglichkeiten für diesen realen Anwendungsfall. Diese Interaktionen systematisch zu untersuchen, stellt ein weiteres Aufgabengebiet dar, welches es gilt näher zu betrachten und worauf im Ausblick nochmals eingegangen werden soll.

iv. Aufklärung über die Wirkweise und -Spezifität von bestimmten pharmazeutisch relevanten Präparaten auf zellspezifischer Ebene.

Durch die Untersuchung der wachstumshemmenden bzw. zytotoxischen Wirkung verschiedener α V Präparate auf murinen Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass α V Fraxini, trotz der hohen Konzentration an Mistelin-

haltsstoffen wie Mistellektinen (ML) und Viskotoxinen nicht die stärkste konzentrationsbezogene inhibierende Wirkung aufweist. Wie auch aV Quercus, enthält aV Fraxini überwiegend die ML-Isoform I, welche in der Literatur als vornehmlich proliferationshemmend beschrieben ist [141]. Das Präparat av Pini hingegen, welches eine etwa 50-fach niedrigere ML-Konzentrationen aufweist, jedoch vorwiegend aus der Isoform ML III besteht, zeigte eine 4-fach höhere Inhibierung des Zellwachstums auf den Melanomzellen als auch auf den Makrophagen, als verglichen mit den beiden anderen Präparaten. Somit kann geschlussfolgert werden, dass dieses Ergebnis durch einen potenziell höheren Zytotoxizitätsgrad von ML III hervorgerufen werden kann, wie auch bereits von Dietrich *et al.* [65] und Kopp *et al.* [142] beschrieben wurde. Dennoch konnte auch für aV Fraxini und aV Quercus gezeigt werden, dass ML I eine bioaktive Wirkung aufweist. Demzufolge wurde für alle aV-Präparate gezeigt, dass sie als potentieller Wirkstoffe zur Verkapselung in Liposomen geeignet sind. Insgesamt konnte fernerhin für alle ML-Isoformen, die in Form der aV-Präparate zu jeweils unterschiedlichen Konzentrationen auf den jeweiligen murinen Zelllinien getestet wurden, eine anti-proliferierende Wirkung nachgewiesen werden, wie zuvor auf humanen Mammakarzinomzellen [143], humanen Kolontumoren [118] und humanen Melanomzellen [119] gezeigt wurde.

Um jedoch einen genau definierten Wirkstoff verkapseln zu können, ist isoliertes ML einem komplexen Präparat zu bevorzugen. Daher wurden auch Daten mit ML I, welches bisher erfolgreich isoliert werden konnte, erhoben. Die Ergebnisse der Studie mit dem isolierten ML I zeigten, dass die getestete Kolonkarzinomzelllinie C26 sehr viel empfindlicher auf das RIP-Protein vom Typ II reagierte, als die sehr aggressive B16-F10 Melanomzelllinie. In Bezug auf Tiermodelle würde uns dies erlauben eine empfindliche Tumorzelllinie mit einer vergleichsweise unempfindlichen, aber aggressiveren Tumorzelllinie zu vergleichen. Darüber hinaus sind die RAW264.7 Zellen, die als Entzündungsmodell betrachtet werden können, relativ unempfindlich gegenüber isoliertem ML I. Dieses Ergebnis deutet auf die Möglichkeit einer gezielten Therapie von z.B. Dickdarntumoren hin, bei der die Immunfunktionen intakt blieben.

7 Ausblick

Die mittels Tensiometrie gewonnenen Erkenntnisse über den Belegungszustand der Grenzfläche durch Phospholipide sowie die ermittelten Löslichkeiten bzw. der CAC in den jeweiligen organischen Phasen konnten in nachfolgenden Untersuchungen [144] auf die Optimierung des Emulgiervorganges übertragen werden. Zukünftig können optimierte W/O-Emulsionen in den Zentrifugationsprozess zur Herstellung nanoskaliger Arzneimitteltransportsysteme eingebracht werden. Ferner gilt es, geeignete Zentrifugationsbedingungen zu erproben, bei denen eine kontinuierliche Bereitstellung von Phospholipiden an der Phasengrenze zwischen Wasser und Öl sowie Einkapselungseffizienzen nahe 100% realisiert werden können. Dabei besteht die Herausforderung die Zentrifugationszeiten anhand der sich ergebenden Sedimentationsgeschwindigkeiten zu etablieren sowie die Beanspruchung der Partikel durch eine geeignete Wahl an Prozessparametern (Geschwindigkeit, Scherrate, etc.) möglichst gering zu halten. Die Verkapselung von proteinhaltigen Lösungen in Liposomen, mit geeigneten Formulierungsbedingungen in einem kontinuierlichen Verfahren, stellt dabei weiterhin die zielführende Intention dar.

Um die Bildung einer asymmetrischen Doppellipidschicht zur späteren Funktionalisierung der Liposomen nachweisen zu können, gilt es die möglichen Testverfahren für die Stoffkomponenten und Fluoreszenzfarbstoffe weiter zu entwickeln und auf die Auswahl an Phospholipiden und Wirkstoffe anzupassen. Die Einbettung weiterer Analysemethoden, wie der NMR zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz bzw. zur weiterführenden Untersuchung von Freisetzungsraten verkapselter Wirkstoffe, ist als durchaus sinnvoll zu erachten. Diese Methode bietet zudem das Potenzial Erkenntnisse über die Zirkulation der Liposomen, mit oder ohne eine spezielle Funktionalisierung der äußeren Lipidhülle, in einer gewählten Umgebung zu liefern.

Das Adsorptionsverhalten von Proteinen und die Aufklärung möglicher Interaktionen mit Phospholipiden wurden bisher noch nicht systematisch untersucht. Um die Verkapselung von pharmazeutischen Proteinlösungen in liposomale Formulierungen jedoch optimal zu realisieren, sollte dieses Thema in einem eigenständigen Projekt möglichst umfassend erarbeitet werden. Ein tieferes Verständnis über mögliche Interaktionen zwischen den Phospholipiden und Proteinen soll dabei helfen, die Wechselwirkungen sowie die Strukturbildung bzw. Agglomeration liposomaler Formulierungen sowie deren Stabilität in Blutkreislauf positiv zu beeinflussen.

Die technische Realisierung eines Messaufbaus bei dem die wässrige Phase, nach der Ausbildung des Gleichgewichtszustandes adsorbierter Phospholipide, mittels einer Doppelkapillare gegen eine proteinhaltige Wirkstofflösung ausgetauscht wird, stellt eine denkbare Herangehensweise dar, sich der Fragestellung zu den Protein-Phospholipid-Interaktionen zu nähern. Die Interaktionen näher zu charakterisieren, wäre ein weiteres lohnendes Ziel. Neben der Tensiometrie wäre der ELISA (engl. „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) als zusätzliche Methode einsetzbar, um die Interaktionen auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Mittels des antikörperbasierten Nachweisverfahrens könnte beispielsweise überprüft werden, in wie weit verkapselte Proteine auch Bestandteil der Phospholipidmembran sind und ggf. mit Bindungspartnern in der Umgebung, wie z.B. anwesenden Antikörpern des Testverfahrens, interagieren.

