

Etablierung und Charakterisierung eines kontinuierlichen Herstellungsverfahrens von Liposomen aus Nanoemulsionen

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

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

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Ing. Jan-Hendrik Sommerling
aus Köln

Referent: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl
Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Hubbuch
Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2018



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

“Once you eliminate the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.”

- Sir Arthur Conan Doyle

Danksagung

Diese Dissertation wurde im Rahmen einer Kooperation des Instituts für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) und der Abnoba GmbH angefertigt. Während der Jahre von 2013 bis 2017 durfte ich, sowohl in Karlsruhe im universitären Umfeld als auch am Produktionsstandort in Niefern-Öschelbronn, als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig sein.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Hermann Nirschl für die Betreuung am KIT. Als besonders positiv und motivierend empfand ich Ihre Offenheit gegenüber neuen Ansätzen, die Möglichkeit seinen eigenen Weg gehen zu dürfen, sowie die kollegiale Atmosphäre am Institut.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Leneweit für die Zeit und Einblicke in den Alltag einer mittelständischen Firma bedanken. Die Möglichkeit an einem durch die EU geförderten Projekt mitzuwirken und natürlich die damit einhergehende Finanzierung zu genießen, habe ich Ihnen zu verdanken.

Frau Prof. Dr. Gisela Guthausen gilt mein aufrichtiger Dank für die Möglichkeit mit der NMR-Spektroskopie eine herausragende Messtechnik kennenzulernen und nutzen zu dürfen. Mit offener Tür, Rat und Tat haben Sie neue Wege eröffnet, die ich zuvor nicht wahrgenommen habe.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Hubbuch bedanken, der bereits meine Studienzeit geprägt hat. Die jahrelange Erfahrung am Lehrstuhl für Molekulare Aufbereitung von Bioprodukten (MAB) in Vorlesungen, im Labor und bei anderen Gelegenheiten möchte ich nicht missen.

Bei Prof. Michael Johns und dem Deutschen Akademischen Auslandsdienst bedanke ich mich für die Möglichkeit einen wissenschaftlichen Austausch mit der University of Western Australia durchzuführen. Dr. Agnes Haber hat diesem Austausch sowohl fachlich als auch persönlich ein Gesicht verliehen.

Über die Jahre haben mich vor allem die Kollegen und Mitarbeiter, sowohl am KIT als auch der Abnoba GmbH, begleitet, was die Arbeit bereichert und den Alltag verschönt hat. Ich habe den gemeinsamen Kaffee und die anregenden Gespräche sehr genossen. Einige Freundschaften sind aus dieser Zeit hervorgegangen.

Im Rahmen einiger Abschlussarbeiten durfte ich mit Studenten zusammenarbeiten und möchte mich auch bei ihnen bedanken: Nils Schuhmann, Eugenia Salzmann, Felix Hornauer, Mariusz Kownacki, Franziska Hirsch, Julia Stürmer, Maryam Alami, Novindi Ratnawati, Alexander Heneka, Arne Simon, Neele Uhlenbruck und Katharina Bender. Ihr alle habt die Arbeit mit vorangebracht und mir neue Blickwinkel eröffnet.

Meinen Eltern möchte ich für die bedingungslose Unterstützung danken.

Die Leichtathletikabteilung des SV Karlsruhe-Beiertheim und das Technische Hilfswerk sorgten für die nötige Bewegung, brachten praktische Ergänzungen und bildeten einen Ausgleich zu meinem akademischen Alltag. Danke an all die Athleten und Kameraden!

Meiner Verlobten darf ich meine Liebe aussprechen und möchte jedem von dem Wunder erzählen, dass man gemeinsam in der Arbeit und Beziehung Erfüllung finden kann.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt ein spezielles Herstellungsverfahren zur Erzeugung funktionaler Lipidkapseln, sogenannten Liposomen, aus Nanoemulsionen und der Entwicklung der entsprechend benötigten Analytik. Eine Wasser-in-Öl (WO) Nanoemulsion, die den Wirkstoff in den wässrigen Tropfen enthält, wird als Zwischenprodukt genutzt. Die beladenen Tropfen werden mithilfe einer Zentrifugation in eine zweite wässrige kontinuierliche Phase transferiert, wodurch Liposomen erzeugt werden. Aus dem Ziel einer pharmazeutischen Verwendung ergeben sich komplexe Anforderungen an den Prozess. Die Tropfengröße der Emulsion und der resultierenden Liposomen sollte bei etwa 200 nm liegen, mit einer obligatorischen Verwendung von Phospholipiden als Emulgator. Die Arbeit konzentriert sich auf drei Bereiche: erstens die Stabilisierung von WO Nanoemulsionen, zweitens die Nutzung von NMR zur Charakterisierung des Stoffsystems und drittens der Untersuchung des Transfers von Kolloiden zwischen zwei Flüssigphasen.

Über eine Analyse der Emulsionsstabilität konnte gezeigt werden, dass Phospholipide in WO Nanoemulsionen einer stetigen Instabilität unterliegen und es gelang den zugrundeliegenden Mechanismus zu identifizieren. Die Instabilität folgt einem bestimmten Muster, bei dem sich Tropfen zunächst durch Koaleszenz vereinigen bis die Grenzfläche ausreichend reduziert wird, um vom Emulgator belegt zu werden. Im Folgenden kommt es zu Ostwaldreifung, die insbesondere durch die Anwesenheit von Lipidmizellen vermittelt wird. Eine erhöhte Konzentration an Emulgator führt dabei nicht zu einer besseren Stabilität, da dieser aggregiert. Ausreichende Tropfengrößen und Stabilität sind daher nur unterhalb der kritischen Aggregationskonzentration zu erreichen. Mit einem angepassten Ultraschallverfahren konnten Tropfengrößen von 300 nm und eine ausreichende Stabilität für den Transfer erreicht werden.

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und –diffusometrie ermöglicht die selektive Analyse einzelner Molekülspezies und deren Diffusion in einer Emulsion oder in Liposomen. Aus der Diffusion lässt sich die Tropfengrößenverteilung ableiten. Es wurden zwei Verfahren zur Auswertung von komplexen Tropfengrößenverteilungen verglichen sowie deren Validität und Voraussetzungen bewertet. Für die Analyse von Nanoemulsionen konnte das bestehende Modell erweitert werden, sodass nun Tropfengrößen im Bereich unterhalb eines Mikrometers zugänglich sind. Weiterhin bietet die NMR die Perspektive die Einkapselung von Wirkstoff, das Verhalten des Emulgators und einen möglichen Austausch zwischen den Tropfen oder Phasen zu verfolgen.

Der Transfer kolloidaler Partikel durch eine flüssig-flüssig Phasengrenze, als Vereinfachung der instabileren Tropfen, wurde mit Modellpartikeln theoretisch und experimentell beschrieben. Die Bilanzierung der wirkenden Kräfte zeigt die benötigte Arbeit für den Transfer, die durch die Zentrifugation aufgebracht werden muss. Der Ansatz konnte experimentell validiert werden und spezifiziert die Abhängigkeit von der Partikelgröße, den Materialeigenschaften und den experimentellen Parametern wie der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Der Transfer wird für kleine Partikel zunehmend anspruchsvoller, da im Bereich von mehreren hundert Nanometern die Grenzflächenkräfte dominieren. Nanopartikel neigen zur Agglomeration an der Grenzfläche und können nur mit einem Mindestaufwand wie gewünscht als Einzelkorn transferiert werden.

Insgesamt wurde das Herstellungsverfahren für Liposomen umfassender untersucht, als es der bisherige Stand der Technik war. Als Voraussetzung für das Verfahren wurden die Emulsionen optimiert, mit der NMR eine leistungsfähige Analytik etabliert und der Transfer mit den eingehenden Faktoren analysiert. Die aufgezeigten Limitierungen bilden die Basis für zukünftige Verbesserungen des Konzepts.

Abstract

The presented thesis discusses a specific production process for the generation of functional lipid capsules, also known as liposomes, using nanoemulsions and the development of the required analytics. A water-in-oil (WO) nanoemulsion, which contains the active pharmaceutical ingredient (API) within the aqueous droplets, is used as an intermediate. The loaded droplets are transferred into a second continuous and aqueous phase via centrifugation, thereby producing liposomes. The aim of a pharmaceutical application leads to complex requirements for the process. The droplet size of the emulsion and the resulting liposomes should be in the range of 200 nm, with an obligatory use of phospholipids as emulsifier. The thesis is focused on three aspects: first, the stability of WO nanoemulsions, second, the use of NMR for the characterisation of the formulation and third, the investigation on the transfer of colloids between two liquid phases.

By analysing the emulsion stability it was shown, that phospholipids in WO nanoemulsion are prone to a constant instability and it was possible to identify the underlying mechanism. The instability is following a certain pattern in which the droplets are growing due to coalescence, until the interface is reduced sufficiently to enable a full coverage by an emulsifier. In the following, Ostwald ripening is dominant, which is enabled by the presence of lipid micelles. An increased concentration of emulsifier does not lead to a better stability, because the insoluble excess forms aggregates. The required droplet sizes and stability is therefore only available at concentrations below the critical aggregation concentration. With an adapted ultrasound process, the droplet sizes were reduced to 300 nm and a satisfactory stability was accomplished.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and diffusometry allow to selectively analyse single molecular species and their diffusion within an emulsion droplet or a liposome. The droplet size distribution can be derived from the diffusion behaviour. Two methods for the evaluation were tested and compared on

complex droplet size distributions as well as assessing the validity and prerequisites of the approaches. The known model was extended for the analysis of nanoemulsions, making droplet sizes below one micrometre accessible. Further, NMR is offering possibilities to consider the encapsulation efficiency of API, the behaviour of the emulsifier and possible exchange of molecules between droplets or phases.

The transfer of colloidal particles, as a simplification of the more unstable droplets, was described experimentally and theoretically using model particles. The balance on acting forces shows the required work for the transfer, which has to be contributed by the centrifugation. The approach was validated experimentally and specifies the dependency on the particle size, the material properties and the experimental parameters, such as the centrifugation speed. The transfer needs increasingly stronger forces for small particles, due to the increasing domination of the surface forces at sizes of several hundred nanometres. Nanoparticles are prone to agglomerate at the interface and can only be transferred as single particles with a certain minimum centrifugal force.

Overall the production process for liposomes was comprehensively considered in all aspects, leading clearly beyond the state of the art. As a condition for the process the emulsions were optimised, NMR was established a powerful analysis and the transfer with all its elements was understood. The presented limitations are the basis for future improvements of the concept.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation und Fragestellung	1
1.2	Ansätze zur Prozessoptimierung und Zielstellung	4
2	Stand der Technik und Theorie	7
2.1	Liposomen	7
2.1.1	Aufbau	7
2.1.2	Pharmazeutische Verwendung	8
2.1.3	Etablierte Herstellungsverfahren	9
2.2	Emulsionen	10
2.2.1	Struktur	10
2.2.2	Herstellung mit Ultraschall und Hochdruckhomogenisation	11
2.2.3	Instabilitätsmechanismen	13
2.2.4	Stabilität von Emulsionen mit Phospholipiden	16
2.2.5	Charakterisierung der Instabilitätsmechanismen	18
2.3	Messtechnik in Bezug auf Liposomen und Emulsionen	20
2.3.1	Tensiometrie	20
2.3.2	Stokes-Einstein Gleichung	21
2.3.3	Dynamische Lichtstreuung	23
2.3.4	NMR zur Bestimmung von Tropfengrößenverteilungen	25
2.4	Phasentransfer von Kolloiden	30

2.4.1	Transfer von Feststoffpartikeln	30
2.4.2	Transferprozess nach Träuble und Grell	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Nanoemulsionen mit Phospholipiden	35
3.1.1	Herstellung von Nanoemulsionen	35
3.1.2	Messung der Stabilität von Nanoemulsionen	36
3.2	NMR Experimente und Parameter	37
3.3	Kolloidale Modellpartikel für den Transfer	39
4	Ergebnisse und Diskussion	45
4.1	Stabilität von Wasser in Öl Emulsionen	45
4.1.1	Interpretation der Instabilität	56
4.1.2	Fazit zu der Emulsionsstabilität mit DPPC	64
4.2	Bestimmung von Tropfengrößenverteilungen mit NMR	66
4.2.1	Vergleich des etablierten Modells mit der Regularisierung	66
4.2.2	Interpretation von Nanoemulsionen mit PFG-NMR	70
4.3	Transfer kolloidaler Feststoffpartikel	75
4.3.1	Modell für den Transfer von Feststoffpartikeln	75
4.3.2	Experimente zum Transfer von Feststoffen unter Verwendung des Modells	81
4.3.3	Ablagerung und Transfer von makroskopischen Partikeln	82
4.3.4	Einfluss der Partikelgröße auf den Transfer	85
4.3.5	Transfer von kolloidalen Partikeln als Agglomerate	88
4.3.6	Schlussfolgerungen für den Transfer von Emulsionen	90
5	Schlussfolgerungen und Ausblick	93
	Literaturverzeichnis	99
	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	110

Anhang	113
A.1 Daten zu Versuchen des Transfers von Feststoffpartikeln	113
A.2 Daten zu Versuchen des Transfers von Feststoffpartikeln	114
Publikationsliste	116

1 Einleitung

1.1 Motivation und Fragestellung

Für einen therapeutischen Einsatz sollen pharmazeutische Wirkstoffe in der Regel möglichst spezifisch sein, um Nebenwirkungen zu minimieren. Insbesondere in der Onkologie werden toxische Wirkstoffe verwendet, um die erkrankten Zellen zu inhibieren. Wenn Wirkstoffe jedoch nicht die malignen Zellen erreichen oder die gesunden Zellen in Mitleidenschaft ziehen, sinkt der Wirkungsgrad oder negative Effekte treten hervor. Die englischen Begriffe drug delivery system und drug carrier beschreiben den Transportweg und die Transportart zum Zielort des Wirkstoffes. Die Mehrzahl der Pharmazeutika wird parenteral, z.B. durch direkte Injektion in die Blutbahn verabreicht. Dabei muss insbesondere die Stabilität des Wirkstoffes in der Blutbahn beachtet werden und die Konzentration in einem nicht-toxischen, aber wirksamen Bereich gehalten werden. Weiterhin wird der Wirkstoff im gesamten Körper verteilt und reichert sich nicht spezifisch im Zielgewebe an. Ein weit verbreiteter Träger oder Carrier sind Liposomen. Bei Liposomen handelt es sich um kleine Bläschen, ähnlich den körpereigenen Transportvesikeln, die über eine Membran aus einer Doppellipidschicht verfügen. Liposomen können als Transportbehälter für Wirkstoffe dienen. Durch eine Funktionalisierung der Lipidschicht können positive Effekte genutzt werden: Beispielsweise kann bei der richtigen Zusammensetzung der Membran die Immunantwort abgeschwächt werden, somit kommt es langsamer zu unerwünschter Klärung im Blut. Weiterhin kann die Oberfläche modifiziert werden, um den Wirkstoff spezifischer in oder an den malignen Zellen freizusetzen. In Summe gibt es durch die Verkapselung des Wirkstoffes in Liposomen eine Vielzahl von Vorteilen.

Während Liposomen als solche mit relativ geringem Aufwand herzustellen sind, ist es eine Herausforderung eine hohe Wirkstoffeinkapselung in diesen Vesikeln zu realisieren. Bei der Herstellung über klassische Verfahren ist der Anteil an eingekapseltem Wirkstoff so gering, dass eine weitere Aufarbeitung nötig ist und

ein großer Teil des oftmals wertvollen Wirkstoffes verloren geht. Weiterhin finden vielfach organische Lösemittel Anwendung oder es werden hohe Scherkräfte genutzt, die für pharmazeutische Prozesse und Moleküle ungeeignet sind. Nur wenige der bekannten Verfahren sind einfach auf einen industriellen Maßstab skalierbar.

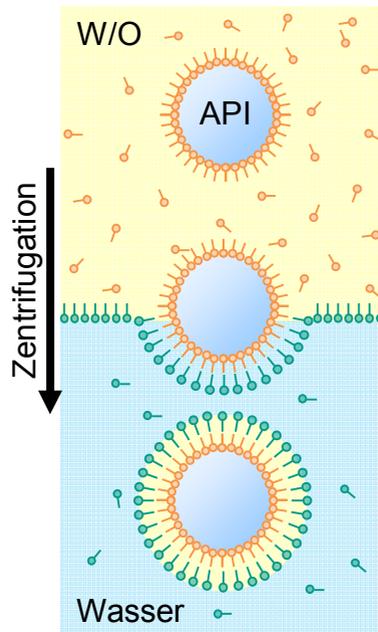


Abbildung 1.1: Prinzipskizze für die Herstellung von Liposomen aus W/O Nanoemulsionen. Der Wirkstoff (active pharmaceutical ingredient, API) wird in den wässrigen Emulsionstropfen vorgelegt. Beim Transfer der Tropfen durch Zentrifugation wird die zweite Lipidschicht aufgebaut.

Ein vielversprechender Ansatz ist der Transfer von Emulsionstropfen mittels Zentrifugation in eine sekundäre wässrige Phase, wie in Abbildung 1.1 dargestellt. Das Konzept beruht dabei auf einer Vorlage in Form einer Wasser-in-Öl (W/O) Emulsion, deren Tropfen den hydrophilen Wirkstoff beinhalten. Durch Zentrifugation der Emulsion erfahren die Tropfen eine gerichtete Beschleunigung. Treffen die Emulsionstropfen auf eine kontinuierliche wässrige Phase mit ausreichender Menge Emulgator, so treten diese aus dem Öl über und erzeugen somit Liposo-

men. Da Liposomen per Definition und aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften vornehmlich aus Phospholipiden bestehen, sind diese auch zwingend als Emulgator für die WO Emulsion zu nutzen. Weiterhin sind für die Anwendung im pharmazeutischen Bereich besondere Anforderungen an die Apparate, Chemikalien und Eigenschaften gefordert. Sollen die Liposomen parenteral appliziert werden, so sind die Anforderungen an den Herstellungsprozess sowie die zu erzielende Größe der Wirkstoffvesikel am anspruchsvollsten.

Der Ansatz Liposomen aus Emulsionen herzustellen, wird seit den 70er Jahren diskutiert und wurde seitdem mehrfach von verschiedenen Wissenschaftlern und Gruppen wieder aufgegriffen und weiterentwickelt, wie ausführlicher im Kapitel zum Stand der Technik dargestellt. Ziel dieser Arbeit ist, auf Basis der veröffentlichten Daten, den Prozess weiter zu charakterisieren und bekannte Limitierungen zu lösen, sowie gegebenenfalls den Prozess auf eine kontinuierliche Herstellung von Liposomen auszulegen.

1.2 Ansätze zur Prozessoptimierung und Zielstellung

Die Zielstellung der hier vorliegenden Dissertation ist es die bekannten Limitierungen des Herstellungsprozesses im Hinblick auf eine Anwendung im pharmazeutischen Bereich zu prüfen. Dabei kann als Arbeitshypothese folgendes formuliert werden:

Liposomen für pharmazeutische Zwecke, wie parenterale Applikationen, müssen im Größenbereich von 100-300 nm liegen. Ist eine Herstellung solcher geeigneten Liposomen durch den Transfer von WO Emulsionstropfen möglich? Es ist zu erwarten, dass im genannten Größenmaßstab die Grenzflächenkräfte die Emulsion und den Transfer stärker beeinflussen, als es für konventionelle, größere Tropfen der Fall ist. Es gilt zu prüfen, ob und wie dieser Effekt die Emulsionsstabilität und den Transfer beeinflusst.

Der Prozess des Phasentransfers von Flüssigkeitstropfen zur Herstellung von Liposomen kann systematisch in Teilabschnitte gegliedert werden, die thematisch sinnvoll einen Aspekt beleuchten und detailliert den interdisziplinären Prozess aufschlüsseln. Diese Einteilung ist hilfreich, die hier vorgestellte Arbeit strukturiert darzustellen und gibt somit die Gliederung der schriftlichen Ausarbeitung vor. Ebenso können daraus Ziele formuliert werden, die zur Optimierung des Prozesses als sinnvoll zu erachten sind. Jeder der Aspekte kann kritisch für die Realisation sein.

- 1) Verbesserung der Emulsionen. Die Emulsionen bilden die Basis, eine Vorlage für die Liposomen. Sie müssen ausreichende temporäre Stabilität und gewünschte Tropfengrößenverteilung aufweisen.
- 2) Verständnis der Adsorption von Phospholipiden an die Grenzflächen. Grenzflächenkräfte bestimmen die oben genannten Emulsionen und geben Aufschluss über die Konformation der Moleküle. Die Tensiometrie ist eine wichtige Messtechnik in diesem Zusammenhang.
- 3) Emulsionscharakterisierung. Neben gut etablierten, zumeist optischen Messmethoden zur Bestimmung der Tropfengrößenverteilungen und potentiell weiterer Parameter wurde mit der NMR Diffusometrie eine sehr moderne Methode evaluiert und weiterentwickelt.

- 4) Gelbildung. Phospholipide neigen bei bestimmten Bedingungen zur Gelbildung, was generell negative Auswirkungen auf den Prozess und die Emulsionen haben könnte und vermieden werden sollte.
- 5) Transfer von Kolloiden. Der Durchtritt von kolloidalen Tropfen oder Partikeln zwischen zwei flüssigen Phasen ist kritisch für den Prozess. Partikel können verformt werden oder an der Grenzfläche verbleiben.
- 6) Eigenschaften der Liposomen. Die Liposomen bilden das Zielprodukt der Herstellung. Größe, Asymmetrie der Membran und Einkapselungseffizienz sind wichtige Parameter, um den Erfolg zu quantifizieren.
- 7) Kontinuierliche Herstellung. Für eine industrielle Anwendung ist der Ausblick auf eine mögliche kontinuierliche Herstellung und Scale-Up von Interesse.

Das Gesamtverfahren ist somit sehr umfassend und wurde de facto interdisziplinär im Rahmen eines europäischen Projektes bearbeitet. Es ergaben sich dadurch verschiedene Arbeitspakete und Teilprojekte, um die oben beschriebenen Ziele systematisch aufzuarbeiten und eine Optimierung des Herstellungsverfahrens für Liposomen u.A. mit hohen Einkapselungseffizienzen und immunologischen Vorteilen für den Patienten zu erreichen.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt insbesondere auf drei Themen:

- der Charakterisierung der Instabilität von WO Nanoemulsionen mit Phospholipiden,
- der Nutzung von NMR als moderne Messmethode an Emulsionen, und
- dem Transfer von Kolloiden zwischen Flüssigphasen am Beispiel eines Modellsystems.