Um die *in vitro*-Ergebnisse besser bewerten und weitere zellspezifische Wirkungen einzelner Wirkstoffkandidaten identifizieren zu können, sind weitere Experimente sinnvoll. Zusätzlich zu den Untersuchungen mit isoliertem ML I empfiehlt es sich, eine vergleichende Studie mit aufgereinigtem ML III anzuschließen. Fernerhin werden Experimente mit weiteren Zelllinien anderer Tumormodelle sowie „gesunder“ Zellen angestrebt, um die immunregulatorischen Effekte und die Ausschüttung von Entzündungsfaktoren (Zytokine), wie den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ oder Interleukin-1 (IL-1) oder IL-6, näher zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Pautot, B.J. Frisken, D.A. Weitz, *Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion*. Langmuir, 2003, 19, 2870-2879
- [2] S. Pautot, B.J. Frisken, D.A. Weitz, *Engineering asymmetric vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100 (19), 10718-10721
- [3] S. Kutter, D.v. Richthofen, *Nanotechnik - Licht am Ende des Tunnels*. Wirtschafts Woche, 2010
- [4] S.H. van Rijt, T. Bein, S. Meiners, *Medical nanoparticles for next generation drug delivery to the lungs*. European Respiratory Journal, 2014, 44, 765-774
- [5] S.C. Semple, R. Leone, J. Wang, E.C. Leng, S.K. Klimuk, M.L. Eisenhardt, Z.-N. Yuan, K. Edwards, N. Maurer, M.J. Hope, P.R. Cullis, Q.-F. Ahkong, *Optimization and Characterization of a Sphingomyelin/Cholesterol Liposome Formulation of Vinorelbine with Promising Antitumor Activity*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 94 (5), 1024-1038
- [6] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. Journal of Colloid Science and Biotechnology, 2012, 1 (2), 147-168
- [7] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965, 13 (1), 238-252
- [8] T.M. Allen, P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, 65 (1), 36-48
- [9] S. Caldeira de Araújo Lopes, C.d.S. Giuberti, T.G.R. Rocha, D.d.S. Ferreira, E.A. Leite, M.C. Oliveira, *Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs*. Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches, inTech, Rijeka (Croatia), 2013
- [10] G. Gregoriadis, *Liposomes in Drug Delivery: How It All Happened*. Pharmaceutics, 2016, 8 (19), 1-5

- [11] R.L. Juliano, D. Stamp, *The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1975, 63 (3), 651-658
- [12] K.J. Hwang, M.M. Padki, D.D. Chow, H.E. Essien, J.Y. Lai, P.L. Beaumier, *Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1987, 901 (1), 88-96
- [13] G. Gregoriadis, B.E. Ryman, *Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases*. Biochemical Journal, 1971, 124 (5), 58P
- [14] G. Gregoriadis, *Drug entrapment in liposomes*. FEBS letters, 1973, 36 (3), 292-296
- [15] G. Gregoriadis *The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine*. New England Journal of Medicine, 1976, 295 (13), 704-710
- [16] A.C. Allison, G. Gregoriadis, *Liposomes as immunological adjuvants*. Nature, 1974, 252 (5480), 252-252
- [17] R.M. Straubinger, D. Papahadjopoulos, *Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids*. Methods in enzymology, 1983, 101, 512-527
- [18] A. Judge, K. McClintock, J.R. Phelps, I. Maclachlan, *Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2006, 13 (2), 328-337
- [19] H.K. Kimelberg, T.F. Tracy, S.M. Biddlecome, R.S. Bourke, *The Effect of Entrapment in Liposomes on the in Vivo Distribution of [3H]Methotrexate in a Primate*. Cancer Research, 1976, 36 (8), 2949-2957
- [20] L.G. Cleland, B.V. Roberts, R. Garrett, T.M. Allen, *Cortisol palmitate liposomes: Enhanced anti-inflammatory effect in rats compared with free cortisol*. Agents and Actions, 1982, 12 (3), 348-352
- [21] T. Kobayashi, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, *Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect of cytosine arabinoside entrapped in liposomes on mouse leukemia L-1210*. Gan, 1975, 66 (6), 719-720
- [22] E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Y.M. Rustum, C. Dave, *Inhibition of Tumor Cell Growth in Vitro and in Vivo by 1-β-d-Arabinofuranosylcytosine Entrapped within Phospholipid Vesicles*. Cancer Research, 1976, 36 (12), 4406-4411
- [23] S. Bibi, E. Lattmann, A.R. Mohammed, Y. Perrie, *Trigger release liposome systems: local and remote controlled delivery?* Journal of Microencapsulation, 2012, 29 (3), 262-276

- [24] N.L. Boman, L.D. Mayer, P.R. Cullis, *Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1993, 1152 (2), 253-258
- [25] G.J.R. Charrois, T.M. Allen, *Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2004, 1663 (1–2), 167-177
- [26] K.M. Laginha, S. Verwoert, G.J.R. Charrois, T.M. Allen, *Determination of Doxorubicin Levels in Whole Tumor and Tumor Nuclei in Murine Breast Cancer Tumors*. Clinical Cancer Research, 2005, 11 (19), 6944-6949
- [27] M.J.W. Johnston, S.C. Semple, S.K. Klimuk, K. Edwards, M.L. Eisenhardt, E.C. Leng, G. Karlsson, D. Yanko, P.R. Cullis, *Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2006, 1758 (1), 55-64
- [28] F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos, *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1979, 557 (1), 9-23
- [29] K. Raemdonck, K. Braeckmans, J. Demeester, S.C. De Smedt, *Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery*. Chemical Society Reviews, 2014, 43 (1), 444-472
- [30] A. Sharma, U.S. Sharma, *Liposomes in drug delivery: Progress and limitations*. International Journal of Pharmaceutics, 1997, 154 (2), 123-140
- [31] V. Manojlovic, K. Winkler, V. Bunjes, A. Neub, R. Schubert, B. Bugarski, G. Leneweit, *Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 64 (2), 284-296
- [32] S.M. Moghimi, I. Hamad, *Liposome-Mediated Triggering of Complement Cascade*. Journal of Liposome Research, 2008, 18 (3), 195-209
- [33] T. Ishida, K. Masuda, T. Ichikawa, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, *Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice*. International Journal of Pharmaceutics, 2003, 255 (1–2), 167-174
- [34] T. Ishida, H. Kiwada, *Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes*. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 354 (1–2), 56-62

- [35] A. Abuchowski, J.R. McCoy, N.C. Palczuk, T. van Es, F.F. Davis, *Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase*. Journal of Biological Chemistry, 1977, 252 (11), 3582-3586
- [36] T.M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, *Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1991, 1066 (1), 29-36
- [37] T.M. Allen, C. Hansen, *Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1991, 1068 (2), 133-141
- [38] L.M. Tsofina, E.A. Liberman, A.V. Babakov, *Production of Bimolecular Protein-Lipid Membranes in Aqueous Solution*. Nature, 1966, 212 (5063), 681-683
- [39] R. Pagano, T.E. Thompson, *Spherical lipid bilayer membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1967, 144 (3), 666-669
- [40] H. Träuble, E. Grell, *Carriers and specificity in membranes. IV. Model vesicles and membranes. The formation of asymmetrical spherical lecithin vesicles*. Neurosciences Research Program bulletin, 1971, 9 (3), 373-380
- [41] J. Whittenton, S. Harendra, R. Pitchumani, K. Mohanty, C. Vipulanandan, S. Thevananther, *Evaluation of Asymmetric Liposomal Nanoparticles for Encapsulation of Polynucleotides*. Langmuir, 2008, 24 (16), 8533-8540
- [42] G. Antonow, *Surface tension at the limit of two layers*. J. Chim. Phys, 1907, 5, 372-385
- [43] L.A. Girifalco, R.J. Good, *A Theory for the Estimation of Surface and Interfacial Energies. I. Derivation and Application to Interfacial Tension*. The Journal of Physical Chemistry, 1957, 61 (7), 904-909
- [44] D.Y. Kwok, A.W. Neumann, *Contact angle interpretation in terms of solid surface tension*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2000, 161 (1), 31-48
- [45] A. Marmur, D. Valal, *Correlating Interfacial Tensions with Surface Tensions: A Gibbsian Approach*. Langmuir, 2010, 26 (8), 5568-5575
- [46] H.J. Yun, Y.W. Choi, N.J. Kim, D.W. Sohn, *Physicochemical properties of phosphatidylcholine (PC) monolayers with different alkyl chains, at the air/water interface*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2003, 24 (3), 377-383
- [47] A. Pockels, *On the spreading of oil upon water*. Nature, 1894, 50, 223-224