Die ausführliche Erläuterung, Analyse und Einordnung in den Stand der Technik dieser drei Schwerpunkte sollen zusammen eine Einschätzung über die mögliche pharmazeutische Nutzung des Prozesses liefern.

2 Stand der Technik und Theorie

2.1 Liposomen

2.1.1 Aufbau

Liposomen sind kugelförmige Strukturen, ähnlich den körpereigenen Vesikeln, die ein Volumen von Wasser durch eine Doppelmembran aus Phospholipiden von dem umgebenden wässrigen Medium abtrennen. Die Membran besteht aus Phospholipiden (PL), welche entsprechend ihrer amphiphilen Eigenschaften die hydrophoben Ketten zusammenlagern und die hydrophilen Kopfgruppen exponieren. Die somit entstehenden Doppelschichten können einzeln auftreten und ein monolamellares Vesikel bilden, das je nach Größe als „giant“ >1000 nm, „large“ >100 nm oder „small unilamellar vesicle“ 20-100 nm (GUV, LUV und SUV) bezeichnet wird. Möglich sind auch multilamellare Strukturen, die entsprechend als MV bezeichnet werden oder Einschlüsse von mehreren Vesikeln, sogenannte „multivesicular vesicle“ (MVV) [1]. Unterhalb der Größe von 20nm sind aufgrund der starken Krümmung und Größe der Phospholipide einfachere Strukturen, Mizellen, zu finden, deren hydrophobe Gruppen direkt zusammengelagert sind. In hydrophoben Medien bilden sich mitunter inverse Mizellen.

Die Doppelmembran aus Phospholipiden hat analog zum biologischen Pendant einige Eigenschaften, welche aus der speziellen Zusammensetzung resultieren. Die Art und der Anteil der PL in den beiden Membranteilen kann voneinander abweichen. In einem solchen Fall spricht man von einer Asymmetrie der Membran. Mit der Zusammensetzung werden auch die Grenzflächeneigenschaft und die Oberfläche beeinflusst. Die Phospholipide unterscheiden sich in der Kettenlänge und Art der Kopfgruppe, die den hydrophoben oder hydrophilen Charakter der Schicht beeinflussen, indem etwa die Polarität oder Packungsdichte und letztendlich die Grenzflächenkräfte verändert werden. Weiterhin sind in biologischen Membranen Proteine, Zucker und andere Liganden verankert, die für die Funktio-

nalität wichtig sind und eine substantielle Rolle z.B. in der Immunantwort, Signaltransduktion und dem Intermembrantransport spielen.

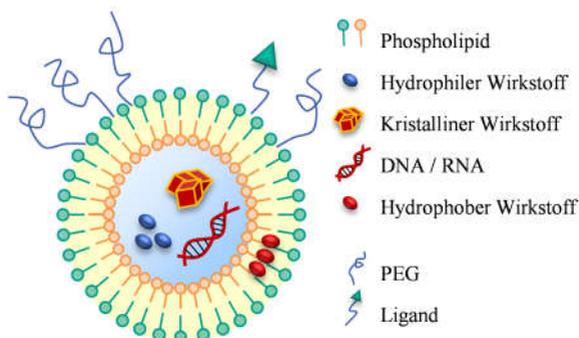


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Struktur eines Liposoms mit einer PL-Doppelmembran. In der inneren wässrigen Phase können hydrophile Wirkstoffe eingekapselt werden, während hydrophobe Stoffe in der Doppelschicht eingelagert werden können.

Diese strukturellen Unterschiede sind essentiell für die biologische und pharmazeutische Wirkung [2], die hier nicht im Detail aufgeführt wird, aber idealerweise durch den vorgestellten Prozess adressiert werden sollte. Einfache Liposomen verfügen nicht zwangsläufig über alle hier abgebildeten Gruppen, aber die vielfältige Funktionsweise eines Liposoms bildet die Basis für deren breite pharmazeutische Verwendung und Relevanz.

2.1.2 Pharmazeutische Verwendung

Die pharmazeutische Verwendung von Liposomen liegt in der Nutzung als Transportbehälter für Wirkstoffe. Die Einkapselung von Wirkstoff bietet vielfache Vorteile durch eine mögliche gezielte Freisetzung, Dosierung oder Schutz vor Degradation, was an einem Beispiel aus der Krebstherapie einfach erläutert werden kann. Der Patient wird dabei durch maligne Zellen bedroht, die in der Behandlung zu entfernen oder deren Wachstum zu hemmen sind, etwa durch ein Zelltoxin. Das Toxin sollte möglichst spezifisch wirken und nur die kranken Zellen betreffen, sonst sind weitreichende Nebenwirkungen die Folge. Wird der Wirkstoff direkt in den Blutkreislauf appliziert, so verteilt er sich unspezifisch im Körper, kann zudem eine starke Immunantwort hervorrufen und somit frühzeitig abgebaut werden oder gesundes Zellgewebe zerstören. Durch die Einkapselung in

Liposomen kann der Wirkstoff im Blut höhere Verweilzeiten erreichen und zielgerichtet zum Tumorgewebe transportiert werden. Die Oberfläche der Kapseln kann durch spezielle Liganden oder Antikörper modifiziert werden, sodass eine Aktivierung des Immunsystems und die folgende Degradation z.B. durch Makrophagen unterbunden wird. An den Zielzellen können die Liposomen gezielt den Wirkstoff freisetzen. Dies kann durch Temperatur oder pH-basierte Mechanismen bis hin zur spezifischen Aufnahme durch antikörperbasierte Reaktionen erreicht werden [3,4].

Eingekapselt werden können verschiedene Wirkstoffe, wie Proteine in Form von Enzymen oder Antikörpern, einzel- oder doppelsträngige RNA und andere molekulare Wirkstoffen [1,5–8]. Es gibt sowohl die Nutzung in dermalen Produkten, als auch enteral, jedoch steht der parenterale Gebrauch hier im Vordergrund. Die Größe der Kapsel muss dabei 200-300 nm betragen, da sonst kein pharmazeutischer Nutzen mit passiver oder aktiver Aufnahme der Liposomen im Zielgewebe stattfinden kann [9,10]. Es gibt mehrere etablierte Medikamente die Liposomen nutzen, wie Doxorubicin oder Vincristin, die seit Jahren auf dem Markt verkauft werden [11–13]. Weiterhin werden Liposomen unter Anführung der Biokompatibilität und Reservoir-eigenschaft in der Kosmetik eingesetzt.

2.1.3 Etablierte Herstellungsverfahren

Die ersten etablierten Herstellungsverfahren sind eng verwoben mit der wissenschaftlichen Entdeckung der Liposomen durch Bangham *et al.* [14]. Einfache Liposomen formen sich in polaren Lösemitteln wie Wasser durch Zugabe von Phospholipiden direkt oder unter geringer Energieeinwirkung zu inhomogenen lamellaren Strukturen, die jedoch keine gute technische Nutzung zulassen. Die erste dokumentierte Methode nach Bangham wird oft als „Filmmethode“ bezeichnet, bei der durch Trocknung an einer Glaswand ein kontinuierlicher Lipidfilm gebildet wird. Dieser Film kann, je nach Menge der Lipide, typischerweise durch Wasser aufquellen, wobei sich multilamellare Liposomen bilden. Die so gebildeten Liposomen können durch weitere Verfahren, wie Extrusion, Ultraschall oder Frost-Tau Zyklen auf die gewünschte Größe und Lamellarität gebracht werden [15–19]. Problematisch ist dabei vor allem eine effiziente Beladung mit Wirkstoff, da bei diesen Verfahren der Wirkstoff in der kontinuierlichen Phase gelöst wird und nur das proportionale Verhältnis des Volumens eingekapselt wird, welches in den Kapseln liegt, ergo wenige Prozent. Dadurch ist nachfolgend eine weitere

Aufreinigung der Formulierung nötig, die insgesamt zu einem untragbaren wirtschaftlichen Verlust führt.

Die Beladung der Liposomen wird in aktive und passive Verfahren unterteilt. Die bereits genannte Filmmethode fällt dabei unter die passiven Methoden, jedoch können die bestehenden Liposomen auch weiterverwendet werden und nach der Herstellung aktiv beladen werden. Dazu werden osmotische oder pH Gradienten durch die Verwendung von Salzen oder energieaufwändiger aktiver Transport durch die Membran mittels spezieller Proteine und Enzyme genutzt. Ein aktives Beladen der Liposomen ist derzeit sehr aufwändig und in der Regel nicht geeignet für eine industrielle Anwendung [20].

Weitere Verfahren zur Herstellung sind zumeist im Labormaßstab etabliert, wie etwa unter Nutzung von Mikrochips in der Mikrofluidik. Es können extrem homogene Liposomen hergestellt werden, die für wissenschaftliche Zwecke sehr geeignet sind. Eine Produktion wäre nur durch großskalige Parallelisierungen denkbar. Weitere Verfahren, die Hochdruckhomogenisation und Ultraschall nutzen, sind gut skalierbar, unterscheiden sich jedoch im Produkt der Filmmethode und bieten keine Möglichkeit zur direkten Beladung der Liposomen. Auch bekannt sind Verfahren, die sekundäre Lösemittel nutzen, wobei durch Eintropfen in Wasser eine rasche Verdünnung stattfindet oder nachträglich das Lösemittel verdampft wird. Die Verfahren liefern valide Ergebnisse und werden durch die Wahl und Art des Lösemittels limitiert, was insbesondere für pharmazeutische Anwendungen kritisch ist. Insgesamt sind alle bekannten Verfahren kompetitiv und müssen einzeln auf ihre Vor- und Nachteile hin bewertet werden. Die Vielzahl der Möglichkeiten und Anzahl der Forschungsprojekte verdeutlichen, dass sich bisher kein Verfahren als Optimum durchsetzen konnte, trotz der hohen Relevanz für Wissenschaft und Industrie.

2.2 Emulsionen

2.2.1 Struktur

Bei Emulsionen handelt es sich um eine stabile Mischung von zwei Flüssigkeiten, welche nicht oder nur sehr gering ineinander löslich sind. Dabei liegt eine Flüssigkeit als Tropfen vor, die disperse Phase, welche in der zweiten Flüssigkeit, der kontinuierlichen Phase, verteilt ist. In der Regel handelt es sich bei den Flüssigkei-

ten um ein Öl, hydrophob und unpolar, und eine wässrige Phase, hydrophil und polar. Die meisten pharmazeutischen Emulsionen sind Öl in Wasser (OW) Systeme, aber insbesondere in Lebensmitteln gibt es viele Beispiele für Wasser in Öl (WO) Emulsionen. Durch die Mischung in kolloidaler Form benötigt das System viel Energie, da eine sehr große Grenzfläche zwischen den beiden Phasen vorliegt. Das System ist immer bestrebt in den thermodynamisch stabilen Zustand zurückzukehren, d.h. sich zu entmischen. Eine direkte Folge davon sind kugelförmige Tropfen, da sich bei dieser Form die Fläche minimiert, und eine limitierte Haltbarkeit der Emulsion, die zwischen Minuten und Stunden, aber auch bis zu Jahren liegen kann. Damit es tatsächlich zu solchen längeren Zeitspannen kommen kann, muss die Emulsion mittels eines Emulgators stabilisiert werden. Dieser beeinflusst die Grenzflächenspannung und ermöglicht somit eine stabilere Emulsion.

Die Tropfengrößenverteilung ist einer der wichtigsten Parameter einer Emulsion. Rheologie, Haptik und Erscheinung sind von der Tropfenzahl, -größe und -verteilung abhängig, also indirekt von der Konzentration oder dem Volumen an disperser Phase.

2.2.2 Herstellung mit Ultraschall und Hochdruckhomogenisation

Bei Herstellung von Emulsionen muss im Allgemeinen Energie eingebracht werden, um die disperse Phase zu zerkleinern und neue Grenzflächen zu erzeugen. Diese Arbeit wird meist durch mechanische Energie eingebracht, in Form von Scherung. Ob die Scherung ausreicht, um einen Tropfen zu zerkleinern, hängt von der Strömung, der Zerreißspannung der Tropfen und erzeugter Grenzfläche ab. Klassischerweise kann das Emulgieren in mehrere Schritte eingeteilt werden, unabhängig vom genutzten Dispergierwerkzeug, siehe dazu Abbildung 2.2. Zunächst wird eine grobe Emulsion durch Schütteln oder Rühren hergestellt. Diese wird dann mit einem geeigneten Werkzeug weiter zerkleinert, das nach der Art und beabsichtigten Eigenschaft der Emulsion ausgewählt wird. Neu erzeugte Grenzflächen müssen im Anschluss rasch mit Emulgator belegt werden, um die Tropfen zu stabilisieren.

Sehr weit verbreitet sind Rotor-Stator Mixer, Hochdruckhomogenisatoren und Ultraschall dispergierer. Alle Verfahren bringen starke Strömungen in das Fluid, die dazu führen, dass grobe Tropfen weiter zerkleinert werden. Rotor-Stator Mischer erzeugen die Scherung zwischen einer ruhenden und einer bewegten Wand, sind sehr robust und eignen sich für Emulsionen mit Tropfengrößen bis zu einem Mikrometer. Für kleinere Tropfen reicht die erzeugte Scherung nicht aus. Hoch-

druckhomogenisatoren beschleunigen das Fluid und können bei sehr hohem Druck in einer Prallkammer extrem hohe Scherkräfte erreichen, die auch für Nanoemulsionen geeignet sind. Die Geometrie der Düse oder Prallkammer sind dabei neben dem Druck die entscheidenden Faktoren. Die mittlere Verweilzeit in der Düse ist sehr kurz, was für den Einsatz in der Lebensmittelverfahrenstechnik genutzt wird, um biologische Komponenten zu schonen. In der Regel wird die Emulsion mehrfach zirkuliert, bis die gewünschte Tropfengröße erreicht wird. Ultraschall erzeugt an der Spitze der Sonotrode Kavitation. Die eingetragene Energie kann dadurch groß genug sein, um Nanoemulsionen herzustellen. Die Verweilzeit hängt dabei stark von der Bauart ab, da entweder feste Volumina oder Durchflusszellen genutzt werden können. Alternativ gibt es auch Verfahren in der Mikrofluidik mit Membranen oder Mikrokanälen, die sehr definierte Einzeltropfen bei geringem Durchsatz ermöglichen.

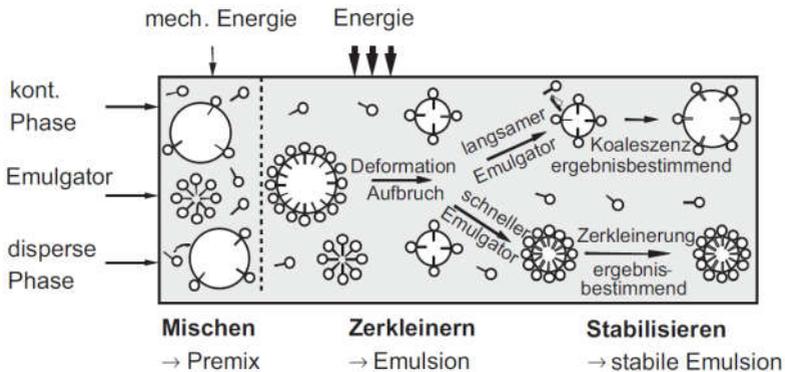


Abbildung 2.2: Phasen der Herstellung einer Emulsion mit Energieeintrag und Belegung der Grenzflächen [21]

Unmittelbar nach dem Dispergieren müssen die neuen erzeugten Grenzflächen möglichst schnell mit Emulgator belegt werden, um eine direkte Separation zu vermeiden. Hier spielt der Konzentrationsgradient, beziehungsweise die Diffusion des Emulgators, eine große Rolle. Die zerteilten Tropfen sind durch den Dispergiervorgang stark in Bewegung und stoßen häufig zusammen, was Koaleszenz begünstigt. Werden die Grenzflächen schnell vom Emulgator belegt, kann dieser der Koaleszenz entgegenwirken.

2.2.3 Instabilitätsmechanismen

Emulsionen sind thermodynamisch instabil und entmischen sich bis zur kompletten Phasenseparation, wenn kein Emulgator zugesetzt wird. Der Emulgator bedeckt die Grenzflächen und senkt durch seine amphiphile Struktur mit polarer und hydrophober Seite im jeweiligen Medium die Grenzflächenspannung zwischen den Fluiden. Dieser Effekt ist hauptverantwortlich für die Stabilisierung einer Emulsion, allerdings sind ebenso die Viskosität der kontinuierlichen Phase, der Dispersphasenanteil, die Dichtedifferenz der Fluide, die Tropfengröße und -verteilung, sterische Hinderung und Oberflächenladung durch den Emulgator sowie der osmotische Druck relevant [22].

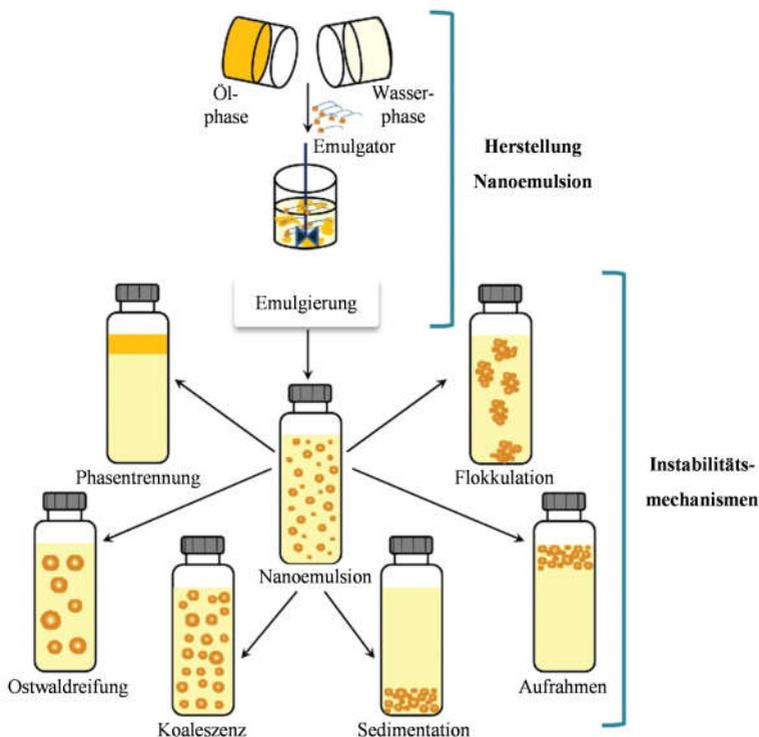


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Herstellung und Instabilität einer Emulsion aus Karthik et al [23].

Die Hauptmechanismen für die Instabilität einer Emulsion sind Koaleszenz und Ostwaldreifung, wie in Abbildung 2.3 dargestellt. Unter Koaleszenz versteht man die Vereinigung von zwei Tropfen. Voraussetzung für Koaleszenz ist das Aufeinandertreffen von Tropfen. Diese Bewegung wiederum ist abhängig von der Viskosität des umgebenden Mediums und der Größe eines Tropfens, da sich die angeströmte Fläche und thermische Bewegung auf die Stoßwahrscheinlichkeit auswirkt. Ebenso ist die Anzahl der Tropfen, also der Dispersphasenanteil, wichtig, da es bei wenigen Tropfen zu fast keinen Stößen kommen kann. Der Emulgator bildet bei einem Stoß die letzte Barriere, entweder durch rein sterische Hinderung mit langen Molekülgruppen oder durch elektrostatische Abstoßung bei glei-

chen Ladungen auf der Oberfläche. Das Zetapotential beschreibt die Ladung an der Schergrenze der Partikel oder Tropfen, wie durch die DLVO (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) Theorie hergeleitet. Stabile Emulsionen sollten über ein hohes Zetapotential verfügen, jedoch ist es nicht das einzige Kriterium. Der zweite wichtige Mechanismus ist die Ostwald Reifung, nach Wilhelm Ostwald, bei dem per Diffusion Moleküle von kleineren zu größeren Tropfen wandern. Voraussetzung ist eine leicht inhomogene Tropfengrößenverteilung, die in den kleineren Tropfen einen höheren Kapillardruck, wie durch die Young-Laplace Gleichung beschrieben, bewirkt. Obwohl beide Fluide als nicht mischbar und nicht ineinander löslich gelten, können Moleküle der dispersen Phase durch die kontinuierliche Phase diffundieren, um den Potentialunterschied zwischen den Tropfen auszugleichen. Entsprechend lösen sich die kleineren Tropfen zugunsten der Größeren auf. Der Ostwaldreifung kann z.B. durch den Zusatz von Salzen entgegen gewirkt werden, da diese den osmotischen Druck verändern und somit den Kapillardruck erhöhen. Die Zeitskala für Phasenseparation durch Ostwaldreifung liegt aufgrund der zugrunde liegenden Diffusion in wesentlich höheren Bereichen als für Koaleszenz.

Zu den Instabilitätsmechanismen von Emulsionen zählen auch das Aufrahmen und die Sedimentation, sowie die Flokkulation. Das Auf- oder Absteigen von Tropfen wird durch die Dichtedifferenz der Fluide verursacht, welche im Interesse einer guten Stabilität möglichst gering sein sollte. Der Effekt ist insbesondere für größere Tropfen relevant, da bei diesen die zuvor genannten Oberflächenkräfte verhältnismäßig wenig Einfluss haben. Das Aufrahmen und die Sedimentation sind zwar meist reversibel durch geringen Energieeintrag, wie das Schütteln der Probe, begünstigen jedoch Koaleszenz und Ostwaldreifung, da die Tropfen wesentlich dichter gepackt werden und die Stoßwahrscheinlichkeit erhöht, bzw. die Diffusionsstrecke verkürzt wird. Flokkulation beschreibt das Zusammenlagern von mehreren Tropfen zu größeren Clustern, ohne dass diese direkt verschmelzen. Grund dafür sind mangelnde abstoßende Kräfte auf der Oberfläche der Tropfen oder eine Komplexbildung, was in der gezielten technischen Anwendung durch den Zusatz weiterer Hilfsstoffe erreicht wird, bei Emulsionen jedoch unerwünscht ist. Die resultierenden größeren Cluster tendieren stärker zur Sedimentation oder zum Aufrahmen, sowie final zu einer kompletten Phasenseparation durch Koaleszenz und Ostwaldreifung.

2.2.4 Stabilität von Emulsionen mit Phospholipiden

Wasser in Öl (WO) Emulsionen werden regelmäßig in vielen Lebensmitteln, Pharmazeutika und Kosmetika benutzt. Normalerweise werden diese dispersen Systeme durch eine Steigerung der Viskosität stabilisiert, sodass die Tropfen fast komplett immobilisiert werden. Phospholipide (PL) sind weit verbreitete Emulgatoren, die aus natürlichen, nachhaltigen Quellen gewonnen werden [24] und aufgrund ihrer Biokompatibilität und Vorkommen im menschlichen Körper und anderen Organismen als sichere „Generally Recognized as Safe“ (GRAS) Substanz von der Food and Drug Administration (FDA) [25] beurteilt werden. PL werden meist als Emulgator für die wesentlich gängigeren Öl in Wasser (OW) Emulsionen eingesetzt, zeigen aber für die Verwendung in WO Emulsionen eine Reihe von unerklärten Stabilitätsproblemen. Diese Tatsache widerspricht der Erwartung aus dem charakteristischen Wert des „hydrophilic-lipophilic balance“ (HLB), der mit einem Wert von 5 für Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) eine gute Eignung für WO Emulsionen vorhersagt [26]. Weitere Argumente, die die Nutzung als WO Emulgator zu erforschen, sind die hohen Löslichkeiten von Phospholipiden in den meisten Ölphasen und deren molekulare Struktur. Letzteres ist insofern interessant, weil die Geometrie einem Zylinder oder Kegel entspricht, abhängig von der Sättigung der Fettsäureketten und der Größe der hydrophilen Kopfgruppe. Die Form der meisten PL eignet sich stärker für WO als für OW Emulsionen, wenn die Krümmung der Grenzfläche beachtet wird – ein Widerspruch, der bisher nicht hinreichend in der Literatur geklärt wurde [27]. WO Emulsionen, bestehend aus zwei niederviskosen Phasen und Phospholipiden als Emulgator, werden regelmäßig als instabil bezeichnet [24,28]. Eine Generation von neuen, stabilen WO Emulsionen würden eine Bandbreite von innovativen Applikationen und Produkten im Bereich von Pharma und Lebensmitteln eröffnen.

Die Stabilität von Emulsionen wird sowohl durch den Emulgator an der Grenzfläche zwischen kontinuierlicher und disperser Phase, als auch durch die Viskosität der kontinuierlichen Phase und Dichtedifferenz der nicht mischbaren Phasen bestimmt [29]. Während der Entstehung der Emulsion ist die Diffusionsgeschwindigkeit des Emulgators an die Grenzfläche entscheidend für die initiale Belegungsdichte und damit die Stabilität der Emulsion [30]. PL haben ein Molekulargewicht von 700 bis 800 g/mol und diffundieren damit wesentlich langsamer als andere gebräuchliche Emulgatoren, wie z.B. SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) mit einem Molekulargewicht von 288 g/mol. Die Dauer und Effizienz des Emulgierprozesses sind ausschlaggebend für die Auswahl des Emulgators und umgekehrt.

Mechanische Methoden variieren signifikant, abhängig von dem physikalischen Prinzip und der Verweilzeit, in dem Energieeintrag und der -dichte. Dispergierwerkzeuge wie Rotor-Stator Mixer weisen einen relative niedrigen Energieeintrag auf, während Hochdruckhomogenisatoren und Ultraschallsonotroden über sehr hohe Energiedichten verfügen und damit besonders für sehr schnelle Emulgatoren geeignet sind [31]. Während der Ultraschallbehandlung wird die Probe kontinuierlich im Batch gemischt oder durch eine Durchflusszelle geleitet [32,33], während bei der Hochdruckhomogenisation die Anzahl der Durchläufe in Kombination mit dem Volumenstrom die Verweilzeit bestimmt. Die optimalen Prozessparameter bei Homogenisatoren liegen im Druckbereich über 1000 bar mit sehr schnellen Volumenströmen, sodass die Verweilzeiten im Bereich $\ll 1$ s liegen [34,35] und selbst bei vielen Durchläufen keine großen Summen ergeben. Für die relativ geringe Geschwindigkeit der PL wird ein Prozess benötigt, der sowohl kleine Tropfen im Nanometerbereich ermöglicht, als auch lange Verweilzeiten zulässt. Obwohl die Hochdruckhomogenisation sehr kleine Tropfen erzeugen kann, ist sie ungeeignet für langsame Emulgatoren. Rotor-Stator Mixer erreichen keine Tropfengrößenverteilungen unterhalb von 1 μm . Ultraschall war daher das Mittel der Wahl mit der Möglichkeit die Verweilzeit ausreichend lang einzustellen und hohe Scherkräfte über kurze Intervalle in die Probe einzutragen.

Die Adsorptionskinetik eines Emulgators in einem flüssig-flüssig Zweiphasensystem kann mittels „profile analysis tensiometry“ (PAT) bestimmt werden [36–38]. Aus dieser zeitabhängigen Messung der dynamischen Grenzflächenspannung können weiterhin die kritische Aggregationskonzentration (CAC) eines PLs in der Ölphase und die minimale Fläche pro Molekül an der Grenzfläche bestimmt werden.

Nanoemulsionen auf Basis von Wasser, Squalen und DPPC werden hier als repräsentatives System für pharmazeutische Emulsionen genutzt [39]. Squalen wird u.a. als Zusatzstoff zur Steigerung der Wirksamkeit in Impfmitteln verwendet und zunehmend wichtiger für Emulsionen [40]. Abgesehen von der Nutzung von Wasser/Squalen Systemen in der Pharmazie und Kosmetik, können WO Emulsionen in der hier gezeigten Anwendung als Vorstufe für Liposomen eingesetzt werden [41,42]. WO Emulsionen mit Phospholipiden werden des Weiteren verstärkt in der digitalen Mikrofluidik eingesetzt, um biologische Milieus nachzuahmen [43].

Experimente haben gezeigt, dass DPPC und POPC, welche beide regelmäßig als Standard für Membranlipide genutzt werden, sehr unterschiedliche CAC und Grenzflächendichte aufweisen, da die gesättigten und ungesättigten Ketten verschieden mit der organischen Phase interagieren [44]. Die Fähigkeit die Grenzflächenspannungen im Gleichgewichtszustand auf ein Minimum herabzusenken ist für beide PL ähnlich, sodass beide Kandidaten für Nanoemulsionen geeignet wären. Die morphologische Struktur und Löslichkeit unterscheiden sich, was einen Einfluss auf die Stabilität an der Grenzfläche haben kann. In Zahlen ausgedrückt, liegt die CAC von DPPC bei 0,103 mM, während POPC eine 12-fach so hohe CAC mit 1,256 mM aufweist, also auch eine höhere molekulare Löslichkeit hat. Die Packungsdichte der Lipide an der Öl-Wasser Grenzfläche differieren mit einer eingenommenen Fläche von 44 \AA^2 pro Molekül für DPPC und 119 \AA^2 pro Molekül für POPC, wobei DPPC weiterhin Hinweise auf Multischichtstrukturen an der Grenzfläche aufzeigt [44,45].

Ein Ziel dieser Arbeit ist den Instabilitätsmechanismus der WO Emulsionen mit PL zu erklären und physikalische Modelle für die kurze Haltbarkeit der Systeme zu finden. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnten neuartige Formulierungen mit angebrachten Stoffeigenschaften, geeigneten Mengen und angepassten Methoden entwickelt werden. Dies ist nötig um stabile WO Emulsionen mit den erwünschten Tropfengrößenverteilungen für eine parenterale Nutzung herzustellen [46].

2.2.5 Charakterisierung der Instabilitätsmechanismen

Die beiden Instabilitätsmechanismen Koaleszenz und Ostwaldreifung gelten als hauptverantwortlich für die Änderung der Tropfengrößenverteilung in Nanoemulsionen. Um festzustellen, welcher Instabilitätseffekt bei einer Emulsion vorliegt, kann die Änderung in der Tropfengrößenverteilung über die Zeit analysiert werden. Dazu gibt es die im Folgenden erklärten Ansätze zu dem spezifischen Wachstum.

2.2.5.1 Ostwaldreifung

Die radiusabhängige Löslichkeit $S(r)$ einer Substanz in Tropfen einer kolloidaler Dispersion ist abhängig von der Löslichkeit an einer geraden Grenzfläche, also einer Kugel mit unendlichem Radius $S(\infty)$ [47]:

$$S(r) = S(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rRT}\right). \quad (2-1)$$

Mit der Grenzflächenspannung γ zwischen den Phasen, dem molaren Volumen der dispersen Phase V_m , der universellen Gastkonstante R und der absoluten Temperatur T . Das Verhältnis der Löslichkeiten wird als Ostwaldgleichung bezeichnet. Lifshitz, Slyozov und Wagner leiteten daraus eine Wachstumsrate der Tropfen für die Ostwaldreifung her:

$$\omega = \frac{d}{dt} \left(r_c^3 \right) = \frac{8D S(\infty) V_m}{9 RT}, \quad (2-2)$$

mit dem kritischen Radius eines stabilen Tropfens r_c und dem Diffusionskoeffizienten der dispersen in der kontinuierlichen Phase D . Ostwaldreifung kann durch den Zusatz von Additiven, welche einen höheren osmotischen Druck in den Tropfen erzeugen, gemindert werden [48,49].

2.2.5.2 Koaleszenz

Für das Wachstum von Tropfen durch Koaleszenz gibt es keinen allgemeingültigen Ansatz [24]. Deminiere [50] nahmen eine Wachstumsrate basierend auf dem folgenden Differential an:

$$dN = -f A dt; \quad (2-3)$$

wobei die Fläche $A = N \pi d^2$ die gesamte Kontaktfläche ist, $N = 6 V / (\pi d^3)$ die Anzahl der Tropfen vom Durchmesser r , mit einem Volumen V der dispersen Phase und der Frequenz der Koaleszenz f . Deminiere [50] beschrieben die Entwicklung der Tropfengrößen basierend auf der anfänglichen Größe als

$$\frac{1}{d^2} = \frac{1}{d_0^2} - \frac{\pi}{3} f t. \quad (2-4)$$

Diese Lösung führt jedoch zu imaginären Lösungen für den Tropfenradius bei hohen Zeiten, da die Annahme getroffen wird, dass die Frequenz der Tropfenkollisionen f unabhängig von dem Tropfenradius ist.

Andere Ansätze argumentieren, dass das Tropfenwachstum im Falle von Koaleszenz von Nanopartikeln ebenso auf der Brown'schen Molekularbewegung beruht und daher mit r^3 skaliert [51,52]. Für das Verschmelzen der Tropfen ist eine starke Annäherung oder Kollision nötig, daher sind sowohl die Konzentration, als auch die Mobilität der Tropfen wichtig. Koaleszenz findet meistens nach Flokkulation oder Aufrahmung statt und ist, aufgrund der Abhängigkeit von hydrodynamischen und mechanischen Kräften in Kombination mit allen Molekülen an der Grenzfläche, sehr komplex [53]. Ostwaldreifung und Koaleszenz sind schwierig zu unterscheiden, da beide zu Tropfenwachstum führen, allerdings kann es im Falle von reiner Koaleszenz über lange Zeiträume zu heterogenen Verteilungen kommen, während die Ostwaldreifung eher zu homogenen Verteilungen neigt [54,55].

2.3 Messtechnik in Bezug auf Liposomen und Emulsionen

2.3.1 Tensiometrie

Die Grenzflächenspannung kann mit verschiedenen Verfahren bestimmt werden. Dabei wird entweder die Kraft für eine Veränderung der Fläche gemessen oder geometrisch die Verformung eines Tropfens. Per Definition ist die Grenzflächenspannung die Arbeit, die nötig ist um eine Fläche zu erzeugen oder alternativ die Kraft, die auf einer Länge wirkt. Zu den gebräuchlichen Tensiomern gehören bei Messung der Kraft die Bügel-, Ring- oder Plattenmethode, bei denen die Kraft auf einer Strecke gemessen wird. Zu den optischen Methoden gehören Kontaktwinkelmessung, die Tropfenprofilanalyse (PAT), rotierende Tropfenanalyse und dynamische Volumenzillation. Die beiden zuerst genannten optischen Methoden wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die Grenzflächenspannung zwischen zwei oder drei Phasen zu bestimmen. Die Kontaktwinkelmessung bestimmt den Winkel der Benetzung, woraus nach der Young'schen Gleichung die Grenzflächenspannung berechnet werden kann. Die Tropfenprofilanalyse nutzt einen Tropfen, der an einer Kapillaren innerhalb einer zweiten Flüssigkeit erzeugt wird. Die Form des Tropfens wird mit der Gauss-Laplace-Gleichung parametrisiert, um somit die Grenzflächenspannung zu bestimmen. Bei der Verwendung von Emulgatoren wird der neu erzeugte Tropfen entsprechend dem Adsorptionsgleichge-

wicht und der –kinetik belegt. Mithilfe der Gibbs-Adsorptionsisotherme kann die Flächendichte des Emulgators im Gleichgewicht bestimmt werden.

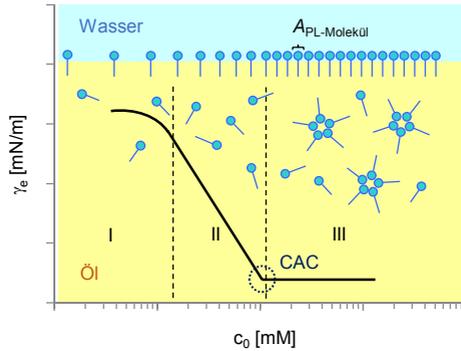


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Grenzflächenspannung im Gleichgewicht über die Konzentration mit der zugehörigen Grenzfläche und Belegung durch den Emulgator. Phase I stellt die molekulare Lösung des Lipids und erste Adsorption an der Grenzfläche dar. Bei steigender Konzentration (Phase II) senkt sich die Grenzflächenspannung bis es zu einer maximalen Belegung, der CAC kommt. Phase III zeigt eine gleichbleibende Grenzflächenspannung [56].

Die Tensiometrie liefert in Summe umfangreiche Ergebnisse zur Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens des Emulgators: die Grenzflächenspannung im Gleichgewicht, die Kinetik der Adsorption, die kritische Aggregationskonzentration und die Packungsdichte der Moleküle an der Grenzfläche. Diese Parameter können genutzt werden, um den Emulgierprozess entsprechend auszuwählen oder anzupassen und umgekehrt.

2.3.2 Stokes-Einstein Gleichung

Aufgrund der thermischen Energie kommt es zu einer ungerichteten Diffusion von Molekülen, auch bekannt als Brown'sche Molekularbewegung [57]. Der Diffusionskoeffizient D beschreibt die mittlere Diffusionsgeschwindigkeit für eine freie Diffusion und kann mit Hilfe der Smoluchowski-Einstein Gleichung beschrieben werden [58]

$$D = \frac{k_B \cdot T}{\mu} \tag{2-5}$$

So ist der Diffusionskoeffizient abhängig von der Boltzmann-Konstante k_B , der Temperatur T und der Interaktion μ mit der Umgebung, was unter Annahme der Reibung eines kugelförmigen Partikels des Radius r und Viskosität des umgebenden Mediums η zur Stokes-Einstein Gleichung führt

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r}. \quad (2-6)$$

Diese Gleichung kann somit den Zusammenhang der Bewegung und der Partikelgröße wiedergeben, was in diversen Messmethoden angewandt wird und in dieser Arbeit insbesondere in Bezug auf die Bestimmung der Tropfengrößenverteilung in Emulsionen mittels dynamischer Lichtstreuung und Magnetresonanzspektroskopie genutzt wird.

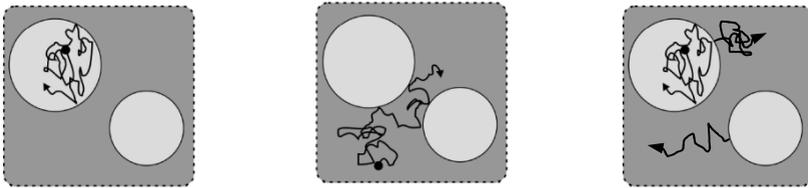


Abbildung 2.5: Skizze der möglichen Diffusionsbewegungen innerhalb der Geometrie einer Emulsion. Die thermische Bewegung lässt sowohl Diffusion in der dispersen, als auch kontinuierlichen Phase zu, mit Stößen an die Tropfenwände. Abhängig von der Größe können sich auch ganze Tropfen bewegen.

Dabei ist zu beachten, dass innerhalb einer Emulsion verschiedene Diffusionsphänomene auftreten können. Neben der freien und ungehinderten Diffusion kann es zu Restriktionen durch die Geometrie kommen. Moleküle der dispersen Phase können je nach Tropfengröße und zurückgelegter Strecke, bzw. Diffusionsdauer, Stöße an der Tropfenwand erfahren. Auch Moleküle in der kontinuierlichen Phase können an die Außenwände der Tropfen stoßen. Weiterhin unterliegen ab einer gewissen Größe die gesamten Tropfen einer Bewegung, die somit eine Vielzahl von Molekülen transportieren. Aufgrund von Stößen zwischen den Tropfen ist hier auch ein direkter Zusammenhang zur Konzentration an Tropfen und dem Dispersphasenanteil gegeben. Die Konzentrationsabhängigkeit beschränkt die Gültigkeit der Stokes-Einstein Gleichung auf hochdisperse Systeme, jedoch gibt es vielfach Ansätze, diese zu modifizieren [59].

Nützlich bei der Abschätzung der mittleren Diffusionsstrecken und Beurteilung des vorliegenden Ergebnisses ist die Formel der mittleren quadratischen Verschiebung, (engl.: root mean square displacement, RMSD)

$$RMSD(\tau) = \sqrt{2n \cdot D \cdot \tau}, \quad (2-7)$$

mit der vorliegenden räumlichen Dimension n und der Diffusionsdauer τ .

2.3.3 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) (engl.: Photon-Correlation-Spectroscopy, PCS) wird genutzt, um Partikelgrößenverteilungen in kolloidalen Systemen zu bestimmen. Das Messprinzip beruht dabei auf der Beobachtung der Lichtstreuung einer Suspension oder Emulsion. Die Probe wird dabei mit einem Laser bestrahlt, dessen Licht an den Partikeln in verschiedene Richtungen streut und in einem bestimmten Winkel, meist 90° , mit einem photosensitiven Detektor aufgenommen werden kann. Aufgrund der Bewegung der Teilchen verändert sich dabei das Streulichtsignal über die Zeit. Große Partikel sind entsprechend der Stokes-Einstein Gleichung einer geringeren Bewegung unterworfen, was zu weniger Fluktuation im Streulicht führt.

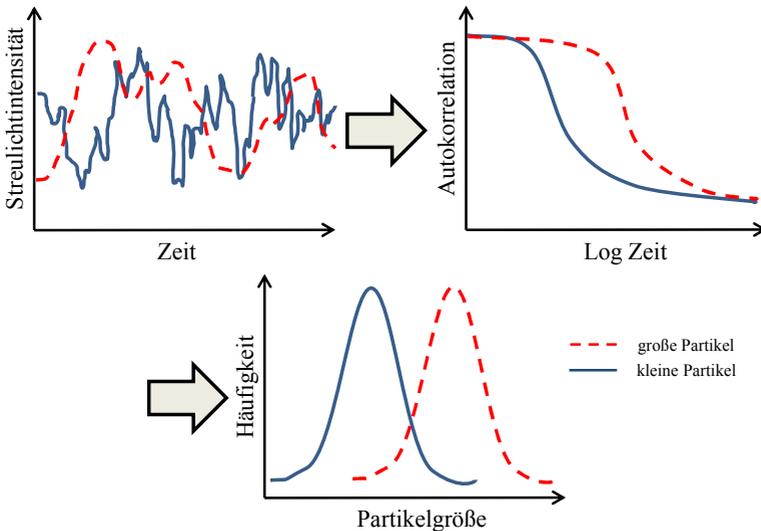


Abbildung 2.6: Darstellung der Auswirkung verschiedener Partikelgrößen auf die Änderung in der Streulichtintensität bei der Messung der dynamischen Lichtstreuung. Über die Analyse der Fluktuation kann die Partikelgröße bestimmt werden.

Die Auswertung der Änderungen im Streulicht wird über eine Analyse der Autokorrelationsfunktion durchgeführt, welche die Änderung in der Lichtstreuung wiedergibt. Die logische Abfolge der Analyse ist in Abbildung 2.6 dargelegt. Es gibt zwei übliche Verfahren die angewandt werden. Das Herkömmliche ist dabei die Analyse der Kumulanten nach ISO 13321, bei der ein Polynom dritter Ordnung an die Daten angepasst wird. Dies ergibt einen ausreichend guten Fit, wenn es sich um eine monomodale Verteilung handelt. Im Ergebnis erhält man eine mittlere Partikelgröße (auch Z-Average), die dem hydrodynamischen Äquivalentdurchmesser entspricht, da das Verfahren ursprünglich Bewegung feststellt. Weiter wird die Polydispersität, berechnet aus der Abweichung des Polynoms zu den tatsächlichen Messdaten, und die Signalintensität angegeben. Die Signalintensität basiert bei der Rayleigh Streuung nicht nur auf der Konzentration der Partikel, sondern auch auf der Partikelgröße, wodurch kein direkter Rückschluss auf die Konzentration oder den Dispersphasenanteil möglich ist. Das zweite Verfahren ist eine Anpassung der Autokorrelation mit einem Multiexponentialansatz. Abhängig von der Anzahl der Komponenten kann damit eine multimodale Verteilung dargestellt werden. Eine entsprechende Angabe einer einzelnen mittleren Partikelgröße

trifft in diesem Fall nicht mehr zu. Besser eignet sich die Betrachtung einer Intensitätsverteilung, die auch nach Anzahl oder Volumen gewichtet werden kann.