- [48] A.W. Neumann, R.J. Good, *Techniques of Measuring Contact Angles*. Surface and Colloid Science: Volume 11: Experimental Methods, Springer US, Boston, MA, 1979
- [49] K. Köhler, H.P. Schuchmann, *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*, Behr's Verlag, Hamburg, 2012
- [50] I. Mukherjee, S.P. Moulik, A.K. Rakshit, *Tensiometric determination of Gibbs surface excess and micelle point: A critical revisit*. Journal of colloid and interface science, 2013, 394, 329-336
- [51] A. Pan, A.K. Rakshit, S.P. Moulik, *Dwelling on the adsorption of surfactant at the air/water interface in relation to its states in the bulk: A comprehensive analysis*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2015, 464, 8-16
- [52] S.P. Moulik, *Micelles: Self-organized surfactant assemblies*. Current Science, 1996, 71 (5), 368-376
- [53] D. Grandell, L. Murtomäki, *Surface Pressure Control of Phospholipid Monolayers at the Water/1,2-Dichloroethane Interface*. Langmuir, 1998, 14 (2), 556-559
- [54] J. Li, R. Miller, R. Wüstneck, H. Möhwald, A.W. Neumann, *Use of pendant drop technique as a film balance at liquid/liquid interfaces*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1995, 96 (3), 295-299
- [55] J. Li, V.B. Fainerman, R. Miller, *Adsorption Kinetics of Phospholipids at the Chloroform/Water Interface Studied by Drop Volume and Pendant Drop Techniques*. Langmuir, 1996, 12 (21), 5138-5142
- [56] Q. He, Y. Zhang, G. Lu, R. Miller, H. Möhwald, J. Li, *Dynamic adsorption and characterization of phospholipid and mixed phospholipid/protein layers at liquid/liquid interfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 2008, 140, 67-76
- [57] M.A. Mitsche, L. Wang, D.M. Small, *Adsorption of Egg Phosphatidylcholine to an Air/Water and Triolein/Water Bubble Interface: Use of the 2-Dimensional Phase Rule To Estimate the Surface composition of a Phospholipid/Triolein/Water Surface as a Function of Surface Pressure*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010, 114 (9), 3276-3284
- [58] K. Urech, G. Schaller, C. Jaggy, *Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (Viscum album L.) extracts Iscador*. Arzneimittel-Forschung, 2006, 56 (6a), 428-434
- [59] L. Barbieri, M.G. Battelli, F. Stirpe, *Ribosome-inactivating proteins from plants*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1993, 1154 (3-4), 237-282
- [60] F. Stirpe, *Ribosome-inactivating proteins*. Toxicon, 2004, 44 (4), 371-383

- [61] P. Luther, H. Becker, R. Leroi, G. Salle, R. Samtleben, *Die Mistel: Botanik, Lektine, medizinische Anwendung*, Springer, Berlin, 1987
- [62] W. Blaschek, J.-C. Gramann, B. Classen, *Lokalisierung der Mistellektine ML I-III in Viscum album L. durch Immunofluoreszenz- und Immunogold-Markierung*. Die Mistel in der Tumortherapie 3, KVC Verlag, 2013
- [63] F. Hiepe, *Die Mistel senkt den Blutdruck und beugt Arterienverkalkung vor*. Badische Zeitung, 2012
- [64] A. Meyer, W. Rypniewski, M. Szymański, W. Voelter, J. Barciszewski, C. Betzel, *Structure of mistletoe lectin I from Viscum album in complex with the phytohormone zeatin*. Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1784, 1590–1595
- [65] J.B. Dietrich, G. Ribéreau-Gayon, M.L. Jung, H. Franz, J.P. Beck, R. Anton, *Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (Viscum album L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins*. Anti-Cancer Drugs, 1992, 3 (5), 507-512
- [66] H. Franz, *Mistletoe lectins and their A and B chains*. Oncology, 1986, 43 Suppl 1, 23-34
- [67] G.S. Kienle, H. Kiene, *Influence of Viscum Album L. (European Mistletoe) Extracts on Quality of Life in Cancer Patients: A Systematic Review of Controlled Clinical Studies*. Integrative Cancer Therapies, 2010, 9 (2), 142-157
- [68] J. Eisenbraun, R. Scheer, M. Kröz, F. Schad, R. Huber, *Quality of life in breast cancer patients during chemotherapy and concurrent therapy with a mistletoe extract*. Phytomedicine, 2011, 18 (2–3), 151-157
- [69] K.-C. Kim, J.-H. Yook, J. Eisenbraun, B.-S. Kim, R. Huber, *Quality of life, immunomodulation and safety of adjuvant mistletoe treatment in patients with gastric carcinoma – a randomized, controlled pilot study*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2012, 12 (1), 1-7
- [70] U. Schumacher, U. Pfüller, *From Berlin and Witten to Southampton and Hamburg: 25 Years of Mistletoe Research Cooperation*. Mistletoe: From Mythology to Evidence-Based Medicine, Karger, Basel, 2015
- [71] G. Gregoriadis, C.P. Swain, E.J. Wills, A.S. Tavill, *DRUG-CARRIER POTENTIAL OF LIPOSOMES IN CANCER CHEMOTHERAPY*. The Lancet, 1974, 303 (7870), 1313-1316
- [72] K. Winkler, G. Leneweit, R. Schubert, *Characterization of membrane vesicles in plant extracts*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 45 (2), 57-65
- [73] H.W. Behm, *Kolloidchemie*, Franckh'sche Verlagshandlung (Kosmos) - Gesellschaft der Naturfreunde, Stuttgart, 1925

- [74] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen- und Kolloidchemie* VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994
- [75] Y.-T. Hu, Y. Ting, J.-Y. Hu, S.-C. Hsieh, *Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems*. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25 (1), 16-26
- [76] M. Kawaguchi, *Silicone oil emulsions stabilized by polymers and solid particles*. Advances in Colloid and Interface Science, 2016, 233, 186-199
- [77] A. Kapus, P. Janmey, *Plasma membrane--cortical cytoskeleton interactions: a cell biology approach with biophysical considerations*. Comprehensive Physiology, 2013, 3 (3), 1231-1281
- [78] J. Liu, Y. Zhang, *Diffusion-controlled adsorption kinetics of aqueous submicellar and micellar solution at air/solution interface in the limit of short time*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2006, 23 (5), 699-703
- [79] W.C. Griffin, *Classification of surface-active agents by "HLB"*. J Soc Cosmetic Chemists, 1949, 1, 311-326
- [80] W.C. Griffin, *Calculation of HLB values of non-ionic surfactants*. Am Perfumer Essent Oil Rev, 1955, 65, 26-29
- [81] J. Davies, *A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent*. Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface, London, 1957, Proceedings of the International Congress of Surface Activity, 1426-438
- [82] R.C. Pasquali, M.P. Taurozzi, C. Bregni, *Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system*. Int J Pharm, 2008, 356 (1-2), 44-51
- [83] G. Oehme, I. Grassert, E. Paetzold, R. Meisel, K. Drexler, H. Fuhrmann, *Complex catalyzed hydrogenation and carbon-carbon bond formation in aqueous micelles*. Coordination Chemistry Reviews, 1999, 185, 585-600
- [84] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2008, 9 (2), 112-124
- [85] J.S. O'Brien, E.L. Sampson, *Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin*. J Lipid Res, 1965, 6 (4), 537-544
- [86] G. Saher, B. Brugger, C. Lappe-Siefke, W. Mobius, R.-i. Tozawa, M.C. Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi, K.-A. Nave, *High cholesterol level is essential for myelin membrane growth*. Nat Neurosci, 2005, 8 (4), 468-475
- [87] S.J. Singer, G.L. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. Science, 1972, 175 (4023), 720-731