Da es sich bei DLS um eine optische Messung handelt, muss das kontinuierliche Medium transparent sein. Proben mit hohem Dispersphasenanteil müssen in der Regel stark verdünnt werden, da es sonst an der Vielzahl von Tropfen zu so starker Mehrfachstreuung und Absorption kommt, dass kein Signal mehr messbar ist. Neben einem geringen Probenvolumen, um den Weg des Lasers zu minimieren, muss bei der Verdünnung beachtet werden, die Probe nicht zu verändern. Im Falle von Dispersionen muss mit dem nativen kontinuierlichen Fluid verdünnt werden, da es sonst zu einer Änderung der Oberflächenkräfte kommen kann. Bei Emulsionen intensiviert sich die Problematik, da es bei einer Verdünnung zu einer Veränderung der Emulgatorkonzentration kommt und damit indirekt die Tropfengrößenverteilung beeinflusst wird. Die Viskosität einer Emulsion ist stark vom Dispersphasenanteil abhängig, was ebenso in die Auswertung der DLS Daten einbezogen werden sollte. Weiterhin würden Stöße zwischen den Partikeln das Ergebnis verfälschen, was wiederum für starke Verdünnungen spricht.

2.3.4 NMR zur Bestimmung von Tropfengrößenverteilungen

Emulsionen werden in der pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie stark genutzt, zum Beispiel um den Geschmack zu verstärken, hydrophile Substanzen in hydrophoben Medien zu lösen und umgekehrt, sowie den Fettgehalt zu reduzieren [29,60]. Eine der Haupteigenschaften von Emulsionen, die Aussehen, Viskosität und Stabilität beeinflusst, ist die Tropfengrößenverteilung. Es kann sehr herausfordernd sein die Tropfengrößenverteilung zu messen, da alle verschiedenen Methoden Limitierungen haben. Die meisten optischen Methoden benötigen eine gewisse Transmission von Licht, müssen also transparent sein und benötigen sehr starke Verdünnungen der Proben und kontinuierliche Phasen die nicht lichtundurchlässig sind. Eine andere etablierte, aber nicht im gleichen Maße verbreitete Methode ist die „nuclear magnetic resonance“ (NMR) Diffusometrie, die nicht auf Proben mit niedrigem Dispersphasenanteil beschränkt ist. Basierend auf der geometrisch gehinderten Diffusion der Moleküle der dispersen Phase in den Tropfen, kann die Tropfengröße berechnet werden, wie von Murday und Cotts beschrieben wurde [61]. Zusätzlich kann diese analytische Beschreibung der gehinderten Diffusion in einer Kugel mit einer Verteilungsfunktion kombiniert werden, um Tropfengrößenverteilungen zu berücksichtigen und von Packer und Rees mit der

Annahme einer Lognormalverteilung gezeigt wurde [62]. Diese Tropfengrößenbestimmung mit NMR „pulsed field gradient – stimulated echo sequence“ (PFG-STE) ist für einfache Emulsionen mit Tropfengrößen $>1 \mu\text{m}$ gut etabliert. Selbst für den Fall von Mehrfachemulsionen konnte gezeigt werden, dass mithilfe von PFG NMR die Tropfengrößenverteilung, der Dispersphasenanteil und auch der Austausch zwischen den Phasen bestimmt werden können [63,64].

Die Annahme von Log-Normalverteilungen in einer Emulsion kann diskutiert werden, da es eine statistische und keine experimentelle Verteilung ist. Es wird argumentiert, dass die Tropfengrößen und –verteilung stark von dem Herstellungsprozess und der Formulierung abhängen, was zu ungleichmäßigen oder multimodalen Verteilungen führen kann. Um dies zu berücksichtigen, wurden weitere Ansätze mit anderen Verteilungsfunktionen erforscht. Ein sehr bekannter Fall ist der numerische Ansatz der Regularisierung [65–67]. Die beiden Ansätze werden hier in Hinblick auf die Vor- und Nachteile zur Interpretation der Diffusionsmessungen diskutiert.

Das Modell nach Murday und Cotts, erweitert von Packer und Rees, hat Limitierungen für Tropfengrößen unterhalb von $1 \mu\text{m}$. Tropfen in typischen Lebensmitteln und pharmazeutischen Emulsionen können in der Praxis wesentlich kleiner sein als dieser Grenzwert. Nanoemulsionen sind insbesondere für pharmazeutische Anwendungen wichtig und müssen für diesen Fall unter 200 bis 300 nm sein [46]. Das Ziel ist daher ein Modell für diese wichtige Klasse von Emulsionen zu finden, um diese mit NMR zu analysieren. Hier wird eine Möglichkeit vorgestellt, um die Tropfengrößenverteilung mithilfe der Stokes-Einstein Gleichung zu modellieren.

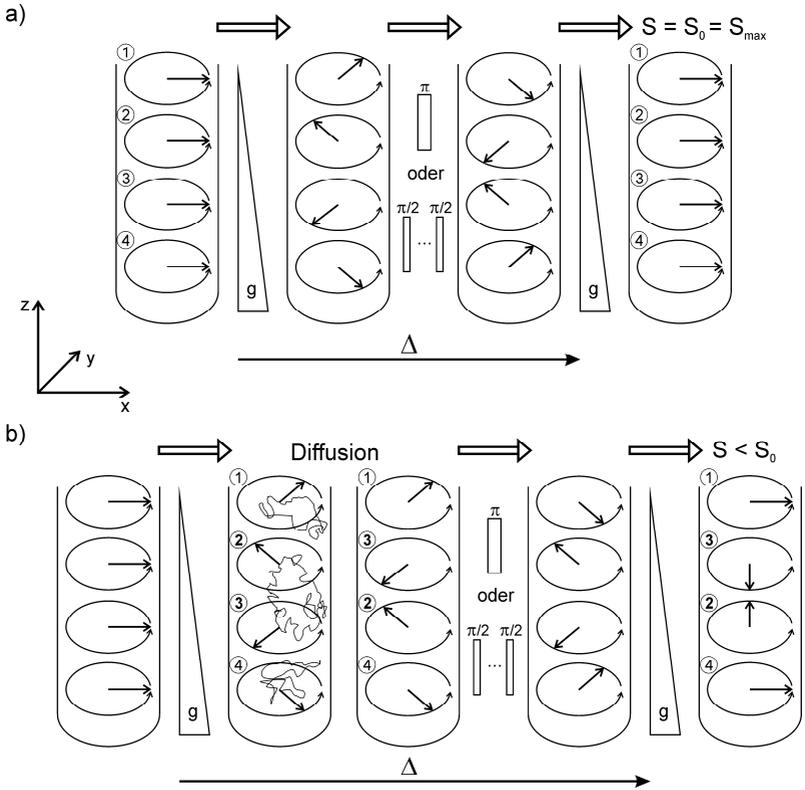


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines PFG-NMR Experiments nach Bernewitz [68]. Durch das angebrachte Magnetfeld erhalten alle Moleküle eine gleichgerichtete Magnetisierung und werden danach durch einen Gradienten g ortsabhängig kodiert. Nach einer Diffusionsdauer Δ wird diese Kodierung wieder entschlüsselt und das Messsignal S aufgenommen. Ein relativ zum Beginn gleichbleibendes Signal a) führt zu einer konstanten Intensität, während durch eine Diffusion b) die Intensität über die Zeit abnimmt.

Abbildung 2.7 zeigt das Prinzip der Diffusionsmessung mit einer PFG-NMR Sequenz. Teil a) stellt den Fall ohne Diffusion dar, während in b) eine Verschiebung der Moleküle stattfindet. Beginnend wird auf der linken Seite der Darstellung beginnen alle Moleküle ① bis ④ in dem homogenisierten Magnetfeld mit der gleichen Magnetisierung, die im zweiten Schritt durch einen Gradienten g ortsabhängig kodiert wird. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Diffusionszeit Δ , bis zur Dekodierung mit dem gleichen Gradienten g . Nach dem ersten Gradienten läuft die Magnetisierung wieder in den ursprünglichen Zustand zurück, dies wird

Relaxieren genannt. Eine weiterer Puls der Stärke π dreht diese Magnetisierung, sodass diese in den Anfangszustand zurückläuft. Kommt es zu einer Diffusion, wie in b) durch den Tausch von ② und ③ angedeutet, liegt nach der Dekodierung keine homogene Magnetisierung vor. Zum Messsignal S , tragen nur die Komponenten mit horizontaler Richtung bei. In Folge ist in a) ohne Diffusion die Signalintensität vor und nach der Dauer Δ gleichbleibend, während in b) die Signalstärke abnimmt.

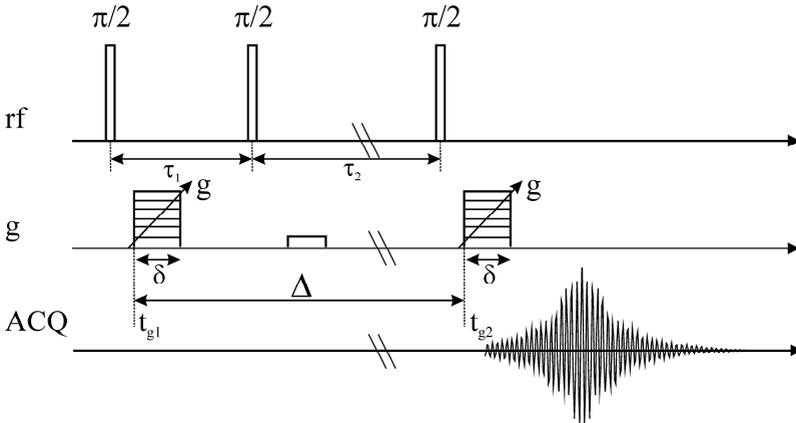


Abbildung 2.8: PFG-STE-Sequenz: Im Zeitintervall τ_1 wird die Magnetisierung durch einen Gradientenpuls kodiert. Durch einen $\pi/2$ -Puls wird sie während τ_2 entlang der z-Koordinate, d. h. entlang des statischen Magnetfeldes, zwischengespeichert. Mit einem dritten $\pi/2$ -Puls wird die Magnetisierung ausgelesen und über einen zweiten Gradientenpuls dekodiert, so dass nach einer weiteren Zeit τ_1 das stimulierte Echo beobachtet wird

Abbildung 2.8 hilft die Pulssequenz darzustellen, in den drei Ebenen des anregenden Pulses rf (radio frequency), des Gradienten g und der Signalmessung ACQ (acquisition). Die Abfolge entspricht der Erläuterung zu Abbildung 2.7 und verdeutlicht die Messparameter und deren zeitliche Abfolge. Das aquirierte Messsignal wird durch die Stejskal-Tanner Gleichung beschrieben

$$E(\delta, g, \Delta, D, r) = \frac{S}{S_0} = \exp\left(-D \cdot \gamma^2 g^2 \delta^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right), \quad (2-8)$$

welche den Zusammenhang zwischen der Signaldämpfung E und den Parametern der Diffusionskonstanten D , dem gyromagnetischen Verhältnis γ , dem Gradienten

g , der Gradientenlänge δ und der Diffusionszeit Δ herstellt. Das Produkt der quadratischen Komponenten γ , g und δ wird oft durch das Symbol q^2 substituiert.

Das Prinzip der Bestimmung von Tropfengrößenverteilungen mit PFG-NMR ist die gehinderte Diffusion: Moleküle der dispersen Phase einer Emulsion sind eingeschränkt in ihrer translatorischen Diffusion durch die Grenze zur kontinuierlichen Phase. Dies bedeutet, dass die mittlere freie Weglänge dieser Moleküle mit der eingeschränkten Geometrie zusammenhängt. Abhängig von der Diffusionszeit und der resultierenden mittleren freien Weglänge interagieren die Moleküle unterschiedlich stark mit der Grenze. Ist die Diffusionszeit Δ zu kurz, so werden die Moleküle nicht an die Wände stoßen und die geometrische Einschränkung wird keine Auswirkungen auf den Signalzerfall haben, während sehr lange Diffusionszeiten zu einer durchschnittlichen Position in der Mitte des Tropfens führen und die Information über die Abstände zur Tropfenwand verloren geht. Zwischen diesen beiden Extrema wird der PFG-NMR Signalzerfall, eine Funktion der Gradientenamplitude, durch die Größe der einschränkenden Geometrie bestimmt, zum Beispiel unter der Annahme einer kugelförmigen Geometrie [61,69].

Mit dem Wissen, dass die Tropfen in typischen Emulsionen nicht zwangsläufig monodispers sind, sondern eine Verteilung vorliegt, wurde die Funktion von Packer und Rees um die Annahme einer Log-Normalverteilung als Randbedingung erweitert [62]. Heutzutage werden numerische Methoden genutzt, um Annahme oder Randbedingungen älterer Ansätze zu umgehen, in diesem Falle dient die Regularisierung dazu auf die Normalverteilung zu verzichten [65,66,70].

Abgesehen von der Annahme einer sphärischen Geometrie und Auswahl der geeigneten Diffusionszeit und Gradientendauer, wird die PFG-NMR hauptsächlich durch den Größenbereich limitiert. Meist sind die mittleren Tropfengrößen von NMR Studien zwischen $0,5\mu\text{m}$ und $20\mu\text{m}$ für WO und $0,25\mu\text{m}$ und $20\mu\text{m}$ für OW [71,72], was eine starke Einschränkung für moderne Nanoemulsionen bedeutet. Für diese Fälle kann ein anderer Ansatz gewählt werden: Betrachtet man die Tropfen als Partikel, so können deren thermische translatorische Diffusion mit der Stokes-Einstein Gleichung $D = (k_B T) / (6\pi \cdot \eta \cdot r)$ beschrieben werden, mit dem Diffusionskoeffizienten D , der Boltzmann konstanten k_B , der absoluten Temperatur T , der Viskosität der umgebenden Phase η und dem hydrodynamischen Radius des Partikels r . Nimmt man an, dass die Moleküle innerhalb eines Tropfen die Wände zu häufig treffen, so liegt die mittlere Position de-facto im Zentrum des

Tropfens. In diesem Fall kann die Diffusion der Moleküle im Tropfen vernachlässigt werden und die thermische Bewegung kann alleine der Diffusion des gesamten Tropfens zugeschrieben werden. Kombiniert man die Stokes-Einstein Gleichung mit dem Ansatz von Packer und Rees, so erhält man einen alternativen Ansatz, der es ermöglicht die Tropfengrößenverteilung von Nanoemulsionen mit PFG-NMR zu bestimmen. Streng gesehen gilt die Stokes-Einstein Gleichung nur für stark verdünnte Systeme, jedoch gibt es Modifikationen, die die Konzentration der dispersen Phase berücksichtigen [73]. Für hochkonzentrierte Nanoemulsionen lassen diese Modifikationen Raum, auch dort die Tropfengrößenverteilung mittels PFG-NMR und den bekannten Vorteilen einzusetzen.

2.4 Phasentransfer von Kolloiden

2.4.1 Transfer von Feststoffpartikeln

Der direkte Transfer von kolloidalen Feststoffpartikeln kann als Modell oder Vereinfachung für den Transfer von Emulsionstropfen angesehen werden und wurde daher genauer untersucht. Bei dem Transfer werden die dispergierten Partikel direkt in eine zweite Phase übertragen. Der Transfer wird durch eine Schichtung realisiert, indem eine Suspension auf einer zweiten, dichteren und nicht mischbaren Phase aufgetragen wird und die Partikel dann per Zentrifugation oder einfacher Sedimentation übertragen werden. Der Transfer ist dabei, anders als eine flüssig-flüssig Extraktion, nicht nur von thermodynamischen Effekten, wie besserer Löslichkeit, getrieben, sondern basiert auf zusätzlicher mechanischer Arbeit. Am Beispiel von SiO_2 Dispersionen wird der Transfer von kolloidalen Partikelsystemen in Hinblick auf den Einfluss von Partikelgröße, Viskosität, Dichte und einem Fokus auf Grenzflächeneffekte diskutiert. Für kleine Partikel dominierten hydrophobe Kräfte und erschweren den Transfer durch Adsorption an der Phasengrenze, dem erhöhte Zentrifugalkräfte oder eine Senkung der Grenzflächenkräfte durch Tenside entgegengesetzt werden können. Der Transfer wird im Detail mit einem Modell beschrieben, das einen Grenzwert der Größe für einen erfolgreichen Transfer bei gegebenen Bedingungen angibt. Das Modell wird an verschiedenen SiO_2 Suspensionen überprüft.

Kolloidale Nanopartikel sind in industriellen Anwendungen und Produkten weit verbreitet. Die Eigenschaften solcher kolloidaler Systeme werden hauptsächlich

durch ihre Größe im Mikro- bis Nanometer Bereich bestimmt. In dieser Größen-dimension führen die extrem großen Oberflächen zu den gewünschten oder vorteilhaften Effekten, die für wissenschaftliche oder industrielle Zwecke genutzt werden. Die kolloidale Stabilität hängt stark von der Interaktion der Oberfläche mit der kontinuierlichen Phase ab [74,75]. Um Stabilität zu erreichen, müssen entweder abstoßende Kräfte in Form von elektrostatischer oder sterischer Hinderung zwischen den Partikeln vorliegen, oder eine Reduzierung der Mobilität durch Manipulation der Viskosität der kontinuierlichen Phasen. Es gibt mehrere Beispiele für einen benötigten Tausch der kontinuierlichen Phase, z.B. Umpufferung, Resuspendierung oder Transfer als solcher. Ein solcher Transfer kann durch mechanische Separation mit Filtration oder thermischer Trocknung, gefolgt von einer Redispersierung, erreicht werden. Dies führt jedoch oft zu irreversibler Aggregation der Primärpartikel. Der Kontakt der Partikel mit einer Gasphase kann ebenso negative Effekte, wie unerwünschte Reaktionen oder Oxidierung, mit sich bringen. Wurden die abstoßenden Kräfte, wie in der DLVO Theorie beschrieben, einmal überwunden, ist die Partikel-Partikel Adhäsion zu stark, um wieder eine homogene Verteilung herbeizuführen. Ein direkterer Verfahrensansatz ist ein Transfer durch Sedimentation, mit der Schichtung der Suspension auf einer zweiten Phase, ohne diese zu mischen. Die Partikel werden mithilfe einer gerichteten Beschleunigung in der Zentrifuge übertragen. Wird dabei die Position der Partikel beobachtet, kann die Zentrifugalkraft entsprechend justiert werden, um einen erfolgreichen Transfer zu erreichen.

Die potentielle technische Nutzung eines direkten Phasentransfers ist in mehreren Verfahren denkbar. Es könnte a) für einen unmittelbaren Wechsel der kontinuierlichen Phase, etwa für die Lagerung nach einer Synthese, ohne langwierige und aufwändige Prozeduren, b) für eine analytische Prozedur, um die Kraft zu messen, die für einen Transfer nötig ist und somit die Arbeit oder hydrophobe –und -phile Kräfte zu quantifizieren, c) ein Weg um Partikel zu beschichten, wenn die Oberfläche durch Edukte aus der kontinuierlichen Phase benetzt wird oder d) für die Produktion von Liposomen aus Emulsionen, wenn wie in dieser Arbeit beschrieben, wässrige Tropfen transferiert werden.

Ein Transfer kolloidaler Partikel wird in der Literatur für einige Partikelsysteme beschrieben, aber basiert in der Regel auf einer höheren Affinität der Partikel zur Extraktionsphase. Regelmäßig steht dieser Transfer in Verbindung mit einer chemischen Reaktion, sodass es sich de facto um flüssig-flüssig Extraktionen handelt. Schütteln oder Mischen der Phasen führt zum Kontakt der Partikel mit der Extrak-

tionsphase, die dann aufgrund einer besseren Löslichkeit im Extrakt verbleiben. Dies gilt insbesondere für Metallpartikel, z.B. Au, Ag, Pt, Pd und Magnetit, wie weitgehend beschrieben wurde [76–82]. Alle Prozesse haben die Gemeinsamkeit, dass Tenside, Salze oder andere Reaktionspartner genutzt werden, um die Oberfläche der Partikel oder die Grenzfläche zu modifizieren. Ein „spontaner“ Transfer von Au und Pd Partikeln von Toluol zu Wasser unter der Nutzung einer reversiblen Bindung von 4-dimethyl-aminopyridine wird von Gittins *et al.* beschrieben und hebt hervor, welche Vorteile die Reversibilität gegenüber einer kovalenten Bindung oder Präzipitation hat [78]. Zhao *et al.* und Manchunsky *et al.* nutzen Zentrifugation um den Transfer zu stärken, verwenden jedoch weiterhin mindestens einen Hilfsstoff, der die Partikeloberfläche verändert [77,80]. Die Wahl des Tensides hat einen großen Einfluss auf den Ertrag des Transfers und der Größe von Agglomeraten [81,82]. Nanopartikel können an der Grenzfläche von flüssig-flüssig Systemen synthetisiert werden, wobei die Verringerung der Grenzflächenenergie genutzt wird und die Partikel an einer einfach zu erreichenden Position für nachfolgende Schritte lokalisiert sind [76,83]. Größere Partikel oder Massen können einfach durch nicht-mischbare Phasen transferiert werden, wie im Beispiel für sandbeladene Sedimentströme beschrieben [84] und sind, aufgrund ihrer viel höheren Größe gegenüber kolloidalen Systemen, nicht von Grenzflächenkräften abhängig, während Nanopartikel ultrazentrifugiert werden müssen, um ausreichende Kräfte für einen Transfer zu erzeugen [85].

Es gibt zwei große Herausforderungen für einen direkten Transfer: 1.) die Anforderung einen Partikel in zwei verschiedenen Medien, in der Regel mit gegensätzlichen hydrophoben / hydrophilen Charakter, zu stabilisieren und 2.) den Durchtritt der Partikel durch die Grenzfläche der zwei Flüssigkeiten, möglicherweise entgegen dem thermodynamisch günstigeren Lösemittel. Die Interaktion zwischen Lösemittel und Partikel wird oft durch Löslichkeitsparameter beschrieben. Einer der weit verbreiteten, die „Hansen Solubility“, beschreibt die Affinität der Partikel mit der kontinuierlichen Phase auf Basis von van der Waals Kräften, Polarität und Wasserstoffbrückenbindungen [86]. Dies wird genutzt, um Nanopartikel zu stabilisieren [87,88], ist jedoch aufwändig zu bestimmen. Die Oberflächenenergie von Partikeln in verschiedenen Lösemitteln, auch in Kombination mit Tensiden, ist ein Forschungsbereich, der auch für die Stabilität von Schäumen und Emulsionen interessant ist [44,89,90]. Die Haftung kolloidaler Partikel an flüssige Grenzflächen wird viel in der Literatur beschrieben, meist im Zusammenhang mit der Stabilisierung von Grenzflächen in Pickering Emulsionen [91,92]. Im Falle kleiner Partikel ist die Haftung mehrere Grö-

Benordnungen höher als die thermische Energie der Partikel, sodass sie an der Grenzfläche gefangen werden und die Grenzflächenspannung verändern [93]. In Kontrast zu einem kompletten Phasentransfer gibt es keine gerichteten Kräfte, die daher auch nicht in den Publikationen weiter behandelt wurden. Die Benetzbarkeit der Nanopartikel kann mit einer Wilhelmy Plattenmethode und „scanning angle reflectometry“ auf zugänglichen Flächen gemessen werden [94–96], jedoch ist dies nicht für flüssig-flüssig Grenzflächen möglich. Die Grenzflächenspannung ändert sich mit der Adsorption von Nanopartikeln, die auch stark mit Tensiden wechselwirken und sogar Synergien bilden können [97–99]. Ansätze, um die Oberflächenenergie von Nanopartikeln an einer Grenzfläche zu bestimmen, sind meist thematisch an die Synthese und Reaktionsenthalpie angelehnt [83]. Mit der kontrollierten Applikation von Zentrifugalkräften ergibt sich die Möglichkeit eine Affinität der Partikel zu beiden Medien mit Hilfe einer mechanischen Kraft zu quantifizieren und somit eine einfache und klare Methode zu etablieren.

Während des Transfers wirken mehrere Kräfte auf den Partikel, die stark von der Größe abhängig sind. Kurz gefasst sind für Nanopartikel die Grenzflächenkräfte dominant, während für größere Partikel die Volumenkräfte eine wichtigere Rolle spielen. Dies begründet sich in dem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, das für Nanopartikel Größenordnungen höher und für Überlegungen in der Kolloidtechnologie essentiell ist. In dieser Arbeit wurde SiO_2 genutzt, das in verschiedenen Partikelgrößenverteilungen verfügbar ist und sowohl in hydrophoben als auch hydrophilen Medien dispergiert werden kann, obwohl es grundsätzlich einen hydrophilen Charakter aufweist, da es über exponierte Sauerstoffgruppen verfügt. In dem hier gezeigten Fall wurde beobachtet, dass Partikel von mehreren Millimetern die Phasengrenze einfach durchtreten, während kleinere Partikel mit Größenverteilungen im Nano- bis Mikrometerbereich an der Grenzfläche akkumulieren und nicht unmittelbar durchtreten. Daher war es essentiell, die Auswirkungen der beitragenden Kräfte in Abhängigkeit von der Größe zu verstehen, wie in Form eines analytischen Ansatzes hier dargestellt wurde, um kritische Fälle zu identifizieren. Der Ansatz wurde mithilfe von Experimenten geprüft.

Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass der Transfer nicht gut beschrieben ist, obwohl es in mehreren Applikationen Anwendung findet. Das Verständnis für die enge Korrelation der benötigten Kräfte für einen erfolgreichen Transfer zu der Größe und Grenzflächenenergie ist entscheidend, um die Methode für kolloidale Systeme zu nutzen. Der hier gezeigte theoretische Ansatz hilft die angebrachten experimentellen Parameter und Materialien zu wählen. Zusätzlich kann die Proze-

zur zum Transfer von Partikeln nützlich als ergänzende Methode sein, um Affinität von Partikeln in Dispersionen zu quantifizieren.

2.4.2 Transferprozess nach Träuble und Grell

Der direkte Phasentransfer kolloidaler Systeme liegt auch in der Methode zur Herstellung von Liposomen vor. Der Transfer von Tropfen einer WO Emulsion in eine weitere wässrige Phase wurde zuerst von Träuble und Grell [100] beschrieben und von weiteren Autoren weiterentwickelt [41,101]. Es gibt Unstimmigkeiten in den Berichten bezüglich der Partikelgröße, die sich zwischen mehreren Mikrometern von „riesige unilamellare Vesikel“ für Zellmembranmodelle [102,103], bis Nanometer bewegt, was für pharmazeutisch relevante Liposomen nötig wäre [46]. Generell untersuchen die Studien zu Nanopartikeln nicht die Funktionalität oder Deformation der Liposomen, während ein erfolgreicher Transfer ohne Produktverlust nur für größere Modelle gezeigt wird [104]. Insgesamt diskutiert keine Publikation die notwendigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten für einen Transfer von Liposomen oder gibt keine Erfolgsrate des Transfers, z.B. durch Beobachtung der Konzentration oder Partikelgrößenverteilung im Transfer, an.

3 Material und Methoden

3.1 Nanoemulsionen mit Phospholipiden

3.1.1 Herstellung von Nanoemulsionen

Bei der Aufklärung des Instabilitätsmechanismus von Wasser in Öl (WO) Emulsionen mit Phospholipiden wurden geringe Dispersphasenanteile und Konzentrationen an Emulgator genutzt, um den Einfluss der kritischen Aggregationskonzentration (CAC) nachzuweisen. Erste Hinweise auf den Einfluss wurden durch empirische Messungen von Emulsionen mit verschiedenen Dispersphasenanteilen gefunden, die zusammen mit der Interpretation der tensiometrischen Daten eine detailliertere Untersuchung erforderten. Alle genutzten Chemikalien wurden auch in Hinblick auf die pharmazeutische Konformität ausgewählt. Squalen ($C_{30}H_{50}$) mit einer Reinheit von 98% wurde als kontinuierliche Phase für die Emulsionen genutzt, erworben bei Sigma-Aldrich. Die Viskosität des Reinstoffes liegt bei 12 mPas, die Dichte beträgt $0,86 \text{ g/cm}^3$ und zeigt einen Brechungsindex von 1,4990. Wasser von der Qualität „water for injection“ (WFI) wurde als disperse Phase verwendet. Des Weiteren kamen für die Versuche zwei verschiedene Phospholipide zum Einsatz: Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, 734 g/mol) mit gesättigten Fettsäureketten (16:0, 16:0) und Palmitoyloleoylphosphatidylcholine (POPC, 760 g/mol) mit einer gesättigten und einer ungesättigten Kette (16:0, 18:1). Die Phospholipide haben beide eine Reinheit $> 99\%$ und wurden freundlicherweise von der Lipoid GmbH Ludwigshafen zur Verfügung gestellt. Die tensiometrischen Daten wurden mit einem PAT-1 Tensiometer der Firma Sinterface Technologies erhoben. Eine detailliertere Beschreibung der Messung und Auswertung befindet sich in den Publikationen von Li *et al.*, sowie Hildebrandt *et al.* [37,44,45].

Der Emulgierprozess und die anschließende Messung der Instabilität ist auf das Adsorptionsverhalten der Phospholipide (PL) abgestimmt und wird daher hier

hergeleitet. Die Probe wird dabei dreimal einer Emulgierung und Messung am DLS unterzogen. Die Emulgierung wurde mit einer Ultraschallsonotrode der Firma Hielscher Ultrasonics GmbH, Typ UP 200S mit 200W Maximalleistung und einer Frequenz von 26 kHz durchgeführt. Die Kinetik der Grenzflächenadsorption von PL ist entscheidend für die Prozessparameter der Emulgierung und kann mit „profile tension analysis“ (PAT) charakterisiert werden. PAT erlaubt die Beobachtung der charakteristischen Zeiten für die Adsorption und Stabilisierung eines Tropfens, sowie die Bestimmung der „critical aggregation concentration“ (CAC) der PL in der Ölphase. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden auf die Emulgierung übertragen: um für die relativ langsame Diffusion der PL zu kompensieren, wurden eine repetitive, schrittweise Emulgierprozedur eingeführt, die den PL ausreichend Zeit erlaubt, den Gleichgewichtszustand der Adsorption zu erreichen. Das Schema ermöglicht die Beobachtung der Emulsionsstabilität nach jeder wiederholten Emulgierung der gleichen Probe. Weiterhin wurden die Wachstumsraten der Emulsionstropfen und Änderungen in der Tropfenverteilung systematisch mit DLS untersucht, um den Instabilitätsmechanismus zu identifizieren.

3.1.2 Messung der Stabilität von Nanoemulsionen

Die Tropfenrößen in der Emulsion wurden dazu unmittelbar nach der Emulgierung für 180 min per DLS gemessen, anschließend wurde der Vorgang der Emulgierung und Messung zweifach an der identischen Probe wiederholt. Zunächst wurde DPPC in Squalen in Öl mithilfe eines Ultraschallbades dispergiert, mit den Konzentrationen von $0,03 \text{ mg/ml} = 0,0409 \text{ mmol/l}$ oder $0,3 \text{ mg/ml} = 0,409 \text{ mmol/l}$, im Folgenden als $0,04 \text{ mM}$ und $0,4 \text{ mM}$ bezeichnet. Im ersten Schritt wurden Emulsionen mit $0,4 \text{ vol-\%}$ Wasser und DPPC-Squalen-Lösung hergestellt. Diese wurden zunächst für 10 sec mit der Sonotrode kontinuierlich vorgemischt, übergangslos gefolgt von einer 10 min Behandlung bei einer Amplitude von 40% der Maximalleistung und einem Zyklus von $0,5 \text{ s}$ pro Sekunde. Die Temperatur der Probe wurde mit einem eisgekühlten Wasserbad kontrolliert, um dem Wärmeintrag der Sonotrode entgegenzuwirken. In einem zweiten Schritt wurde die Emulsion weiter auf einen Dispersphasenanteil von $0,08 \text{ vol-\%}$ mit DPPC-Squalen Lösung verdünnt, sodass die Konzentration des Emulgators in der Probe konstant blieb. Die verdünnte Emulsion wurde für weitere 5 min emulgiert. Der gesamte Prozess aus: i) Vormischen, ii) 10 min Emulgieren, iii) Verdünnen und iv) 5 min Emulgieren, wird im Folgenden gesammelt als erste Emulgierung be-

zeichnet. Die Tropfengrößenverteilung der Emulsion wurde dann unmittelbar mit dem DLS kontinuierlich für 180 min bei 20°C bestimmt. Für die folgenden Messungen wurden eine zweite Emulgierung von 10 min Ultraschallbehandlung und 180 min DLS Messung, sowie eine 3. Emulgierung von 10 min und 250 min Größenmessung ausgeführt. Die Schritte des Vormischens und Verdünnung wurden nur bei der ersten Emulgierung durchgeführt, sodass die Konzentrationen bei allen drei Messungen konstant blieben.

Die Messungen der Tropfengrößenverteilungen wurden mit einem Malvern Instruments Zetasizer ZS90 mit einer Wellenlänge von 633 nm bei 90° Streuwinkel durchgeführt. Die Probe wurde in einer Küvette aus PMMA (Polymethylmethacrylat) dispergiert und gemessen. Die Ergebnisse der DLS Messung sind in Form von Z-Average, Polydispersitätsindex (PDI), „Derived Count Rate“ (DCR) und intensitätsgewichteten Größenverteilungen dargestellt. Der Wert „Z-Average“ wird aus der Autokorrelationsfunktion der Streulichtdaten mittels einer Anpassung mit einem Polynom dritten Grades nach der ISO 13321 berechnet und stellt eine mittlere intensitätsgewichtete monomodale Verteilung dar. Der PDI wird ebenso aus der Autokorrelation bestimmt und spiegelt die Verteilungsbreite durch einen Wert der Abweichung von einer idealen unimodalen Verteilung dar. Ein hoher PDI weist darauf hin, dass das Modell die Daten unzureichend beschreibt, daher ist es generell akzeptiert, dass Ergebnisse mit einem PDI >0,7 nicht mit dem unimodalen Modell beschrieben werden können. Die „Count Rate“ ist eine quantitative Größe für die Lichtintensität am Photosensor und wird in kcps (kilo counts per second) angegeben, während die „Derived Count Rate“ (DCR) die bewusste Signaldämpfung kompensiert und den Wert somit normalisiert. Da es sich physikalisch gesehen um Rayleighstreuung handelt, wird die Streulichtintensität sowohl von der Probenkonzentration, als auch von der Tropfengröße beeinflusst und kann nicht einem Faktor exklusiv zugeordnet werden.

3.2 NMR Experimente und Parameter

Bei der Tropfengrößenbestimmung mit NMR handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Methodik, daher wurden Emulsionen genutzt, die nicht zwangsläufig für den Herstellungsprozess von Liposomen erforderlich sind. Insbesondere wurden Öl in Wasser Emulsionen herangezogen, um die Effekte der Tropfenbewegung und Moleküldiffusion in den Emulsionen zu verdeutlichen.

Für den Vergleich der Auswertemodelle mit der Log-Normal-Verteilung nach Murday-Cotts und der Regularisierung sind stabile OW Emulsionen gemessen worden. Öl in Wasser Emulsionen mit großen Tropfen ($>1 \mu\text{m}$) wurden mit Milchproteinisolat und Xanthan von Sigma-Aldrich stabilisiert, welches die Viskosität der kontinuierlichen Phase erhöht. Der Dispersphasenanteil von 10 vol-% Sonnenblumenöl wurde in destilliertem Wasser mit einem Rotor-Stator System vom Typ Ultraturrax (IKA GmbH) bei 10.000 rpm dispergiert. Die Messdaten der bimodale Emulsionen wurden der Veröffentlichung von Bernewitz et al. entnommen [105] und weiter analysiert.

Als Fallbeispiel für Nanoemulsionen wurden OW Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil von 10% Squalen hergestellt. Als Emulgator wurde das Lecithin Produkt E80 der Lipoid GmbH bei einer Konzentration von 6 mg/ml Emulsion genutzt. Lecithin ist eine Rohmischung aus Phospholipiden, in diesem Fall extrahiert aus der natürlichen Quelle Ei. Die Zahl 80 im Namen bezieht sich darauf, dass das Lecithin auf einen Gehalt von 80% Phosphatidylcholingruppen (PC) aufgereinigt wurde. Durch Schütteln wurde eine grobe Emulsion erzielt, die mithilfe der Ultraschallsonotrode vom Typ Branson Sonifier 450 mit 400W Maximalleistung dispergiert wurde. Die Probe wurde mit 20% Leistungseintrag, bei 0,5 Zyklen über 10 min emulgiert.

Tropfengrößen wurden bei Raumtemperatur mit einem Bruker SWB 200 MHz Hochfeld-NMR Spektrometer, ausgerüstet mit einem Diff30 Messkopf, bestimmt. Das Spektrometer generiert zunächst ein homogenes Magnetfeld über die gesamte Probe. Die Emulsion wird in einem Glasröhrchen mit 5 mm Durchmesser im Probenkopf des Gerätes eingebracht. Vor der Messung wird die Homogenität des Magnetfeldes durch sogenanntes Shimmen optimiert. Der Diff30 Messkopf kann entlang der Z-Achse der Probe einen magnetischen Gradienten erzeugen und somit ein Kontrollvolumen magnetisch codieren und das Messsignal spektral auflösen. Nach einer Diffusionsdauer Δ wird das Signal decodiert und das Abklingen des Signals entsprechend dem durch Diffusion aus dem Kontrollvolumen verlorenem Molekülen ermittelt. Die PFG-STE Pulssequenz wurde mit einer Gradientendauer δ von 3ms über eine Amplitude von 1,2 mT/m bis 6 T/m ausgeführt. Um die Auswirkung zu beurteilen, wurden die Diffusionszeit Δ zwischen 20 und 400ms variiert. Die native Gerätesoftware Bruker Topspin v1.5 wurde zur Fouriertransformation und Phasenkorrektur der Messdaten genutzt. Ebenso wurden die Diffusionskoeffizienten und Relaxationszeiten der Reinstoffe bestimmt.

Die Tropfengrößenverteilungen wurden mittels Matlab Skripten ausgewertet, nach den Ansätzen der Log-Normalverteilung und der Regularisierung.

3.3 Kolloidale Modellpartikel für den Transfer

Zur Darstellung der limitierenden Faktoren im Transfer wurden Modellpartikel verschiedener Größen benötigt. Es wurden diverse kolloidale Partikel getestet, jedoch ist es herausfordernd, diese sowohl in einer wässrigen als auch hydrophoben Phase zu suspendieren. In der Definition der Stabilität kolloidaler Partikel nehmen Oberflächenkräfte mit repulsiven Wirkungen wichtige Rollen ein, daher ist die Komplexität der Suspendierung in verschiedenen Medien nahe. SiO_2 hat sich empirisch als geeigneter Kandidat erwiesen, der trotz seines hydrophilen Charakters, der jedoch stark von der kristallinen Struktur abhängig ist, in Squalen und Wasser suspendierbar ist. Weiterhin ist SiO_2 in sehr unterschiedlichen Größen erhältlich, jedoch muss die Herstellungsmethode und daraus resultierende unterschiedliche Oberflächenstruktur, kristalline oder amorphe Struktur und Benetzbarkeit beachtet werden.

Die beiden nicht-mischbaren kontinuierlichen Phasen waren hochreines Wasser (Typ WFI) und Squalen ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$) von Sigma-Aldrich mit 98% Reinheit und einer Dichte von 0,89 g/ml. Als Partikel wurde SiO_2 mit verschiedenen Partikelgrößenverteilungen genutzt. Makroskopische Kugeln vom Typ „Silibeads“ in der Größenordnung zwischen 1-3 mm und einer Dichte von 2,5 g/cm³ wurden von der Sigmund Lindner AG erworben. Kolloidale Partikel vom Typ „Sikron“ SF300, SF600, SF800, mit mittleren Partikelgrößen von $d_{3,50} = 10, 3$ und 2 μm wurden freundlicherweise von der Quarzwerke GmbH zur Verfügung gestellt. Detaillierte Partikelgrößenverteilungen sind in Abbildung 3.1 zu finden, die mittels Laserbeugungsmessung mit einem Gerät vom Typ „Helos Quixel“ der Firma Sympathek GmbH bestimmt wurden. Die Suspensionen wurden mit einer 400 W, 20 kHz Ultraschallsonotrode von der Firma Branson Ultrasonics dispergiert.

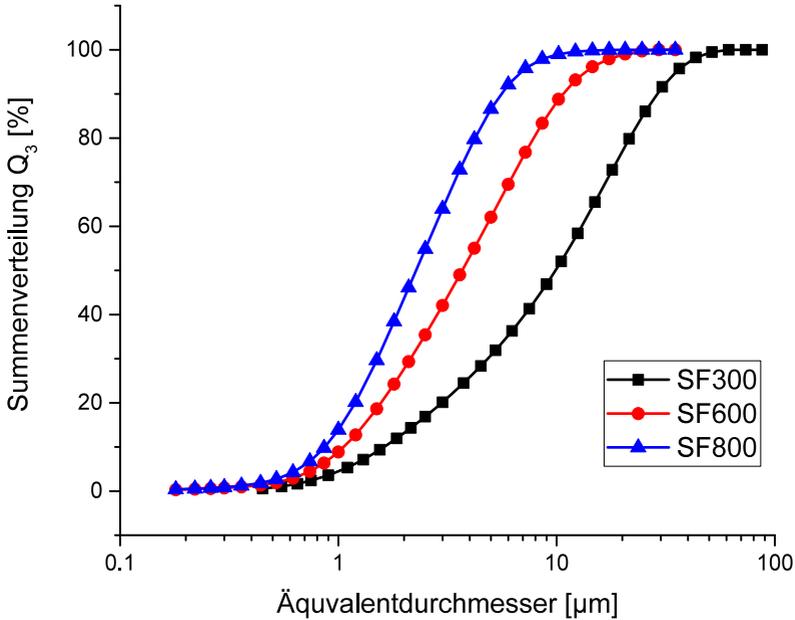


Abbildung 3.1: Partikelgrößenverteilungen der kolloidalen SiO₂ Produkte SF 300, 600 und 800 der Quarzwerke GmbH, mit mittlerem Partikeldurchmesser $d_{3,50}$ von 10, 3 und 2 µm nach Herstellerangaben.

Die Grenzflächenspannung zwischen Squalen und Wasser wurde mittels PAT, bereits auf Seite 20 im Methodenteil beschrieben, bestimmt und liegt bei 42 mN/m. Der Kontaktwinkel im Dreiphasensystem SiO₂, Wasser und Squalen wurde mit einer Kamera vom Typ Stingray F033B der Firma Allied Vision Technologies GmbH bestimmt. Dabei wird ein Wassertropfen in eine mit Squalen gefüllte SiO₂ Küvette gebracht, der aufgrund der Dichtedifferenz zum Boden sinkt. Am Boden der Küvette kann dann der Kontaktwinkel durch Anlegen einer Tangentialen im Zwickel optisch bestimmt werden. Eine weitere Diskussion der Auswirkung des Kontaktwinkels und der Messung ist im Ergebnisteil auf Seite 75 zu finden. Zur Auswertung wurden zwei Programme herangezogen: „Drop Shape Analysis“ der Firma Krüss GmbH und „ImageJ“, bei dem es sich um Open Source Software handelt. Erstere versucht den Tropfen mit einer Kugelform zu fitten und extrahiert am Schnittpunkt mit dem Boden die Tangente, während ImageJ dem Nutzer den exakten Zwickelpunkt optisch identifiziert und sich zwei Messungen für die rechte und linke Seite ergeben.

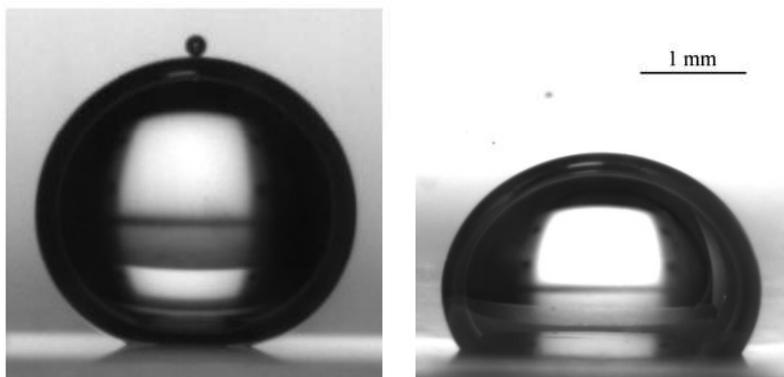


Abbildung 3.2: Kontaktwinkelmessung eines Wassertropfens in Squalen auf einem SiO_2 Boden. Die linke Seite zeigt das Stoffsystem ohne Emulgator, bei dem sich ein Kontaktwinkel von etwa 140° einstellt. Die rechte Seite wurde unter den Anwesenheit von Tween 20 in Wasser aufgenommen und führt zu einem flacheren Kontaktwinkel.