- [88] W.T. Norton, S.E. Poduslo, *MYELINATION IN RAT BRAIN: CHANGES IN MYELIN COMPOSITION DURING BRAIN MATURATION*. Journal of Neurochemistry, 1973, 21 (4), 759-773
- [89] H. Stroppe, *PHYSIK für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften*, Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München, 2003
- [90] Y. Liu, G. Zhang, H. Wang, S. Liu, J. Chen, L. Zhao, J. Li, B. Shan, *Novel cyclic pentapeptide H-15 induces differentiation and inhibits proliferation in murine melanoma B16 cells*. Oncology letters, 2016, 11 (2), 1251-1255
- [91] C.H. Fiske, Y. Subbarow, *THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS*. Journal of Biological Chemistry, 1925, 66 (2), 375-400
- [92] O. Behrend, *Mechanisches Emulgieren mit Ultraschall*. Dissertation 2002, Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- [93] C.B. Fox, S. Lin, S.J. Sivananthan, T.S. Dutil, K.T. Forseth, S.G. Reed, T.S. Vedvick, *Effects of emulsifier concentration, composition, and order of addition in squalene-phosphatidylcholine oil-in-water emulsions*. Pharmaceutical development and technology, 2011, 16 (5), 511-519
- [94] A. Tleuova, S. Aidarova, A. Sharipova, N. Bekturganova, M. Schenderlein, D. Grigoriev, *Using profile analysis tensiometry for monitoring auto-oscillations caused by the hydrolysis of 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate when contacting water*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2016, 505, 18-22
- [95] G. Loglio, P. Pandolfini, A.V. Makievski, R. Miller, *Calibration parameters of the pendant drop tensiometer: assessment of accuracy*. Journal of colloid and interface science, 2003, 265 (1), 161-165
- [96] E. Hildebrandt, A. Dessy, J.-H. Sommerling, G. Guthausen, H. Nirschl, G. Lenewit, *Interactions between Phospholipids and Organic Phases: Insights into Lipoproteins and Nanoemulsions*. Langmuir, 2016, 32 (23), 5821-5829
- [97] J. Li, R. Miller, H. Möhwald, *Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces. 1. Dynamics of adsorption of phospholipids at the chloroform water interface*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996, 114, 113-121
- [98] V.B. Fainermann, A.V. Makievski, R. Miller, *The measurement of dynamic surface tensions of highly viscous liquids by the maximum bubble pressure method*. Colloids and Surfaces A, 1993, 75, 229-235
- [99] A.R. Thiam, N. Bremond, J.r.m. Bibette, *From Stability to Permeability of Adhesive Emulsion Bilayers*. Langmuir, 2012, 28 (15), 6291-6298

- [100] <http://www.malvern.com/Assets/MRK1839.pdf>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [101] www.nanodrop.com, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [102] U. Pfüller, U. Schumacher, *The lectin and viscotoxin pattern of European mistletoe: isolation and quantification of the mistletoe lectins, their subunits and the viscotoxins*. *Phytomedicine*, 2015, 22, S3-S4
- [103] J.E. Noble, M.J.A. Bailey, *Quantitation of Protein*. *Methods in enzymology*, Elsevier Inc., 2009
- [104] <http://proteins.gelifsciences.com/knowledge-library/protein-purification-methods/size-exclusion-chromatography/>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [105] S.R. Dipali, S.B. Kulkarni, G.V. Betageri, *Comparative study of separation of non-encapsulated drug from unilamellar liposomes by various methods*. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 1996, 48 (11), 1112-1115
- [106] D.W. Fry, J.C. White, I.D. Goldman, *Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution*. *Analytical biochemistry*, 1978, 90 (2), 809-815
- [107] <http://www.uni-potsdam.de/u/physik/fprakti/ANLEIM2.pdf>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [108] E. Förster, J. Becker, F. Dalitz, B. Görling, B. Luy, H. Nirschl, G. Guthausen, *NMR Investigations on the Aging of Motor Oils*. *Energy & Fuels*, 2015, 29 (11), 7204-7212
- [109] S. Berger, S. Braun, *200 and More NMR Experiments: A Practical Course*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004
- [110] P. Callaghan, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*, Clarendon Press, Oxford, 1991
- [111] E.O. Stejskal, J.E. Tanner, *Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient*. *The Journal of Chemical Physics*, 1965, 42 (1), 288-292
- [112] J. Bahtz, D. Knorr, C. Tedeschi, M.E. Leser, B. Valles-Pamies, R. Miller, *Adsorption of octanoic acid at the water/oil interface*. *Colloids and Surfaces B*, 2009, 74 (2), 492-497
- [113] K. Dopierala, A. Javadi, J. Krägel, K.-H. Schano, E.P. Kalogianni, M.E. Leser, R. Miller, *Dynamic interfacial tensions of dietary oils*. *Colloids and Surfaces A*, 2011, 382, 261-265

- [114] <http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/info.html>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [115] <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/buerker.tuerk.html>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [116] <http://www.marienfild-superior.com/index.php/anleitungen.html>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [117] K. Urech, G. Schaller, P. Ziska, M. Giannattasio, *Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture*. *Phytotherapy Research*, 1995, 9 (1), 49-55
- [118] U. Valentiner, U. Pfüller, C. Baum, U. Schumacher, *The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro*. *Toxicology*, 2002, 171 (2–3), 187-199
- [119] A. Thies, D. Nugel, U. Pfüller, I. Moll, U. Schumacher, *Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro*. *Toxicology*, 2005, 207 (1), 105-116
- [120] R. Eifler, K. Pfüller, W. Göckeritz, U. Pfüller, *Improved procedures for isolation and standardization of mistletoe lectins and their subunits: lectin pattern of the European mistletoe*. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Wiley Eastern, New Delhi, 1993
- [121] <http://www.gbiosciences.com/PDF/Protocol/Tube-O-Array.pdf>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [122] <https://nld.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2016
- [123] E. Hildebrandt, M. Vrânceanu, H. Nirschl, G. Lenewit, *Phospholipids as emulsifiers for micro/nano droplets suitable for biotechnological systems integration*. *La Houille Blanche*, 2013, 2, 68-73
- [124] B. Esteban, J.-R. Riba, G. Baquero, A. Rius, R. Puig, *Temperature dependence of density and viscosity of vegetable oils*. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 42, 164-171
- [125] K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima, T. Kondo, *Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data*. *Biophysical chemistry*, 1991, 41 (2), 175-183
- [126] M.E. Silvestre, *Synthese und Anwendung funktioneller magnetischer Mikro- und Nanopartikel zur Aufreinigung von Proteinen*. Dissertation 2009, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

- [127] C.B. Fox, S.L. Baldwin, M.S. Duthie, S.G. Reed, T.S. Vedvick, *Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions*. *Vaccine*, 2011, 29 (51), 9563-9572
- [128] P. van Hoogevest, A. Wendel, *The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116 (9), 1088-1107
- [129] E. Hildebrandt, J.-H. Sommerling, G. Guthausen, K. Zick, J. Stürmer, H. Nirschl, G. Lenewit, *Phospholipid adsorption at oil in water versus water in oil interfaces: Implications for interfacial densities and bulk solubilities*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, 505, 56-63
- [130] J. Li, R. Miller, H. Möhwald, *Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces 2. Comparison of isotherms of insoluble and soluble films of phospholipids at different fluid/water interfaces*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1996, 114, 123-130
- [131] L. Pogliani, M. Ceruti, G. Ricchiardi, D. Viterbo, *An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1994, 70 (1), 21-34
- [132] E. Naziri, R. Consonni, M.Z. Tsimidou, *Squalene oxidation products: Monitoring the formation, characterisation and pro-oxidant activity*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116 (10), 1400-1411
- [133] K. Gawrisch, N.V. Eldho, L.L. Holte, *The structure of DHA in phospholipid membranes*. *Lipids*, 2003, 38 (4), 445-452
- [134] S. Ollila, M.T. Hyvönen, I. Vattulainen, *Polyunsaturation in Lipid Membranes: Dynamic Properties and Lateral Pressure Profiles*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111 (12), 3139-3150
- [135] C. Eun, M.L. Berkowitz, *Molecular dynamics simulation study of the water-mediated interaction between zwitterionic and charged surfaces*. *The Journal of Chemical Physics*, 2012, 136 (2), 024501-024507
- [136] V. Leduc, D. Domenger, L. De Beaumont, D. Lalonde, S. Bélanger-Jasmin, J. Poirier, *Function and Comorbidities of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease*. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 2011, 22
- [137] L. Winning, G.J. Linden, *Periodontitis and systemic disease*. *Nature*, 2015, BDJ Team, 07-10
- [138] S. Jayaraman, D.L. Gantz, O. Gursky, *Effects of phospholipase A2 and its products on structural stability of human LDL: relevance to formation of LDL-derived lipid droplets*. *Journal of Lipid Research*, 2011, 52 (3), 549-557