Tabelle 3.1: Experimentell bestimmter Kontaktwinkel eines Wassertropfens in Squalen auf einem SiO_2 Boden. Dargestellt sind Mittelwerte des linken und rechten Zwickels mit der Software ImageJ und DSA.

<i>Nummer</i>	1	2	3	4	5
DSA	133,3	135,7	150,5	169,8	166,55
ImageJ	135,6	138,0	154,6	150,7	166,5

Tabelle 3.2: Experimentell bestimmter Kontaktwinkel eines Wassertropfens in Squalen auf einem SiO_2 Boden unter der Verwendung des wasserlöslichen Emulgators Tween 20. Dargestellt sind Mittelwerte des linken und rechten Zwickels mit der Software ImageJ

<i>Nummer</i>	1	2	3	4	5	6
Konzentration Tween 20 [$\mu\text{l/ml}$]	1	1	4	4	20	20
ImageJ	125,6	123,5	117,9	122,9	122,1	124,5

Um das im Ergebnisteil 4.3.1 hergeleitete Modell der Eintauchtiefe von Silikapartikeln zu validieren, wurden makroskopische SiO_2 Kugeln genutzt. Diese lassen sich bei der Größe im Bereich weniger Millimeter mit dem Auge oder einem

Kamerasystem verfolgen. Dazu wurde in einer Küvette in Schichten Squalen auf Wasser aufgetragen. Pro Versuch wurde je eine Kugel, deren exakte Größe zuvor unter dem Mikroskop bestimmt wurde, mit einer Pinzette in das Squalen getaucht und fallen gelassen. Abhängig von der Größe zeigten sich unterschiedliche Eintauchtiefen, die aus den Bildern, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, bestimmt werden konnten. Der Phasentransfer von Millimeterpartikeln wurde mit einer Kamera vom Typ Stingray F033B der Firma Allied Vision Technologies GmbH aufgezeichnet, die auch für die Messung der Kontaktwinkel genutzt wurde.

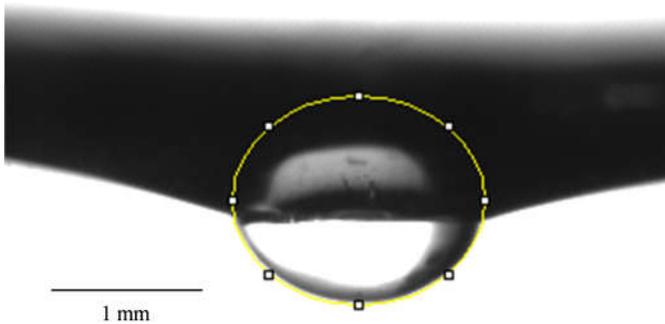


Abbildung 3.3: Kameraaufnahme von dem Eintauchen einer SiO₂ Kugel mit 1,2 mm Durchmesser an der Phasengrenze von Squalen (oben) zu Wasser (unten).

Um den Transfer kolloidaler Partikel zu testen, wurde Silika vom Typ SF 600 in Squalen mittels Ultraschall dispergiert. Die Suspension wurde vorsichtig auf der Wasserphase mit einer Pipette aufgebracht. Die Suspension zeigt unter Erdschwere eine ausreichende Stabilität, sodass die Partikel nicht sedimentieren. Die Eintauchtiefe kann in diesem Größenmaßstab nicht verifiziert werden. Der Transfer kann nach Erfolg oder Misserfolg, bei Verbleib der Partikel an der Grenzfläche der Fluide, qualitativ bewertet werden. Für den Transfer kolloidaler Dispersionen wurden zwei verschiedene Zentrifugen genutzt: Die analytischen Zentrifuge, Typ LumiSizer, der LUM GmbH erlaubt die Messung des Transmissionsprofils entlang der Längsachse einer Probe während der Zentrifugation mit bis zu 2300 G, während die Becherzentrifuge vom Typ Hermle ZK 630 für höhere Beschleunigungen bis 8000 G genutzt wurde.

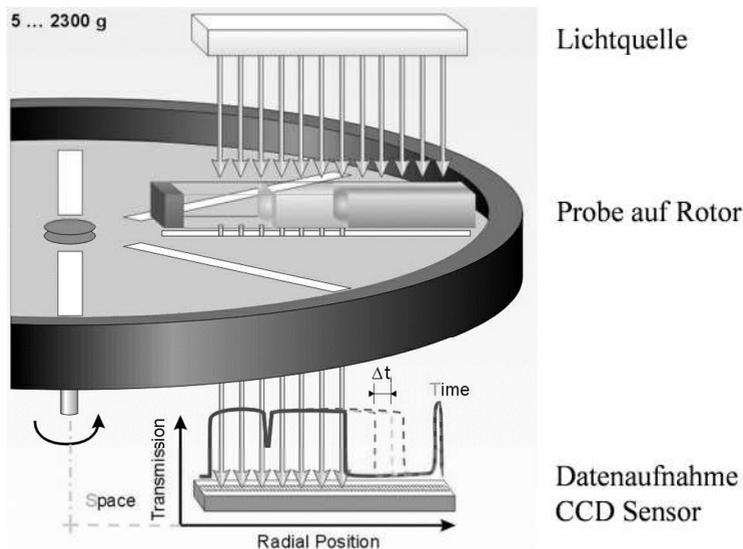


Abbildung 3.4: Skizze der analytischen Zentrifuge [106]

Das Messprinzip der analytischen Zentrifuge erlaubt eine direkte Onlinemessung während der Zentrifugation und wurde deshalb genutzt, um den Transfer von Kolloiden zu beobachten. Die Probe mit der Suspension oder Schichtung aus Suspension und Wasser wird waagrecht auf dem Rotor platziert, wie in Abbildung 3.4 dargestellt. Durch die Bewegung des Rotors erfährt die Suspension mit Partikeln eine Zentrifugalkraft in Richtung des Küvettenbodens, abhängig von der Drehzahl (Maximum bei 4000 pro min) und radialen Position der Probe (~ 2300 G am Boden der Küvette). Während der gesamten Dauer kann die Transmission der Probe über ihre Höhe gemessen werden. Diese wird durch den Durchmesser der Küvette und die Turbidität, bzw. Konzentration beeinflusst. Durch die zeitliche Auflösung mit mehreren Messungen kann die Veränderung beobachtet werden. Zu Beginn der Messung zeigt die Suspension eine geringe Transmission, homogen über die ganze Höhe. Durch die Sedimentation sinken die Partikel zum Boden und die Suspension klärt von oben her auf. Eine sehr homogene Partikelgrößenverteilung führt zu einer klaren Sedimentationsfront, während aus einer breiten Verteilung unterschiedliche Sinkgeschwindigkeiten und eine breite Sedimentationsfront resultiert. Für den speziellen Fall des Transfers und geschichteten Proben kann somit nachvollzogen werden, wie die Suspension aufgeklärt und Partikel an der Phasengrenze verbleiben oder die wässrige Phase eintrüben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stabilität von Wasser in Öl Emulsionen

Die Stabilität von Wasser in Öl (WO) Emulsionen mit Phospholipiden (PL) ist ein limitierender Faktor für die Nutzung des Transferprozesses, da die Tropfen als Vorlage für die Liposomen dienen sollen. Um der Instabilität entgegen zu wirken, wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Zerfall der Tropfen genauer zu charakterisieren. Die Adsorptionskinetik von PL an die Grenzflächen zwischen Wasser und Öl hat weitreichende Konsequenzen für den Emulgierprozess und die Stabilität der Emulsion. Mit Hilfe von „Profile Analysis Tensiometry“ (PAT) können die Zeitintervalle der Adsorption und die „Critical Aggregation Concentration“ (CAC) bestimmt werden.

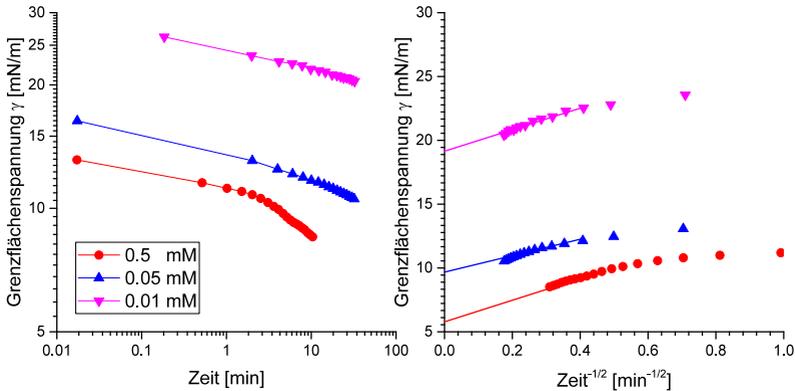


Abbildung 4.1: Adsorptionskinetik des PLs DPPC gelöst in Squalen an der Grenzfläche zu Wasser, gemessen mit PAT. Die Grenzflächenspannung γ sinkt mit der Zeit, je mehr PL an der Grenzfläche adsorbiert. Dargestellt sind die Konzentrationen \bullet 0,5mM, \blacktriangle 0,05mM and \blacktriangledown 0,01mM. Auf der linken Seite ist der klassische Verlauf der Grenzflächenspannung doppellogarithmisch dargestellt, während auf der rechten Seite bei einer Auftragung γ vs. $t^{-1/2}$ die extrapolierte Grenzflächenspannung im Gleichgewicht für $t(\infty)$ leicht abzulesen ist (siehe Tabelle 4.1).

Während der Emulgierung müssen neu erzeugte Grenzflächen möglichst schnell von Emulgatormolekülen belegt werden, um diese zu stabilisieren. Um die Kinetik der Adsorption abzuschätzen, wurden PAT Messungen mit einem Wassertropfen in Squalen und definierten Konzentrationen an DPPC durchgeführt. Abbildung 4.1 zeigt den Verlauf der Grenzflächenspannung γ über der Zeit nach der Erzeugung eines Tropfens für drei verschiedene Konzentrationen: 0,01 mM, 0,05 mM und 0,5 mM DPPC in der Volumenphase Squalen. Die Adsorption wurde über einen Zeitraum von 2000 s beobachtet, nur für die höchste Konzentration wurden die Tropfen, aufgrund niedriger Grenzflächenspannungen instabil, und lösten sich von der Kapillare. Da das Ende der Messpunkte durch den Abriss des Tropfens gekennzeichnet wird, kann die Grenzflächenspannung im Gleichgewichtszustand γ_e für $\lim_{t \rightarrow \infty} \gamma(t)$ extrapoliert werden [37], wie auf der rechten Seite von Abbildung 4.1 dargestellt und in Tabelle 4.1 eingetragen. Konkret kann graphisch die Auftragung von γ gegen $t^{-1/2}$ dargestellt werden, um mit einer Linearisierung der letzten Messpunkte und dem dann ermittelten Achsenschnittpunkt das Gleichgewicht zu ermitteln, wie in der Publikation von Hildebrandt *et al.* [45] dargestellt. Weiterhin wurde die CAC für DPPC in Squalen ermittelt, welche bei $\text{CAC} = 0,103 \text{ mM}$ liegt, wie in Anhang 1 gezeigt.

Tabelle 4.1: Grenzflächenspannungen aus der PAT Messung von Wasser und Squalen mit definierter DPPC Konzentration. Dargestellt sind die Grenzflächenspannungen nach 10 min $\gamma(10min)$, im Gleichgewicht γ_e und das Verhältnis beider Werte.

Konzentration DPPC c [mM]	Grenzflächenspannung $\gamma(10min)$ [N/m]	Grenzflächenspannung im Gleichgewicht γ_e [N/m]	Relative Grenzflächenspannung $\gamma(10min) / \gamma_e$ [N/m]
0,01	22,7	19,9	1,14
0,05	11,7	9,59	1,22
0,5	8,5	4,98	1,71

Um eine Abschätzung der Adsorption während der Emulgierung zu ermitteln, werden die Grenzflächenspannungen nach 10 min dargestellt und relativ zur Spannung im Gleichgewicht gesetzt. Die Auswahl des Zeitpunktes von 10 min erfolgte nach zwei Kriterien:

- In den folgenden Messungen zur Emulsionsstabilität mittels DLS ist nach 10 min eine charakteristische Änderung in der Instabilität zu sehen und
- bei der Herstellung der Emulsionen zeigte sich empirisch ein Minimum für die Tropfengröße, da bei kürzeren Ultraschallbehandlungen größere Tropfen entstanden und es bei längeren Behandlungsdauern ebenfalls keine weitere Verbesserung der Größe und Verteilung gab.

Tabelle 4.1 zeigt, dass die Grenzflächenspannungen nach 10 min bei 0,01 mM 14% über dem Gleichgewichtszustand liegt, während bei den höheren Konzentrationen von 0,05 und 0,5 mM DPPC die Grenzflächenspannung sogar 22% bzw. 70% über dem Gleichgewichtswert liegt. Da bei höheren Konzentrationen auch ein höheres treibendes Gefälle vorliegt, scheint die Adsorption durch die zunehmende Belegung an der Grenzfläche limitiert zu sein. Entsprechend kann gefolgert werden, dass bei der Emulgierung nach 10 min die Grenzflächen nicht den Gleichgewichtszustand erreicht haben, der zu einer Stabilisierung der Emulsion beitragen würde.

In Abwägung der untersuchten Kinetik wurde das Emulgiervorgehen mit Ultraschalldispersion angepasst. Jede Probe wurde in drei wiederholten Durchläufen untersucht, mit je einem Emulgierschritt gefolgt von einer Stabilitätsmessung. Diese Weise ermöglicht es dem Emulgator über einen langen Zeitraum und

Schrittweise die Grenzflächen zu belegen. Das genaue Verfahren ist im Methodenteil auf Seite 35 beschrieben.

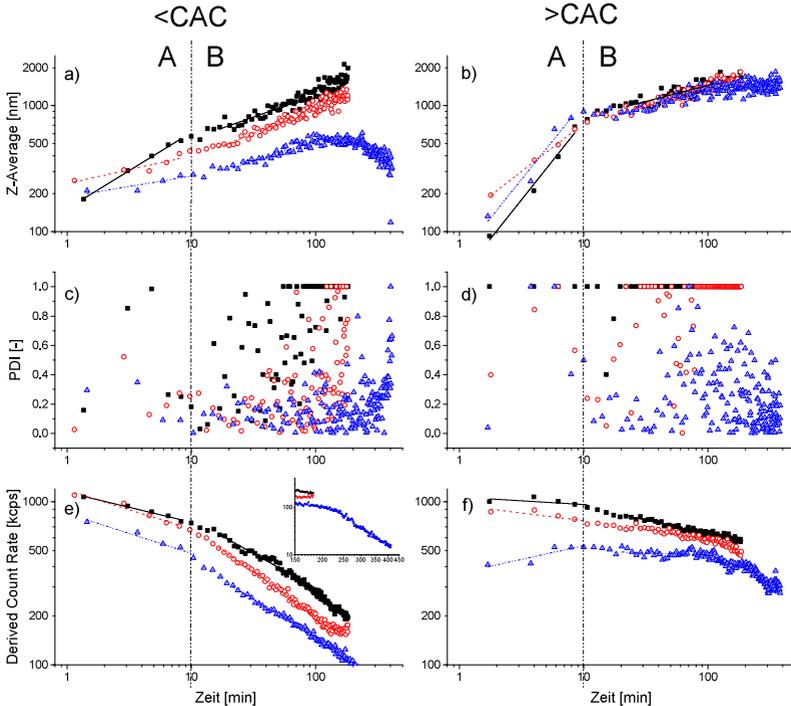


Abbildung 4.2: DLS Stabilitätsmessung von Wasser in Squalen Emulsionen mit 0,08% disperser Phase und zwei Konzentrationen an DPPC, die linke Spalte mit 0,04 mM und die rechte Spalte mit 0,4 mM. Dargestellt sind je Reihe der zeitliche Verlauf des Durchmessers (Z-Average), der Polydispersitätsindex (PDI) und die Signalintensität (DCR). Es wurden repetitiv drei Ultraschallbehandlungen an einer Probe durchgeführt, hier dargestellt in vollen Quadraten, offenen Kreisen und offenen Dreiecken. Deutlich werden zwei Phasen der Instabilität, die hier als Regime A und B vor und nach der kritischen Zeit von 10 min eingezeichnet sind und zwischen denen sich die Wachstumsraten und das DCR verändern.

Die Abbildung 4.2 zeigt den zeitlichen Verlauf instabiler DPPC WO Emulsionen anhand der Tropfengrößen (Z-Average), Polydispersitätsindex und Signalintensität (DCR). Es wurden zwei Konzentrationen an DPPC untersucht, 0,04 mM und 0,4 mM, welche jeweils unter- und oberhalb der ermittelten CAC von DPPC in

Squalen (CAC = 0,103 mM) liegen. Deutlich ist eine Änderung in den Steigungen der Größe und DCR bei etwa 10 min zu sehen. Dies wurde in den Abbildungen mit der Einteilung in die Regime A und B eingezeichnet. Die Verläufe wurden mit einer Potenzfunktion angepasst, die im doppellogarithmischen Plot linear dargestellt wird. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Regression hat die Form

$$\log \bar{d}(t) = m \cdot \log(t) + \log \bar{d}(t = 1 \text{min}) \quad (4-1)$$

$$\text{oder } \bar{d}(t) = \bar{d}(t = 1 \text{min}) \cdot t^m,$$

mit dem mittleren Tropfendurchmesser d in Abhängigkeit der Zeit t , mit Exponent m . Der Fehler in Form des mittleren quadratischen Fehlers (root mean square error, RMSE) wurde nach folgender Gleichung zur Abweichung der Regression von den Messwerten berechnet:

$$\mathbf{RMS\ Error} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\bar{d}_{exp}(t_i) - \bar{d}(t_i))^2}. \quad (4-2)$$

Für die mittlere Tropfengröße ist während der ersten Minuten im Regime A eine höhere Steigung zu sehen, als in Regime B, wobei die Tropfen durchgehend wachsen und die Emulsion somit eine deutliche Instabilität aufweist. Die DCR zeigt eine negative Steigung, welche im Regime B noch verstärkt wird. Ebenso ist in Tabelle 4.2 der Schnittpunkt der beiden Regressionen angegeben, die bei etwa 10 min liegt und somit den optischen Eindruck bestätigt.

Tabelle 4.2: Regression der Größenentwicklung von WO Nanoemulsionen mit Squalen und DPPC aus Abbildung 4.2 mit einem Potenzansatz mit der mittleren Größe $\bar{d}(t)$

Konzentration [mM]		0,04			0,4		
Dispergierung		1.	2.	3.	1.	2.	3.
Extrapolierte Anfangsgröße [nm] $\bar{d}(t = 1\text{min})$	A	151	240	188	42	124	63
	B	242	156	117	443	360	379
Wachstumsrate m [$\log \frac{nm}{min}$] in Gl. (4-1)	A	0,60	(0,21)	(0,16)	1,24	0,76	1.22
	B	0,34	0,38	0,32	0,25	0,29	0.27
RMS Fehler [nm] nach Gl. (4-2)	A	5,64	9,82	5,76	19,86	5,63	30.4
	B	12,05	7,23	5,16	17,21	13,56	13.98
Schnittpunkt A+B [min]		6,25	n.a.	n.a.	10,8	9,69	6.52

Um den Instabilitätsmechanismus genauer zu charakterisieren und Rückschlüsse auf die Art und den Wechsel der Regime zu ziehen, werden im Folgenden die Wachstumsraten m analysiert. Viele Studien erklären Ostwaldreifung als Hauptmechanismus für das Wachstum von Tropfen [107]. Dem Ansatz von Lifshitz-Slyosov-Wagner (LSW) folgend verhält sich das Wachstum der Ostwaldreifung proportional zum Volumen der Tropfen $\bar{d}(t) \sim t^{1/3}$, wie in Gleichung (2-2) dargestellt. Koaleszenz ist hingegen nicht durch einen allgemein akzeptierten Ansatz für das Tropfenwachstum beschrieben. Der Ansatz nach Deminiere [50], eine Proportionalität zum hydrodynamischen Durchmesser zu finden, konnte für die vorliegenden Emulsionen nicht nachgewiesen werden. Allgemein ist der Zustand der Emulsionen sehr flüchtig und eine steigende Elastizität $\partial \Pi / \partial \ln A$ (mit der Filmspannung $\Pi = \chi(0) - \chi(t)$) wirkt der Koaleszenz entgegen [47]. Die Steigungen in Regime A liegen $0,6 \leq m_A \leq 1,24$, wobei die 2. und 3. Dispergierung bei 0,04 mM so geringe Steigungen zeigen, dass keine Unterscheidung zu Regime B vorliegt und ein stabilisierender Effekt vorliegt. Vereinfacht könnten die Steigungen in Regime A der Koaleszenz zugeordnet werden, da die Werte ein wesentlich schnelleres Wachstum, als es durch Ostwaldreifung möglich wäre, aufweisen. Eine Überlagerung der Effekte ist jedoch denkbar und soll anhand weiterer Daten gezeigt werden.

Regime B zeichnet sich durch Wachstumsraten m_B zwischen 0,32 und 0,38 für die Konzentration von 0,04 mM aus, was sehr stark den theoretischen Werten für die Ostwaldreifung von $m_{Ostw} = 0,33$ entspricht. Für die höhere Konzentration von 0,4 mM liegen die Werte m_B unterhalb dieser Grenze, was auf eine gehinderte Ostwaldreifung hinweist.

Die Anfangsgrößen der Emulsionstropfen bei $\bar{d}_{exp}(t = 1 \text{ min})$ liegen für $c = 0,04 \text{ mM}$ um 180 nm und für $c = 0,4 \text{ mM}$ um 80 nm, jeweils bei allen drei Wiederholungen der Emulgierung. Eine Abhängigkeit der Anfangsgröße ist daher nur von der Konzentration c zu sehen, die den Erwartungen aus der Tensiometrie entspricht, da die absolute Grenzflächenspannung γ niedriger liegt und somit energetisch günstiger ist.