- [139] L. Rydhag, I. Wilton, *The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1981, 58 (8), 830-837
- [140] E. Hildebrandt, C. Heyder, M. De Matos, N. Beztsinna, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *Liposomal formulations of mistletoe produced by centrifugal technologies and cell proliferation analysis of both mistletoe extracts and isolated mistletoe lectin I*. Die Mistel in der Tumorthherapie 4, KVC Verlag, Essen, 2016
- [141] M.L. Jung, S. Baudino, G. Ribéreau-Gayon, J.P. Beck, *Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (Viscum album L.)*. Cancer Lett, 1990, 51 (2), 103-108
- [142] K.I.-J. Kopp J., Pfüller U., Göckeritz W., Eiffler R., Pfüller K. and Franz H., *Toxicity of mistletoe lectins I, II and III on normal and malignant cells*. Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry, 1993, 8, 41-47
- [143] U. Schumacher, E. Adam, S.A. Brooks, A.J. Leathem, *Lectin-binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to Helix pomatia agglutinin*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 1995, 43 (3), 275-281
- [144] J.-H. Sommerling, M.B.C. de Matos, E. Hildebrandt, A. Dessy, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *Instability mechanisms of water in oil nanoemulsions with phospholipids: temporal and morphological structures*, eingereicht 2017 (Under Review)

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

a) Lateinische Symbole

<i>a</i>	Zentrifugalbeschleunigung	$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
<i>A</i>	Fläche (pro Molekül)	m^2 (Å ² pro Molekül)
<i>b</i>	Adsorptionskoeffizient	$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$
<i>B</i>	Krümmungsradius am Tropfenpol	m
<i>c</i>	Konzentration	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
<i>C</i>	Korrekturkoeffizient	
<i>d</i>	Partikeldurchmesser und Schichtdicke	m
<i>d(H)</i>	hydrodynamischer Durchmesser	m
<i>D</i>	translationale Diffusionskonstante	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
<i>E</i>	Energie	$\text{J} = \text{N}\cdot\text{m}$
<i>E_λ</i>	Extinktion	
<i>F</i>	Kraft	$\text{N} = \text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
<i>g</i>	Gravitationskonstante (= 9,807)	$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
<i>I</i>	Kernspinquantenzahl	
<i>I₀</i>	Intensität des einfallenden Lichtes	$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$
<i>I₁</i>	Intensität des transmittierten Lichtes	$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$
<i>k</i>	Boltzmann-Konstante (= $1,381\cdot 10^{-23}$)	$\text{kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-2}$
<i>K</i>	Variable in Gl. (3) von Kwok und Neumann	$(\text{m}^2\cdot(\text{m}\cdot\text{J})^{-1})^2$
<i>l</i>	Länge	m
<i>M</i>	Molmasse	$\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$
<i>n</i>	Drehzahl	s^{-1}
<i>N</i>	Avogadro-Konstante (= $6,023\cdot 10^{23}$)	mol^{-1}
<i>p</i>	Druck	$\text{Pa} = \text{N}\cdot\text{m}^{-2} = \text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$
<i>q</i>	Streuvektor	$^{\circ}$
<i>r</i>	Tropfen-/ (Krümmungs)-Radius	m
<i>R</i>	universelle Gaskonstante (= 8,314)	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
<i>s</i>	Länge der Kurve (Bogenlänge)	rad
<i>T</i>	absolute Temperatur	K
<i>u</i>	Geschwindigkeit	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$

W_{rev} Arbeit, reversibel $J = N \cdot m$

b) Griechische Symbole

α (Alpha)	Wechselwirkungskonstante nach Frumkin	
β (Beta)	Kontaktwinkel	°
γ (Gamma)	Grenzflächenspannung	$N \cdot m^{-1} = kg \cdot s^{-2}$
Γ (gr. Gamma)	Grenzflächenkonzentration	$mol \cdot m^{-2}$
δ (Delta)	chemische Verschiebung	$ppm = 1 \times 10^{-6}$
ε_λ (Epsilon)	molarer Extinktionskoeffizient	$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
η (Eta)	dynamische Viskosität	$Pa \cdot s = kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$
θ (Theta)	Bedeckungsgrad	
λ (Lambda)	Wellenlänge	m
π (Pi)	Kreiszahl	(= 3,1415)
ρ (Rho)	Dichte	$kg \cdot m^{-3}$
σ (Sigma)	Oberflächenspannung	$N \cdot m^{-1} = kg \cdot s^{-2}$
τ (Tau)	Verzögerungszeit	s
φ (Phi)	Phase des Pulses bei der NMR	$\pi/2 = (90^\circ \text{Puls})$
ω (Omega)	Winkelgeschwindigkeit	$rad \cdot s^{-1}$
ω_0	Kehrwert von Γ	$m^2 \cdot mol^{-1}$

c) Chemische Formeln

$CDCl_3$	deutiertes Chloroform
$CHCl_3$	Chloroform
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
$MgO \cdot xSiO_2$	Magnesiumsilikate (Florisi®)
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat

d) Abkürzungen

ACQ	Zeit der Datenerfassung bei der NMR(“ acquisition “)
Ar	Argon
^{13}C	Kohlenstoff-Atom

CAC	kritische A ggregationskonzentration („ <i>critical concentration</i> “)
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil („ <i>charge-coupled device</i> “)
CMC	kritische M izellbildungskonzentration („ <i>critical concentration</i> “)
CPD	Komponente der Pulssequenz („ <i>composite pulse decoupling</i> “)
DLS	d ynamische L icht s treuung
DMEM	D ulbecco's modifiziertes Adler („ <i>eagle</i> “)- M edium
DMPC	1,2- d imyristoyl-PC
DOSY	D iffusions-geordnete Spektroskopie („ <i>ordered spectroscopy</i> “)
DPPC	1,2- d ipalmatoyl-PC
F	F luid
FBS	fötales R inder („ <i>bovine</i> “)-Serum
GMP	g ute Herstellungspraxis („ <i>manufacturing practice</i> “)
GUV	g roße unilamellare V esikel > 1000 nm
¹ H	Wasserstoff-Atom (1 Proton)
h	Stunde („ <i>hour</i> “)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPTS	8- H ydroxy-1,3,6- p yrertrisulfonsäuretratrium Salz
IC ₅₀	mittlere i nhibitorische Konzentration („ <i>concentration</i> “)
IL	I nterleukin
kDa	K ilodalton (atomare Masseneinheit, Einheit kg)
lat.	Lateinisch
L	Flüssigkeit („ <i>liquid</i> “)
LUV	große unilamellare V esikel > 100 nm („ <i>large</i> “)
LRh	N -(L issamin R hodamin B sulfonyl) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3
min	Minute
M	Molar (Einheit mol·l ⁻¹)
ML	M istellektin
MV	m ultilamellare V esikel > 500 nm
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-Tetrazolium
MVV	m ultivesikuläre V esikel
MW	M olekulargewicht („ <i>weight</i> “)
n	Anzahl
NAD(P)H	N icotinamid- A denin- D inukleotid-(P hosphat-) H ydrid
NMR	Kernspin- R esonanzspektroskopie („ <i>nuclear magnetic</i> “)
OG	o ptisches G las
OV	o ligolamellare V esikel 100–500 nm
PAT	P rofil- A nalyse- T ensiometrie

PBS	phosphat-gepufferte S alzlösung (<i>“buffered”</i>)
PC	P hosphatidyl Ch olin; Lecithine
PCS	P hotonenkorrelations S pektroskopie (<i>„corellation“</i>)
PDI	P olydispersitätsindex
PE	P hosphatidylethanolamin; Kephaline
PES	P henazin E thosulfat
PMMA	P olymethyl M ethacrylat
POPC	1- p almitoyl-2- o leoyl- s n-glycero-3- P C
ppm	Millionstel (<i>“parts per million”</i>)
PS	P hosphatidyl S erin
rpm	Umdrehung p ro M inute (<i>„revolutions“</i>); rpm/60=rpm/s = <i>n</i>
RPMI	R oswell P ark M emorial Institute
RT	R aum t emperatur (~20°C)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>„standard deviation“</i>)
SEC	Größenausschluss (<i>„size-exclusion“</i>)- C hromatographie
SP	S odium- P yruvat
SUV	kleine (<i>„small“</i>) unilamellare V esikel 20–100 nm
TG	T rocken g ewicht
TNF α	T umor- N ekrose- F aktor α
US	U ltraschall
Vol.-%	V olumen p rozent
VT	V iskotoxin
ZL	Z elllinie

e) **L**änder**c**odes

CH	Schweiz
DE	Deutschland
ES	Spanien
FR	Frankreich
JP	Japan
NL	Die Niederlande
UK	England (<i>„United Kingdom“</i>)
USA	Vereinigte S tstaaten von A merika (<i>„United“</i>)