Die wiederholte Emulgierung hat keinen positiven Effekt auf die initiale Tropfengröße bei $c = 0,04 \text{ mM}$, allerdings ist das Wachstum deutlich reduziert. Bei der 1. Emulgierung kommt es zu $\bar{d}(100 \text{ min}) > 1 \mu\text{m}$, während es bei dem 3. Emulgierschritt ein absolutes Maximum bei $\bar{d}(100 \text{ min}) = 500 \text{ nm}$ gibt, sodass im Folgenden $m_B \leq 0$ fällt und die Tropfen wieder kleiner werden. Von diesen beobachteten Effekten unterscheidet sich die Situation bei $c = 0,4 \text{ mM}$ sehr stark. Die drei Verläufe sind sehr stark überlagert, es gibt in Regime A nach der 3. Emulgierung sogar leicht größere Tropfen und in Regime B sind insgesamt minimal reduzierte Tropfen zu sehen. Sehr markant ist der Unterschied den die wiederholte Emulgierung auf Nanoemulsionen mit einer Konzentration $c < \text{CAC}$ hat. Dies äußert sich in einer stabilisierenden Wirkung und kleineren Tropfen, während bei $c > \text{CAC}$ kein signifikanter Effekt erkennbar ist.

Die Entwicklung der Signalintensität, in Form der derived count rate (DCR), zeigt in Abbildung 4.2 e) und f) klare Ähnlichkeiten zu der zuvor dargestellten Evolution der Tropfengrößen in Abbildung 4.2 a) und b). Für die Konzentration von $c = 0,04 \text{ mM} < \text{CAC}$ gibt es einen Übergang von Regime A zu B, mit einer stärkeren Abnahme des Signals in Regime B als es in A der Fall ist. Nach der wiederholten Emulgierung beginnt die DCR auf dem gleichen Niveau wie zuvor. Nach 180 min in Regime B liegt die DCR im 2. Durchgang etwa 18 % unter dem 1. Emulgierschritt, während die 3. Emulgierung zu einer Reduzierung um 38 % am Ende von Regime A und 78 % am Ende des Regime B führt.

Für den Verlauf der DCR in Abbildung 4.2 f), für die Konzentration von $c = 0,4 \text{ mM} > \text{CAC}$ ist ebenfalls ein leichtes Gefälle vorzufinden. Bei der 1. und 2.

Emulgierung nimmt das Signal während der Dauer des Regime A um etwa 10% ab. Die 3. Emulgierung führt zu einer stärkeren Abnahme um 34%. In Regime B nimmt das Gefälle aller drei Emulgierschritte weiter zu, jedoch ist der Unterschied zwischen den Schritten geringer. Zum Zeitpunkt von 180 min ist die DCR der 2. Emulgierung 17% geringer als die der 1. Ebenso ist die Abnahme im 3. Schritt geringer, insbesondere beim Vergleich der Magnituden der Signale zwischen beiden Konzentrationen von $c = 0,4 \text{ mM}$ und $c = 0,04 \text{ mM}$, mit 300 kcps gegen nur 15 kcps.

Der Polydispersitätsindex (PDI) in Abbildung 4.2 c) und d) ist sehr weit gestreut, jedoch können trotzdem ein paar generelle Trends beobachtet werden: Bei der Konzentration von $c = 0,04 \text{ mM}$ steigt der PDI der 1. Emulgierung langsam von 0,2 an und nähert sich breit gestreut dem Wert 1, der ab 180 min konstant bleibt, während bei $c = 0,4 \text{ mM}$ der PDI bereits zu Beginn maximale Werte erreicht. Bei $c = 0,04 \text{ mM}$ im 2. Emulgierschritt ist mit einem langsam steigenden PDI um 0,2 bis 30 min und erst darauf folgendes Erreichen des Maximums ein ähnliches Verhalten sichtbar. Währenddessen werden für $c = 0,4 \text{ mM}$ früher mittlere Werte um 0,5 erreicht, die aber erst gegen 100 min auf 1 steigen. Die 3. Emulgierung beeinflusst den PDI hingegen bei beiden Konzentrationen stark. Im Falle von $c = 0,04 \text{ mM}$ bleibt der PDI für ~300 min im Bereich von 0,2 und steigt erst sehr spät auf den Maximalwert von 1. Das Verhalten des PID bei $c = 0,04 \text{ mM}$ ist etwa gegenläufig, insofern als zu Beginn der Messung starke Schwankungen zwischen 0,1 und 1 vorliegen, die erst für Zeiten $t > 100 \text{ min}$ unterhalb von 0,6 und für Zeiten von $t > 300 \text{ min}$ unterhalb von 0,2 sinken.

Insgesamt zeigt die mehrfache Emulgierung einen sehr positiven Effekt auf den PDI, sowohl ober- als auch unterhalb der CAC. Für $c < \text{CAC}$ wird mit jedem Schritt ein besserer PDI erreicht, während für $c > \text{CAC}$ nur beim 3. Emulgierschritt deutliche Abnahmen der Tropfengröße zu beobachten sind.

Die bisher diskutierten Größen von Z-Average und PDI sind nicht geeignet, um sehr breite oder multimodale Größenverteilungen darzustellen, auch wenn sie generelle Trends gut abbilden. Wie in der Theorie beschrieben, lassen sich aus der Änderung der Verteilung auch Schlüsse über den Instabilitätsmechanismus ziehen. Im Folgenden wurden daher Tropfengrößenverteilungen aus den Anpassungen der DLS Daten mit multiexponentialen Funktionen betrachtet. Es wurden für beide Regime die Verteilungen über der Zeit aufgetragen, wie in Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4 gezeigt. Abbildung 4.3 behandelt den Verlauf während des Re-

gimes A, entsprechend zwischen 1 und 10 min. Abbildung 4.3 a) zeigt die 1. Emulgierung bei $c = 0,04$ mM mit einer Größe von $\bar{d} = 180$ nm zu Beginn (~ 1 min) und einer halbmaximalen mittleren Verteilungsbreite $w_{50} = 79$ nm, die sich dann zu einer Größe von $\bar{d}(10\text{min}) = 524$ nm entwickelt mit einer Breite von $w_{50} = 246$ nm.

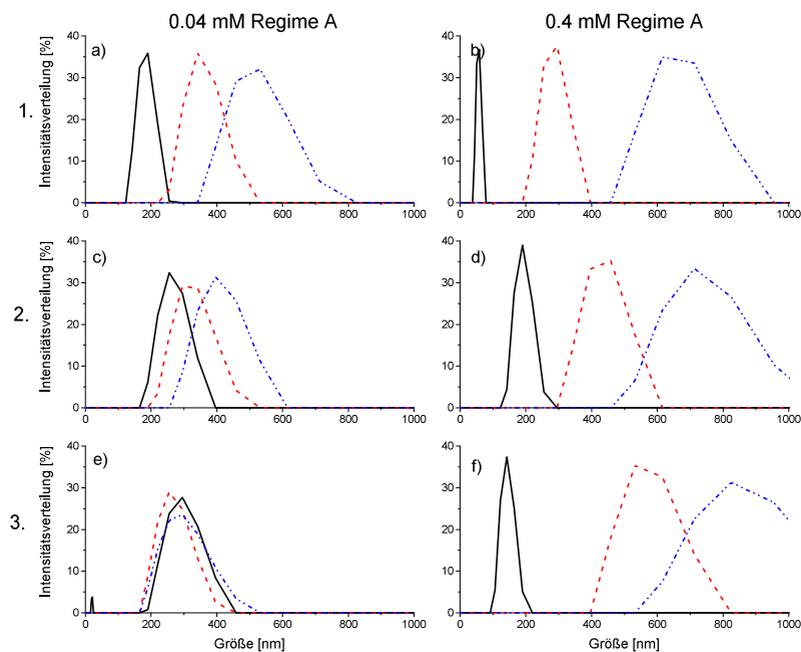


Abbildung 4.3: Entwicklung der Tropfengrößenverteilungen in der WO Emulsion mit DPPC und Squalen. Die drei Reihen zeigen die drei Emulgierschritte (1., 2. und 3.), während die Spalten die Konzentration an DPPC, mit $c = 0,04$ mM auf der linken und $c = 0,4$ mM auf der rechten Seite, widerspiegeln. Alle gezeigten Verteilungen entsprechen konkreten Zeitpunkten t in Regime A ($t < 10$ min), explizit bei $t \sim 1$ min (schwarze Linie), $t \sim 5$ min (rot gestrichelt) und $t \sim 10$ min (blau strich-punktiert).

Im Vergleich dazu gibt es geringere Änderungen nach der 2. Emulgierung, wie in Abbildung 4.3 c) gezeigt. Die Emulsion zeigt zunächst größere Tropfen mit $\bar{d} = 255$ nm und einer Breite von $w_{50} = 118$ nm, die sich zu einer Größe und Breite von $\bar{d} = 414$ nm und $w_{50} = 192$ nm bei $t \sim 10$ min entwickelt. Die 3. Emulgierung folgt diesem Trend mit einer fast konstanten Tropfengrößenverteilung

lung, siehe Abbildung 4.3 e). Die mittlere Größe bleibt fast konstant bei $\bar{d} = 211$ nm und die Verteilungsbreite schwankt leicht von $w_{50} = 150$ nm zu 140 nm und 160 nm bei Zeiten von $t \sim 1$, ~ 5 und ~ 10 min. Die Graphen in Abbildung 4.3 b), d) und f), für die drei Emulgierschritte bei $c = 0,4$ mM, zeigen eine andere Entwicklung: b) legt dar, wie die Größe nach der 1. Emulgierung von $\bar{d} = 100$ nm auf 700 nm wächst und die Verteilung von $w_{50} = 20$ nm auf 285 nm steigt. Die 2. und 3. Emulgierung in Abbildung 4.3 d) und f) werden ebenso von starkem Wachstum geprägt, da beide Kurven bei etwa $\bar{d} = 200$ nm starten und auf 700 nm bzw. 900 nm mit Verteilungsbreiten von $w_{50} = 400$ nm nach ~ 10 min steigen. Die beiden Konzentrationen führen zu entgegengesetzten Entwicklungen durch die wiederholte Emulgierung mit einer Fokussierung der Verteilung für $c = 0,04$ mM, während bei $c = 0,4$ mM die Tropfen schnell größer werden und eine breitere Verteilung einnehmen.

Für Regime B, den Zeitraum oberhalb der Marke von 10 min, sind die Tropfengrößenverteilungen in Abbildung 4.4 aufgetragen. Wie zuvor in Abbildung 4.3 zeigen die Spalten die Konzentrationen an DPPC, von $c = 0,04$ mM auf der linken und $c = 0,4$ mM auf der rechten Seite. Die drei Wiederholungen der Emulgierung an einer Probe sind in den drei Reihen von oben nach unten abgebildet. Um die Entwicklung im Regime B aufzuzeigen wurden Tropfengrößenverteilungen zu den Zeitpunkten ~ 15 min, ~ 40 min, ~ 70 min und ~ 90 min aufgetragen. Die 1. Emulgierung bei $c = 0,04$ mM, in Abbildung 4.4 a), zeigt einen Verlauf von $\bar{d} = 814$ nm zu 1186 nm, wobei die Verteilungsbreite jedoch konstant zwischen $w_{50} = 182$ nm und 217 nm bleibt. Mit einem Wachstum der mittleren Größe $\bar{d} = 493$ nm auf 896 nm sind die absoluten Größen nach dem 2. Emulgierschritt geringer, die Verteilungsbreite sinkt jedoch von $w_{50} = 271$ nm auf 182 nm ab. Die 3. Emulgierung zeigt wiederum nochmals kleinere absolute Größen mit einem Wachstum bis zu $\bar{d} = 458$ nm, aber einer leichten Steigung der Verteilungsbreiten von $w_{50} = 108$ nm auf 167 nm. Im Vergleich dazu zeigt sich bei der höheren Konzentration von $c = 0,4$ mM, über die drei Wiederholungen ein gleichsames Größenwachstum von etwa $\bar{d} = 900$ nm auf 1200 nm, jedoch folgen die Verteilungsbreiten keinem klaren Trend. Die Breiten liegen für die 1. Emulgierung zwischen $w_{50} = 197$ nm und 246 nm. Ähnliche Werte, von $w_{50} = 187$ nm bis 232 nm, werden auch in der 2. Emulgierung erreicht, wohingegen nur während des 3. Durchgangs leicht erhöhte Breiten von $w_{50} = 236$ nm bis 325 nm erreicht werden.

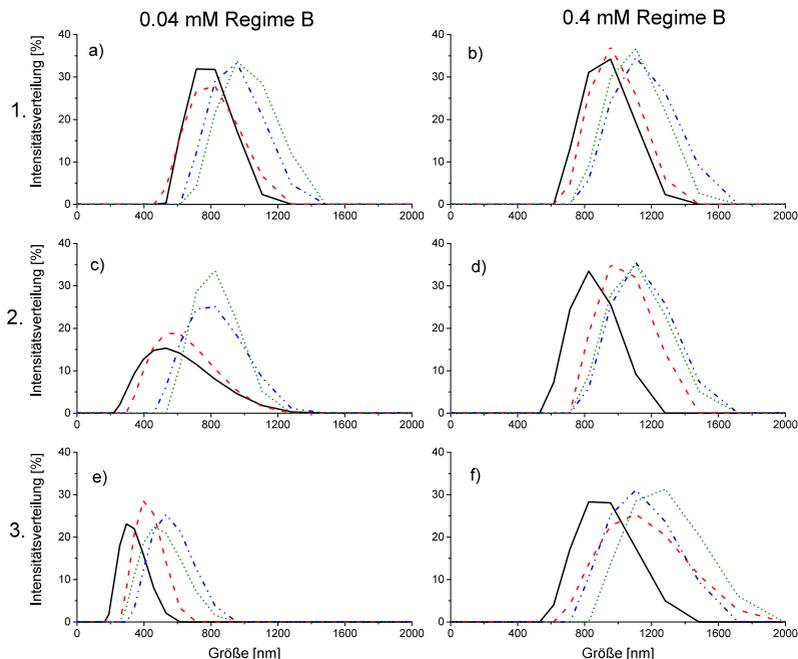


Abbildung 4.4: Entwicklung der Tropfengrößenverteilungen in der WO Emulsion mit DPPC und Squalen. Die drei Reihen zeigen die drei Emulgierschritte (1., 2. und 3.), während die Zeilen die Konzentration an DPPC, mit $c = 0,04$ mM auf der linken und $c = 0,4$ mM auf der rechten, widerspiegeln. Alle gezeigten Verteilungen entsprechen konkreten Zeitpunkten t in Regime B ($t > 10$ min), explizit bei $t \sim 15$ min (schwarze Linie), $t \sim 40$ min (rot gestrichelt), $t \sim 70$ min (blau strich-punkt) und $t \sim 90$ min (grün punkt).

Insgesamt kann kein klarer Trend für eine Fokussierung oder Verbreiterung der Verteilungen bei $c = 0,4$ mM in Regime B gefunden werden. Im Gegensatz zu den Darstellungen des PDI in Abbildung 4.2 werden die monomodalen Verteilungen durch die 3 Wiederholungen nicht signifikant beeinflusst, obwohl die komplette Verteilung, dargestellt durch den PDI, die auch sehr große Partikel beinhaltet, durch die wiederholte Emulgierung geringer wird.

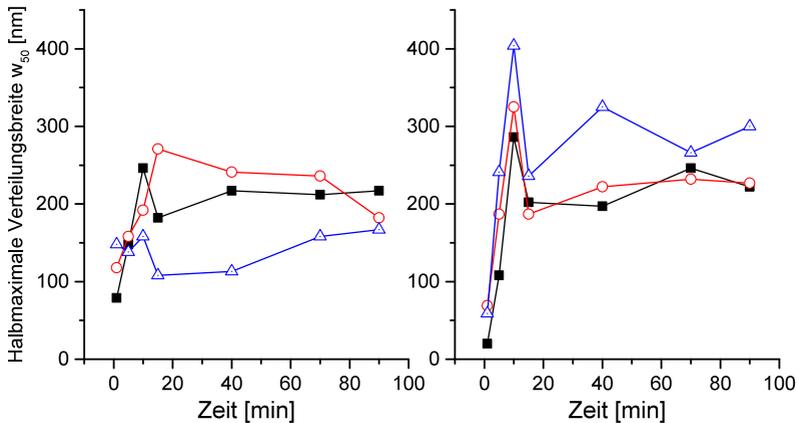


Abbildung 4.5: Entwicklung des $w_{50}(t)$, der Verteilungsbreiten bei halbmaximaler Intensität über die Zeit. Die erste, zweite und dritte Emulgierung sind entsprechend durch quadratische, runde und dreieckige Symbole gekennzeichnet. Die linke Grafik repräsentiert die Konzentration von $c = 0,04$ mM, die rechte Seite $c = 0,4$ mM.

Die Entwicklung der Verteilungsbreiten $w_{50}(t)$ aus Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4 können zusammenfassend in Abbildung 4.5 dargestellt werden. Auffällig an der Darstellung ist insbesondere die starke Schwankung der Werte am Wechsel der Regime A und B bei etwa 10 min. Die Interpretation dieses Verhaltens wird im folgenden Abschnitt zusammengefasst. Weiterhin sei darauf hingewiesen, dass weitere Experimente in gleicher Verfahrensweise mit POPC durchgeführt wurden, hier jedoch nicht im Detail dargestellt werden.

4.1.1 Interpretation der Instabilität

Die präsentierten Messergebnisse sollen nun in einem umfassenden morphologischen Modell dargestellt werden, das die Wechselwirkungen und Strukturen der drei Phasen beschreibt. Abbildung 4.6 zeigt vier Zustände für die gegebenen Konditionen in den Regimen A und B, sowie den zwei Konzentrationen an Phospholipid über- und unterhalb der CAC.

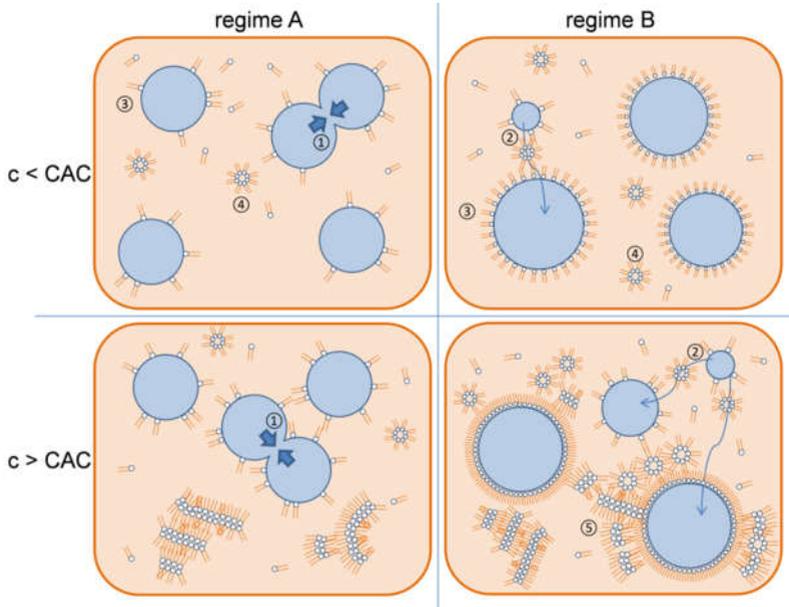


Abbildung 4.6: Interpretation des Tropfenwachstums durch Koaleszenz ① und Ostwaldreifung ② in zwei Regimen A und B, über und unter der CAC. Die Bildung von DPPC Monoschichten ③ an der Grenzfläche von Squalen/Wasser und dispersen inversen Mizellen ④ findet bei der Konzentration von $c = 0,04$ mM (unter der CAC) statt, während bei $c = 0,4$ mM (oberhalb der CAC) die inversen Mizellen an den Monoschichten [100] haften oder größere Lipidaggregate ⑤ bilden [42].

Die Tatsache, dass die Wachstumsraten m_d in Regime A sowohl für $c < CAC$ (nur 1. Emulgierung), als auch für $c > CAC$ (alle Emulgierungen) größer sind als in Regime B, wird als Ergebnis der niedrigen anfänglichen Oberflächendichte der Phospholipide gewertet. Eine niedrige Packungsdichte führt zu Koaleszenz der Tropfen, die aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung kollidieren. Dies ist in Abbildung 4.6 durch ① verdeutlicht. Die Vereinigung der Tropfen durch Koaleszenz führt zu einer engeren Packung der Lipide, da die Oberfläche reduziert wird und sich die Monoschichten vereinigen, siehe ③. Für die Konzentration $c < CAC$ wächst die Tropfengröße in Regime A bis auf das 3-fache (nur 1. Emulgierung), während für $c > CAC$ 4 bis 7-fache Werte erreicht werden. Entsprechend wird die Oberfläche pro Volumen um das 3 bis 7-fache komprimiert. In der Folge wird die Koaleszenz immer weiter erschwert, da die zunehmende Packungsdichte nicht weiter komprimiert werden kann und der weiteren Vereinigung entgegen-

wirkt. Der Übergang von Regime A zu B wird daher als Effekt der Verhinderung von Koaleszenz durch steigende Oberflächendichten der Lipide und sterische Hinderung der Kollision interpretiert.

Wie bereits erwähnt, liegen die Wachstumsraten m_A der 2. und 3. Emulgierung bei $c < CAC$ nicht über den Steigungen m_B in Regime B, sondern sogar leicht darunter und fallen daher aus dem Trend. Dieses Verhalten wird wie folgt interpretiert: Nach dem ersten Durchgang bilden sich im Regime B Monoschichten an den Grenzflächen der Tropfen, die dort auch bei der 2. und 3. Emulgierung verbleiben. Die Grenzflächen sind somit bereits zu einem höheren Grad belegt, als es zu Beginn der 1. Emulgierung der Fall war. Die dicht gepackte Monoschicht hindert dann, ebenso schon während des Regimes A, die Koaleszenz. Im Gegensatz dazu steht das Verhalten der Emulsionen bei $c > CAC$ in Regime B, bei denen wir die Bildung von inversen Mizellen (4) [108] und Lipidaggregaten (5) erwarten. Die Entstehung von Lipidaggregaten und deren Größe wurde in einer eigenständigen Studie hinlänglich von Hildebrandt et al. [45] untersucht. Bei der 2. und 3. Emulgierung bleiben Lipidaggregate an den Grenzflächen und in den inversen Mizellen bestehen. Diese Lipide sind bei der erneuten Dispergierung nicht für die Stabilisierung der Oberflächen verfügbar und können daher auch nicht der Koaleszenz entgegen wirken. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Regime A durch Koaleszenz dominiert wird, während Regime B hauptsächlich durch Ostwaldreifung (siehe (2)) geprägt wird, wie durch die zuvor dargestellten Wachstumsraten und deren Vergleich mit der Theorie bestätigt wird.