Anhang

A.1 Verwendete Messparameter

Tabelle A-1.1: Einstellungen für die PCS-Messungen (4.6.1)

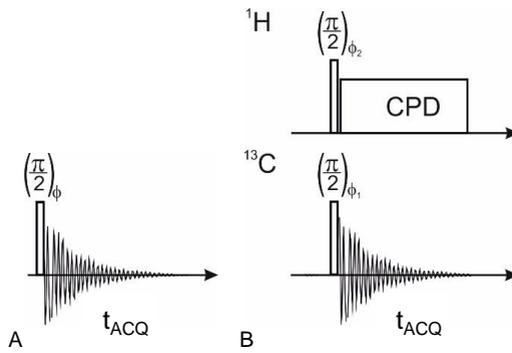
Parameter	Wert
Messwinkel	90°
Temperatur	20°C
Absorption	0,00
Analysenmodell	Multiple narrow mode, hochauflösend
Refraktionsindex (bei 20°C; entsprechende dynamische Viskosität)	1,333 (Wasser; $\eta = 1$ mPa s) 1,452 (Squalan; $\eta = 36$ mPa s) 1,499 (Squalen; $\eta = 15$ mPa s)

Tabelle A-1.2: Methoden für die Fluoreszenzspektroskopie (4.6.4)

Substanz	Absorption [nm]	Emission [nm]	PMT (Photomultiplier)
HPTS in PBS	488	515	450
HPTS in EtOH	404	428	400
LRh-PE in Squalen	560	593	450
LRh-PE in PBS	560	593	450
LRh-PE in EtOH	562	582	450
Lichtstreuung	450	450	400

Tabelle A-1.3: Zusammenstellung der Dichte ρ und Oberflächenspannung σ für die in der Tensiometrie (PAT) verwendeten Substanzen (4.5)

Flüssigkeiten/Gas	ρ [g/l]	σ bei 20°C [mN/m]
Chloroform	1483	27,2
Ethanol	790	22,5
Luft	1,2	-
Squalan	809	31,4
Squalen	860	30,2
HPLC-Wasser	1000	72,7



**Abbildung A-1.1: Verwendete Pulssequenz für die ^1D -Spektren (4.6.5.1).
 A – 90° Puls der ^1H NMR; B – ^1H -entkoppelte ^{13}C NMR (Supporting Information
 in [96])**

A.2 Überblick über die verwendeten Materialien

Tabelle A-2.1: Verwendete Lipide und Fluoreszenzmarker

Lipid	Molmasse [g/mol]	Batch-Nummer	Hersteller
DMPC	677,93	653009-01/949	Lipoid, Ludwigshafen, DE
DPPC	734,04	556300-01/904	
LRh-PE	744,04	513361	Invitrogen, Darmstadt, DE
POPC	760,08	556400-01/022	Lipoid, Ludwigshafen, DE

Tabelle A-2.2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Batch-Nr.	Hersteller	Firmensitz
Albumin \geq 96% (Pulver)	SLBJ8558V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Ammoniummolybdat	61300258	Alfa Aesar	Karlsruhe, DE
Argon	-	Linde AG	München, DE
Ascorbinsäure	051M0134V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
CHCl ₃ \geq 99%	064209991	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
CDCl ₃ \geq 99,5%	B15643	Deutero	Kastellaun, DE
Ethanol \geq 96%	603-002-00-5	interchema®	Vollenhove, NL
Extran® AP17	L014059606	Merck	Darmstadt, DE
Florisil®	14E190008	VWR	Radnor, USA
HCl, rauchend 37%	214214370	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
HPTS	BCBF2623V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
KCl	13E160032	VWR	Radnor, USA
KH ₂ PO ₄	14D170023	VWR	Radnor, USA
NaCl	422190838	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
Na ₂ HPO ₄	1.06586.0500	Merck	Darmstadt, DE
Perchlorsäure	1.08597.2500	Merck	Darmstadt, DE
Reduktionsmittel Fiske&Subarow	BCBF9761V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Schwefelsäure 90%	056237435	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
Sepharose CL-4B	61K1227	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Squalan \geq 99%	MKBQ5948V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Squalan \geq 98%	BCBP1517V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Wasser (HiperSolv HPLC)	13Z1780	VWR	Radnor, USA
Wasser (Nuclease-frei)	32416201	Promega	Madison, USA
Wasserstoffperoxid \geq 30%	BCBJ8339V	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE

Tabelle A-2.3: Verwendete Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Batch-Nr.	Hersteller	Firmensitz
CELLSTAR®:			
Pipette 25ml	14071641	Greiner bio-one	Frickenhausen, DE
Pipette 10ml	14102551		
Pipette 5ml	14080771		
Pipette 2ml	345404		
Pipette 2ml-Aspirator	437405		
Zellschaber 28cm	F1410389		
Zellkulturflasche 75cm ²	E15Q3365		
Mikrotiterplatten 96-Well	E15Q23GF		
Falcon-Tubes 15 ml	E15Q23F9		
Falcon-Tubes 50ml	E1412364		
Costar® Reagent Reservoir	02915002	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Cryo-Röhrchen 1,2 ml	20110011	TPP	Trasadingen, CH
Cryo-Gefriereinheit Cool-Cell®	BCS-136	BioCision	San Rafael, USA
Filter Minisart® 0,2 µm	3081103	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, DE
Filter PVDF 0,2µm	FPV150020-S	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
Glaskolben	-	DURAN	Wertheim/Main, DE
Glasküvetten OG	-	Hellma®	Müllheim, DE
Glasperlen 2,85-3,3mm	41361317	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
Küvetten PMMA, halbmikro	N-059-3	BRAND®	Wertheim, DE
Küvetten PS	80026042	Carl-Roth	Karlsruhe, DE
Nuclepore Track-Etch Membran 200nm	65970	Whatman®	Maidstone, UK
Pipettenspitzen Easy Load®:			
Universal-1000 µl	A15013DJ	Greiner bio-one	Frickenhausen, DE
Universal-200µl	A15023W6		
GILSON®-Style 10µl	A12070XX		
Sapphire 300µl	102399		
Reagiergefäß Micro-Tube 1,5 ml	5081411	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Spritze Luer BD Plastipate™ 1 ml	1002043	BD Medical	Franklin Lakes, USA
Tube-O-DIALYZER Medi 8kDa	142404	GBiosciences	St. Louise, USA

Tabelle A-2.4: Verwendete Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium/ Lösung	Batch-Nr.	Hersteller	Firmensitz
CellTiter 96® AQueous Cell Proliferation Assay	0000144081	Promega	Madison, USA
DMEM	RNBD3029	Sigma Life Science	Steinheim, DE
DMSO	1V004468	AppliChem	Darmstadt, DE
FBS	014M3396	Sigma Life Science	Steinheim, DE
HEPES 1 M	RNBD2792		
PBS	RNBDD5488		
RPML-1640	RNBD6091		
Sodium-Pyruvat 100 mM	RNBD1357		
Tryphan-Blau	T6146		
Trypsin (10-fach)	SLBG7826		

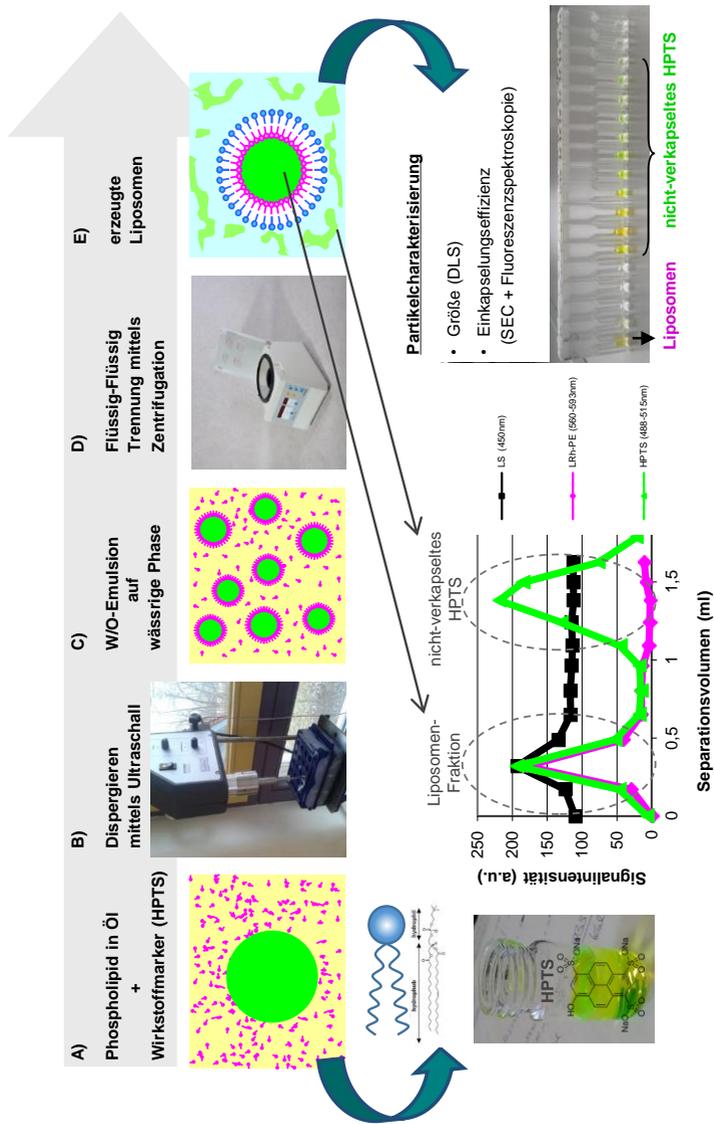


Abbildung A-2.1: Überblick zur Herstellung und Charakterisierung von Liposomen

A.3 Überblick über erstellte Kalibrationen und Parameterfits

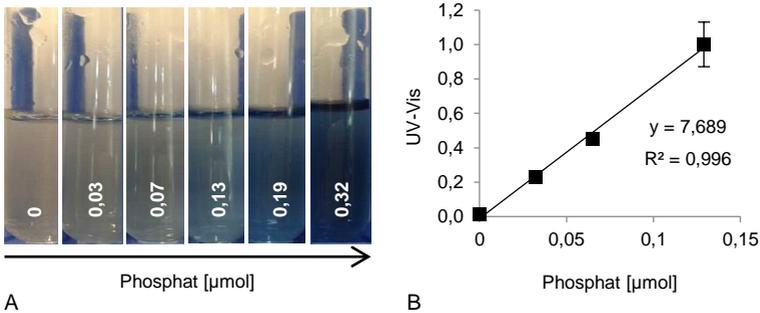


Abbildung A-3.1: Phosphatbestimmung Wasserphase (4.2). A – Kalibrieransätze und B – Kalibration der UV-Vis Messung bei 830 nm [129]

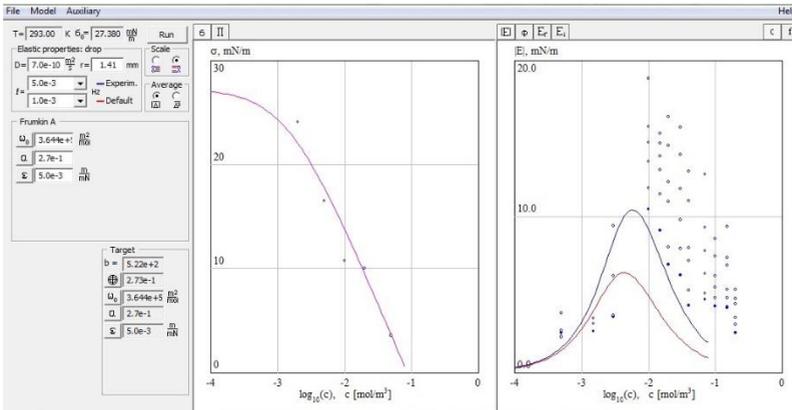


Abbildung A-3.2: Exemplarische Darstellung der Parameterbestimmung für die Frumkin-Isotherme mittels IsoFit

Tabelle A-3.1: Exemplarische Darstellung der mittels IsoFit ermittelten Belegung von DPPC an der Chloroform/ Wasser-Grenzfläche

Isothermenmodell	ω_0 [m²/mol]	Γ_∞ [mol/m²]	A [Å²/Molekül]	Referenz [97]
Frumkin	$3,64 \times 10^5$	$2,74 \times 10^{-6}$	61	61
Langmuir	$3,51 \times 10^5$	$2,85 \times 10^{-6}$	58	61

* Vergleich Gibbs:

58 61

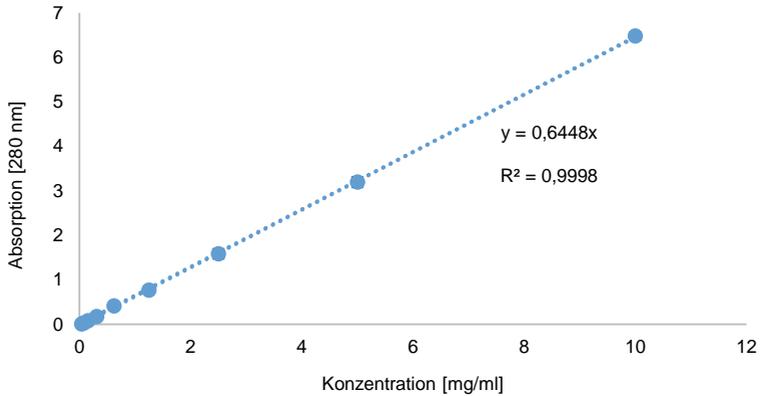


Abbildung A-3.3: Kalibration mit Albumin der UV-Vis-Messung bei 280 nm am Nanodrop ND-1000 (siehe 4.6.2)

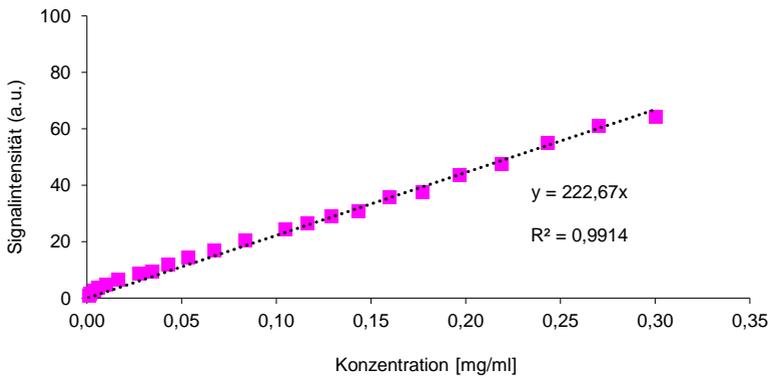


Abbildung A-3.4: Kalibrationsreihe von 0,3 mg/ml POPC mit 1 Mol% LRh-PE in Squalen vermessen am Fluoreszenzspektrometer (Varian) bei 560-593 nm (siehe Tabelle A-1.2)

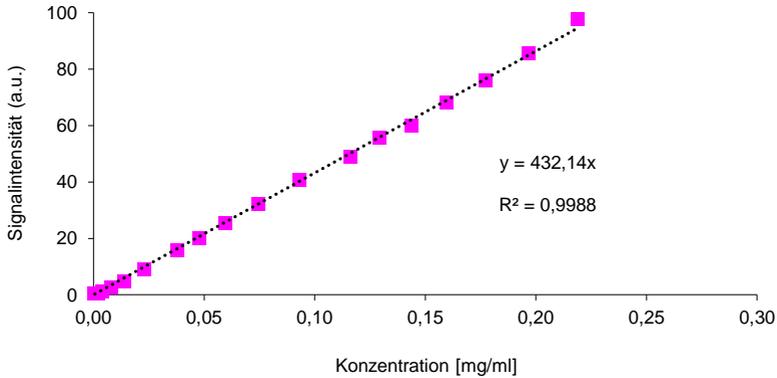


Abbildung A-3.5: Kalibrationsreihe von 0,3 mg/ml POPC mit 1 Mol% LRh-PE in wässriger Phase vermessen am Fluoreszenzspektrometer (Varian) bei 560-593 nm (siehe Tabelle A-1.2)

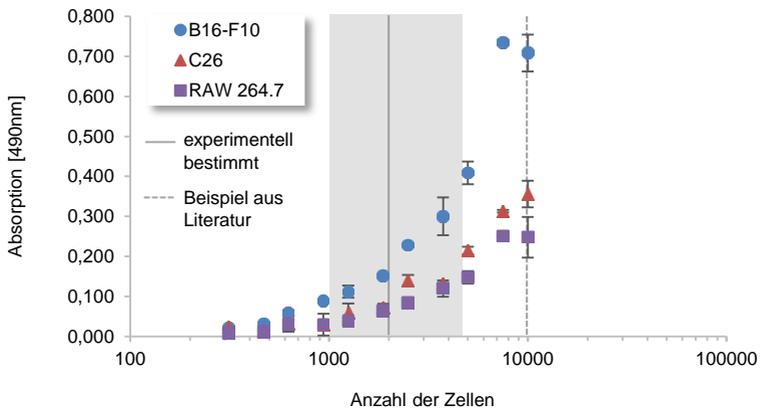


Abbildung A-3.6: Vorversuch zur Zellzahlbestimmung des MTS-Assays in Abschnitt 4.8.4.1. Graues Feld markiert den Bereich in dem exponentielles Wachstum für eine Inkubationszeit von 48 h angenommen werden kann

A.4 Ergebnisse weiterer Analysen

Tabelle A-4.1: PCS-Werte zur POPC Löslichkeit in Squalen [123]

Probe	c_0 [mg/ml]	d [nm]	PDI	C_r [kcps]
Squalen	-	4,4	0,44	3,1
POPC in Squalen (Trockenfilm gelöst)	0,3	28,6g	1	4,2
POPC in Squalen nach 2 h US	0,3	27,7	0,895	4,5
POPC in Squalen (Trockenfilm gelöst)	3	285,4	1,00	26,8
POPC in Squalen nach 2 h US	3	376,9	0,66	11,1
POPC in Squalen (Pulver direkt gelöst)	3	1686,0	0,51	160,0
POPC in Squalen nach 6 h US	3	877,5	0,71	24,3
POPC in Squalen (Trockenfilm gelöst)	10	3196,0	0,86	867,4
POPC in Squalen nach 12 h US	10	1486,0	0,35	553,7

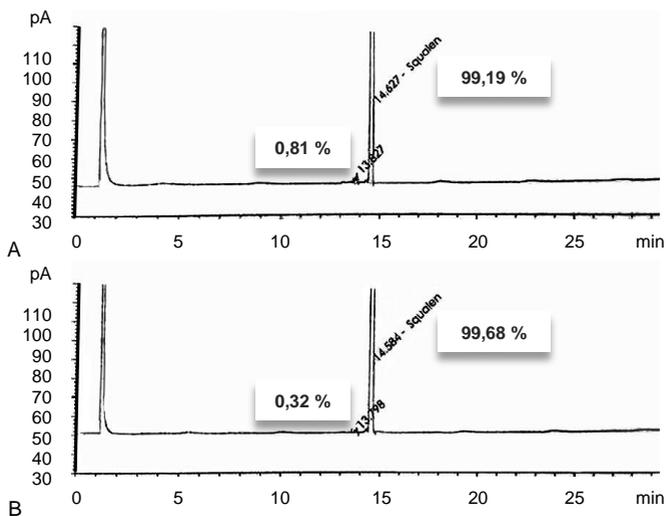
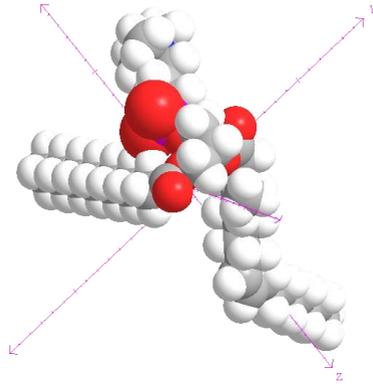


Abbildung A-4.1: GC-Messung von Squalen: A – vor und B – nach der Reinigung mit Florisil® (Supporting Information in [96])



**Abbildung A-4.2: Modell von POPC berechnet mit Chemdraw
(CambridgeSoftCorporation, Cambridge, USA)**

Publikationsliste

Veröffentlichungen:

E. Hildebrandt, M. Vrânceanu, H. Nirschl, G. Leneweit, *Phospholipids as emulsifiers for micro/nano droplets suitable for biotechnological systems integration*, La Houille Blanche n°2, 2013, 68-73,

DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/lhb/2013018>

E. Hildebrandt, J.-H. Sommerling, G. Guthausen, K. Zick, J. Stürmer, H. Nirschl, G. Leneweit, *Phospholipid adsorption at oil in water versus water in oil interfaces: implications for interfacial densities and bulk solubilities*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects (2016), 56-63,

DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.12.024

E. Hildebrandt, A. Dessy, J.-H. Sommerling, G. Guthausen, H. Nirschl, G. Leneweit, *Interactions between Lipids and Phospholipids at Water/Oil Interfaces – Insights into Lipoproteins and Nanoemulsions*, Langmuir, 2016, 32 (23), 5821–5829,

DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00978

E. Hildebrandt, C. Heyder, M.B.C. de Matos, N. Beztsinna, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *Liposomal formulations of mistletoe produced by centrifugal technologies and cell proliferation analysis of both mistletoe extracts and isolated mistletoe lectin I*, Die Mistel in der Tumorthherapie 4 – Aktueller Stand der Forschung und klinischen Anwendung. Essen: KVC Verlag; 2016 ISBN: 978-3-945150-68-9

E. Hildebrandt, H. Nirschl, R.J. Kok, G. Leneweit, *Adsorption of phospholipids at oil/water interfaces during emulsification is controlled by stress relaxation and diffusion* (in Vorbereitung)

J.-H. Sommerling, Maria B.C. de Matos, **E. Hildebrandt**, A. Dessy, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *Instability mechanisms of water in oil emulsions with phospholipids: temporal and morphological* (Under Review)

M.B.C. de Matos, N. Beztsinna, **E. Hildebrandt**, C. Heyder, G. Leneweit, R.J. Kok, *In vitro study of mistletoe lectin compounds on murine tumour cell lines* (in Vorbereitung)

Konferenz- und Posterbeiträge:

E. Hildebrandt, M. Vrânceanu, H. Nirschl, G. Leneweit, *Phospholipids as Emulsifiers for Micro/Nano Droplets Suitable for Biotechnological Systems Integration* (Vortrag & Poster), 3rd European conference on Microfluidics - µFlu'12, 03.-05. November 2012, Heidelberg

E. Hildebrandt, J. Binder, D. Laufer, H. Nirschl, G. Leneweit, *Adsorption isotherms of phosphatidylcholines at oil/water interfaces* (Poster), 14th European Student Colloid Conference, 10.-13. Juni 2013, Golm

E. Hildebrandt, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *Adsorption isotherms of phosphatidylcholines at oil/water interfaces - a study for nanoemulsions* (Poster), Biopharmacy Day - Meeting of the Belgian-Dutch Biopharmaceutical Society, 12. Dezember 2014, Vlaardingem, NL

J.-H. Sommerling, M.B.C. de Matos, **E. Hildebrandt**, H. Nirschl, G. Leneweit, *Preparation of liposomes with asymmetric bilayers produced from nanoemulsions in a centrifugal field* (Poster), 1st European Conference on Pharmaceutics – Drug Delivery, 13.-14. April 2015, Reims, FR

E. Hildebrandt, A. Dessy, J.-H. Sommerling, M.B.C. de Matos, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *Adsorption of phospholipids at oil/water interfaces - chemical interactions and consequences for nanoemulsions and lipoproteins* (Vortrag), 29th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS), 06.-11. September 2015, Bordeaux, FR

E. Hildebrandt, J.-H. Sommerling, M.B.C. de Matos, D.A. Grijalva, A. Dessy, J. Binder, D. Laufer, R.J. Kok, H. Nirschl, G. Leneweit, *A Comparison of Adsorption Isotherms of DPPC at Oil in Water versus Water in Oil Interfaces regarding Surface Density and Solubility* (Poster), 29th Conference of ECIS, 06.-11. September 2015, Bordeaux, FR