Das morphologische Modell in Abbildung 4.6 ist nicht nur mit der Entwicklung der Tropfengröße $\bar{d}_{exp}(t)$ stimmig, sondern es lässt sich auch auf den Verlauf des Polydispersitätsindex $PDI(t)$, der Signalintensität „derived count rate“ $DCR(t)$, sowie der Evolution der halbmaximalen Verteilungsbreiten $w_{50}(t)$ anwenden. Zunächst wird die $DCR(t)$ betrachtet, dessen Verlauf in Abbildung 4.2 dargestellt wurde. Auffällig an dem Verlauf sind dabei i) die linearen Steigungen des Potenzansatzes in der doppellogarithmischen Auftragung und ii) der markante Knick am Übergang von Regime A zu B. Die Potenzregressionen resultieren aus der Abhängigkeit der Steigungen von der unmittelbaren Anzahl an Partikeln zum diskreten Zeitpunkt, nicht zu der anfänglichen Anzahl, was zu einer Linearregression in der linearen Darstellung führen würde. Für den Bereich $c < CAC$ sind die Steigungen der DCR in Regime A alle gleichwertig für jeden Emulgierschritt, während das Größenwachstum für die 1. Emulgierung sich von der 2. und 3. Emulgierung unterscheidet. Daher kann geschlossen werden, dass die Entwicklung der

DCR in Regime A nicht nur von der Änderung der Partikelgröße abhängt, sondern auch durch andere Faktoren beeinflusst wird, wie im Folgenden aufgezeigt wird.

Es gibt starke Hinweise, die auf eine Diffusion von Wasser aus den kleinsten Tropfen (mit dem höchsten Druck) hindeuten, welches an den hydrophilen Gruppen des DPPC adsorbiert und in Form von inversen Mizellen vorliegt. Die inversen Mizellen werden als nötiges Transportmittel für Ostwaldreifung zwischen den Tropfen angesehen. Die Bildung von inversen Mizellen durch Phospholipide wurde in verschiedenen organischen Phasen durch aktuelle Literatur nachgewiesen [109,110]. Dabei wurde gezeigt, dass das molare Verhältnis von Wasser zu Phospholipid w_0 im Bereich von $w_0 = 1-16$ liegt und der hydrodynamische Durchmesser d_h von w_0 abhängt ($d_h = 32.6 \text{ \AA} + 2.8 \text{ \AA} \times w_0$) [109]. Es wird geschlossen, dass DPPC in Form von inversen Mizellen die Ostwaldreifung begünstigt, da Wasser praktisch unlöslich in reinem Squalen ist. Für die Konzentration von $c = 0.04 \text{ mM}$ liegt das molare Verhältnis von Wasser zu DPPC bei 1100:1, was für den hier beschriebenen Fall bedeutet, dass ein Reservoir an inversen Mizellen vorliegt, welches in der Lage ist Wasser aufzunehmen. Ein Wassermolekül, welches an eine inverse Mizelle gebunden ist, trägt nicht zur Signalintensität der DCR bei, weil der hydrodynamische Durchmesser mit $d_h \leq 5 \text{ nm}$ zu klein ist. Die fallende Signalintensität des DCR zeigt daher den Transfer von Wasser aus den Tropfen in inversen Mizellen. Diese Interpretation des Signalverlustes ist weiterhin durch die Tatsache untermauert, dass nach der 2. Emulgierung die Intensität der DCR das gleiche Niveau wie zuvor erreicht. Folglich ist der Prozess des Verlustes von Tropfen durch die Diffusion reversibel.

Im Vergleich zwischen Regime A und B verändert sich die Steigung der DCR und wird steiler in Regime B. Dieses Verhalten wird als Konsequenz aus der Ostwaldreifung interpretiert, bei der es während der Verkleinerung von Tropfen zu einer Verdichtung der Monoschicht bis zur maximalen Packungsdichte kommt. Bei einer weiteren Verkleinerung wird DPPC wieder in Form von inversen Mizellen in Lösung gebracht, wodurch sich das Reservoir für Wasser in Mizellen weiter vergrößert. Zum Zeitpunkt von $t > 200 \text{ min}$ verstärkt sich der Effekt weiter und die DCR sinkt noch rapider. Dies wird aus der ebenso stark sinkenden Größe der Tropfen heraus so interpretiert, dass die Tropfen nahezu verschwinden und somit nicht mehr gemessen werden. Weiterhin wird auch dort Lipid in inversen Mizellen freigesetzt.

Die Änderungen in der $DCR(t)$ zeigt starke Unterschiede zwischen den Konzentrationen über und unter der CAC. Offensichtlich nimmt die DCR für $c < CAC$ wesentlich schneller ab, sowohl in Regime A als auch in B. Diese Differenzen nach Konzentration und Regime werden unabhängig voneinander kategorisiert und ebenso mit dem morphologischen Modell nach Abbildung 4.6 erklärt. In Regime A ist die abweichende Steigung der DCR durch die schnellere Bedeckung mit einer Monoschicht (siehe Abbildung 4.1) und in weiterer Konsequenz mit der Assoziierung der inversen Mizellen an die dichten Monoschichten zu verstehen, wie auch in der Literatur von Campana et al. 2012 beschrieben [108]. Inverse Mizellen, die an den Tropfen gebunden sind, führen zu der Messung von größeren Tropfen, was bei gelösten Mizellen aufgrund des starken Unterschiedes zu Tropfen nicht der Fall ist. In Regime B wird die Varianz der DCR Steigungen zwischen den Konzentrationen durch dickere Lipidschichten an den Tropfen (siehe ⑤) hervorgerufen, die eine Diffusion durch die Wand der Tropfen stärker hemmen. Weiterhin führt die Diffusion von Wasser in die inversen Mizellen an der Lipidwand ebenso zu steilerem Gefälle in der DCR.

Wird die Entwicklung des $PDI(t)$ betrachtet, scheint es einen generellen Trend zu einem niedrigeren PDI mit jeder Emulgierung zu geben. Dieser Umstand stimmt mit dem Verhalten, dass eine längere Emulgierung zu einer homogeneren Verteilung führt, überein, während sowohl Ostwaldreifung, als auch Koaleszenz prinzipiell zu einer inhomogeneren Verteilung führen. Eine detailliertere Ausführung der Instabilität auf die Tropfengrößenverteilung wird im Folgenden mit den Daten der halbmaximalen Verteilungsbreiten $w_{50}(t)$ diskutiert.

Der $PDI(t)$ der 3. Emulgierung bei $c > CAC$ ist auffällig, da es der einzige Fall ist, bei dem der PID auch für Zeiten $t > 100$ min im kleinen Bereich bleibt. Die analoge Probe für $c < CAC$ zeigt einen gegenläufigen Trend. Der Unterschied der beiden Proben beläuft sich dabei vor allem in den Größen, bei $c < CAC$ liegt die Z-Average immer < 500 nm, mit weiterem Sinken der Größe und sehr steil fallenden DCR im Bereich < 150 kcps. Im Gegensatz dazu liegt bei $c > CAC$ die Größe über 1000 nm und die DCR liegt zwischen 500 und 300 kcps. Dies bedeutet, dass die Tropfen bei $c < CAC$ durch die Sammlung von Wasser in den inversen Mizellen fast komplett verschwunden sind. Für $c > CAC$ hingegen werden die kleineren Tropfen durch Ostwaldreifung eliminiert, sodass die verbleibenden größeren Tropfen eine geringere Polydispersität aufweisen.

Die halbmaximale Verteilungsbreite $w_{50}(t)$ aus den Intensitätsverteilungen zeigen auch klare Übereinstimmungen mit dem morphologischen Modell in Abbildung 4.6. Drei wichtige Eigenschaften der Breiten $w_{50}(t)$ aus Abbildung 4.5 sollen hier hervorgehoben werden: i) Die starke Steigerung des w_{50} während des Regime A, mit bis zu 1430% Steigerung in 10 min; ii) Der fast sprungartige Verlauf mit einem deutlichen Rückgang in der Transition von Regime A zu B, prozentual ausgedrückt um maximal 42% innerhalb von 5 min; iii) Der sehr stabile, fast gleichbleibende, Verlauf des $w_{50}(t)$ im Regime B. Vergleicht man diese drei Fakten mit dem morphologischen Modell kommt man zu dem Schluss, dass im Bereich der dominierenden Koaleszenz in Regime A der w_{50} stark steigt, gefolgt von einem klaren Rückgang der Breite am Ende der Koaleszenzphase durch die Stabilisierung mit dichten DPPC Monoschichten [111]. In Regime B verläuft der $w_{50}(t)$ fast konstant oder wächst nur sehr schwach. Diese Folgerungen können durch die bekannten Entwicklungen der Instabilitätsmechanismen gerechtfertigt werden: Koaleszenz ist unselektiv. Partikel verschiedener Größen kollidieren zufällig und vereinigen sich. Der Mechanismus führt folglich zu einem starken Anstieg der Polydispersität, da durch Kollisionen größere Tropfen entstehen, jedoch auch einige sehr kleine Tropfen verbleiben. Im Gegensatz dazu ist Ostwaldreifung ein selektiver Instabilitätsprozess, da kleinere Tropfen in großer Anzahl verschwinden und größere Tropfen nur ein geringes Wachstum im Volumen aufweisen. Dieser Prozess ist in der Transition von Regime A zu B zu sehen, mit dem starken Rückgang des w_{50} . Die ersten Messpunkte des w_{50} in Regime B sind bis zu 58% der letzten Breite aus Regime A. Im Mittel beträgt der erste Wert in Regime B 78% des letzten w_{50} in Regime A. Auf Dauer bleibt der w_{50} während der Ostwaldreifung in Regime B praktisch konstant, sodass die relative halbmaximale Verteilungsbreite $w_{50}(t)/\bar{d}(t)$ sinkt. Die hier gezeigte Entwicklung der Tropfengrößen weist darauf hin, dass Ostwaldreifung nicht der alleinige Instabilitätsmechanismus ist. Dennoch trifft ein Rückgang der relativen Breite $w_{50}(t)/\bar{d}(t)$ für 75% der Daten in Regime B zu, während nur 17% der Verläufe in Regime A das Kriterium erfüllt. Weiterhin sinkt die absolute Verteilungsbreite in Regime B stetig ($w_{50}(t_i) - w_{50}(t_{i-1}) < 0$) in 47% aller Daten. Damit konnte gezeigt werden, dass Ostwaldreifung der dominante, aber nicht ausschließliche, Mechanismus des Tropfenwachstums in Regime B ist.

Aus dem Tropfenwachstum können Volumenströme der Ostwaldreifungsraten berechnet und mit anderer Literatur verglichen werden, um die Plausibilität der Hypothesen einzuschätzen. Beispielsweise hat Taylor die Löslichkeiten von Alkanen in einer kontinuierlichen Wasserphase über den Zusammenhang der LSW

berechnet [112]. Abbildung 4.7 zeigt Ostwaldreifungsraten in Abhängigkeit von dem molaren Volumen der dispersen Phase, ergänzt um Daten von Suriyarak [113] und Taylor [112] für die Ostwaldraten von Alkanen in OW Emulsionen mit Tween und SDS als Emulgator. In Abbildung 4.7 wird deutlich, dass die bestimmten Reifungsraten der WO Nanoemulsionen mit Phospholipiden im typischen Bereich liegen, wenn beachtet wird, dass die absoluten Zahlen, aufgrund des viel kleineren molaren Volumens von Wassermolekülen mit einer resultierenden schnelleren Diffusionsgeschwindigkeit, wesentlich größer sind. Zusätzlich wirkt sich die höhere Viskosität der WO gegenüber der OW Emulsion negativ aus. Mit einer Korrektur, um den Faktor der Viskositäten, wurden die ermittelten Werte ebenso mit weiteren Symbolen in die Abbildung 4.7 eingetragen. Die restliche, geringe Abweichung der experimentellen Werte von der Literatur können den unterschiedlichen Emulgatoren und Bulkphasen zugeschrieben werden.

Zusammengefasst ergibt die Analyse der verschiedenen Effekte der Ostwaldreifungsraten bei 0,04 mM DPPC folgende Ergebnisse:

- a) Die Ostwaldreifungsrate sinkt stark mit der steigenden Anzahl an Emulgierschritten, mit einer Minderung um den Faktor 27,7 von dem ersten zum dritten Emulgierschritt.
- b) Wenn die abweichende Viskosität der kontinuierlichen Phase (hier Squalen, Wasser im Falle der zitierten Literatur) berücksichtigt werden soll, muss ein Korrekturfaktor von 12 angewandt werden.

Für die Konzentration von 0,4 mM DPPC ist, mit einem Faktor von 1,3 in der dritten Emulgierung im Vergleich zum ersten Schritt, keine Abhängigkeit von der Anzahl der Emulgierschritte erkennbar. Folglich ändert sich die morphologische Struktur des Emulgators an den Wassertropfen für die Konzentration oberhalb der CAC mit der Anzahl an Prozessschritten nicht. Im Gegensatz dazu führt eine Konzentration unterhalb der CAC mit jeder Emulgierung zu einer Verdichtung der DPPC Monoschicht an der Grenzfläche.

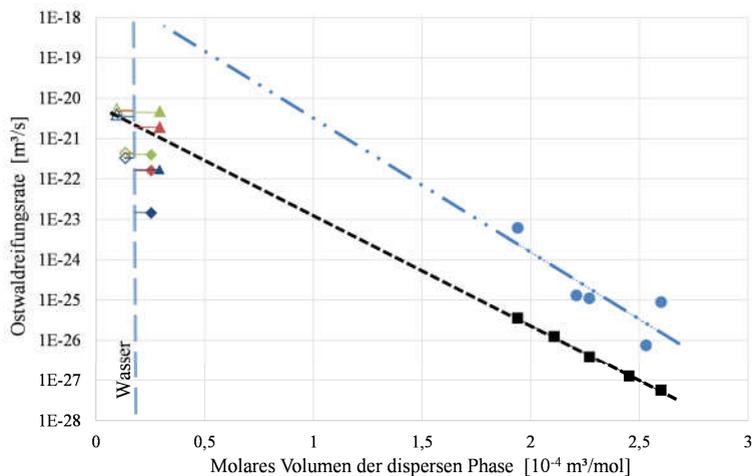


Abbildung 4.7: Ostwaldreifungsraten von verschiedenen Alkan-in-Wasser Emulsionen von Suriyarak et al. [113] (●) und Taylor [112] (■) im Vergleich zu den Reifungsraten der vorliegenden Wasser-in-Squalen Emulsionen mit 0,04mM DPPC, der ersten (◆), zweiten (◇) und dritten (♦) Emulgierung. Die berechneten Reifungsraten sind für die abweichende Viskosität der kontinuierlichen Phase korrigiert (▲, ▲ und ▲ für die erste, zweite und dritte Emulgierung. Die ungefüllten Symbole repräsentieren die Raten bei der Konzentration von 0,4mM DPPC. Um die Unterschiede deutlich abzubilden sind einige Symbole versetzt, wie durch eine Hilfslinie angedeutet, und liegen tatsächlich bei dem molaren Volumen von Wasser.

Die dargestellte Literatur in Abbildung 4.7 nutzt mit Tween und SDS Emulgatoren, die wasserlöslich sind und möglicherweise die Löslichkeit von Alkanen und Alkenen im Wasser der OW Emulsionen erhöhen, während im Falle der WO Emulsionen mit Squalen DPPC eine höhere Löslichkeit im Öl aufweist und somit die Hypothese der Diffusion mittels inversen Mizellen stützt. In einer früheren Publikation diskutiert Taylor die Auswirkungen der Emulgatorkonzentration auf die Ostwaldreifung und folgert, dass sich die Rate unterhalb der CAC linear zur Konzentration verhält, während über der CAC keine Änderung auftritt [114]. Die erfassten Daten wurden mit OW Emulsionen aus Alkanen und hauptsächlich SDS als Emulgator erstellt. Dies stimmt mit dem vorgestellten Modell überein, da nicht nur die Konzentration, sondern auch die intermolekulare Konstellation des Emulgators in Form von Mizellen und Löslichkeiten beachtet wird.

Hoffmann *et al.* interpretieren small angle neutron scattering (SANS) Messdaten zum Austausch in Nanoemulsionen und kommen zu dem Schluss, dass Ostwaldreifung der Hauptmechanismus des Austausches sein muss [115]. Als Hauptfaktor der Diffusion wird die Löslichkeit des dispergierten Alkens im Wasser identifiziert. Die Wahl des Emulgators hat laut Hoffmann *et al.* kaum Einfluss auf die Diffusion. Die Beobachtung einer reduzierten Ostwaldreifung mit langkettigeren Alkenen stimmt mit den theoretischen Erwartungen von Kabalnov [54] überein. Die Studie variiert das Verhältnis von Emulgator zu dispersen Phase nicht, anders als die hier gezeigten Ergebnisse und vernachlässigt auch die Kinetik des Emulgators. Hoffmann *et al.* folgern weiterhin, dass die Bedeckung der Grenzfläche mit Emulgator einen Einfluss auf Diffusion durch diese hat, wie in den oben dargestellten Daten vorgefunden. Der Einfluss der Art und Konzentration des Emulgators auf die Ostwaldreifung ist deutlich durch Weiss [116] gezeigt und eine Verbindung der morphologischen Struktur des Emulgators und der organischen Phase wird hergestellt. Die Rolle der inversen Mizellen im Transport wird erwähnt, jedoch nicht weiter untersucht. Die Formation von DPPC Multischichten zur Stabilisierung von OW Emulsionen wurde ebenso untersucht, mit der Schlussfolgerung, dass weitere Untersuchungen zur Rolle von Mizellen und Liposomen in diesen Emulsionen nötig sind [117,118].

4.1.2 Fazit zu der Emulsionsstabilität mit DPPC

Es ist bekannt, dass WO Emulsionen mit Phospholipiden nur sehr schwierig zu stabilisieren sind und insbesondere bei hohen Dispersphasenanteilen, ohne Verwendung weiterer Additive oder Eindicker [119–121], zu Instabilität neigen. Bei geringen Dispersphasenanteilen sind sie jedoch für einige Minuten bis Stunden stabil. Die gezeigten Ergebnisse erlauben Rückschlüsse auf die prinzipiellen Instabilitätsmechanismen zu ziehen und zeigen neuartige Anwendungen von Phospholipiden zur Stabilisierung von WO Emulsionen. Werden Phospholipide vor der Emulgierung in der organischen Phase in Lösung gebracht, haben die Löslichkeit und Konformation in der organischen Phase starke Auswirkungen auf die zu erzeugenden Strukturen. Durch die langsame Adsorptionskinetik von Phospholipiden an die zu belegenden Grenzflächen, wurde eine Ultraschall-emulgierung in drei Schritten zur mechanischen Dispergierung des Wassers in der organischen Phase durchgeführt. Diese wiederholte Behandlung brachte wichtige Eigenschaften in der Entwicklung der Tropfengröße, Polydispersität, Signalintensität (DCR) und halbmaximalen Größenverteilungsbreiten zum Vorschein. Es wurden Beweise erbracht, dass der Emulgator DPPC in einer anfänglichen Periode von 10 min von

Koaleszenz bestimmt wird, gefolgt von einem abrupten Sinken der Größenverteilungsbreite mit Ostwaldreifung als dominantem Instabilitätsmechanismus. Diese zweite Periode, mit einer Hydratation der inversen Phospholipidmizellen durch Wasserdiffusion, bestimmt letztendlich die Langzeiteigenschaften der Emulsion.

WO Nanoemulsionen mit Phospholipiden im Bereich sehr kleiner Tropfengrößenverteilungen sind besonders für die Anwendung in der hier behandelten Herstellung von Liposomen interessant. Diese kleinen Tropfen können nur mit Konzentrationen unterhalb der CAC und einer wiederholten Ultraschallbehandlung erreicht werden, resultierend in vorläufig stabilen Emulsionen von < 500 nm nach dem dritten Emulgierschritt. Die erzeugten Tropfen sind von einer monomolekularen Phospholipidschicht bedeckt und weisen eine niedrige Polydispersität auf. Jedoch führen die inversen Mizellen durch Adsorption von Wasser zu einer schnell schwindenden Anzahl an dispersen Tropfen, was sogar in einer scheinbaren kompletten Auflösung der Tropfen nach mehreren Stunden resultieren kann. Sofern Tropfengrößen > 1 μm akzeptabel im Sinne der Anwendung sind, können stabilere Emulsionen mit Konzentrationen $c > \text{CAC}$ erzeugt werden. So hergestellte WO Emulsionen sind durch eine dichte Monoschicht [95,122], mit angelagerten inversen Mizellen und Lipidaggregaten, stabilisiert und können durch wiederholte Ultraschallbehandlung eine geringere Polydispersität erhalten. Die Diffusion von Molekülen aus den Wassertropfen zu den inversen Mizellen ist im Vergleich zu Emulsionen mit niedrigerer Phospholipidkonzentration stark gehemmt.

DPPC hat sich für die Herstellung von Nanoemulsionen als wesentlich besser geeignet herausgestellt als POPC. Daten zu POPC wurden in der Veröffentlichung [123] ebenso behandelt, haben jedoch eine andere Adsorptionskinetik und zeigen daher die gezeigten Effekte nicht in gleicher Deutlichkeit wie DPPC. POPC verhält sich dennoch analog dem entwickelten morphologischen Modell entsprechend.

4.2 Bestimmung von Tropfengrößenverteilungen mit NMR

4.2.1 Vergleich des etablierten Modells mit der Regularisierung

Klassische Messungen der Tropfengrößenverteilung mit NMR nach Murday und Cotts [61] sind meist mit der Annahme einer Log-Normalverteilung nach Packer und Rees [62] gekoppelt. Diese Verteilungsfunktion ist nicht immer hinreichend für Emulsionen, da die Tropfengrößenverteilung stark von den Produktionsparametern und der Formulierung abhängen können. Um die Eignung für typische Emulsionen zu untersuchen, wurden mono- und bimodale Emulsionen gemessen und die Ergebnisse aus der Regularisierung und Log-Normalverteilung verglichen.

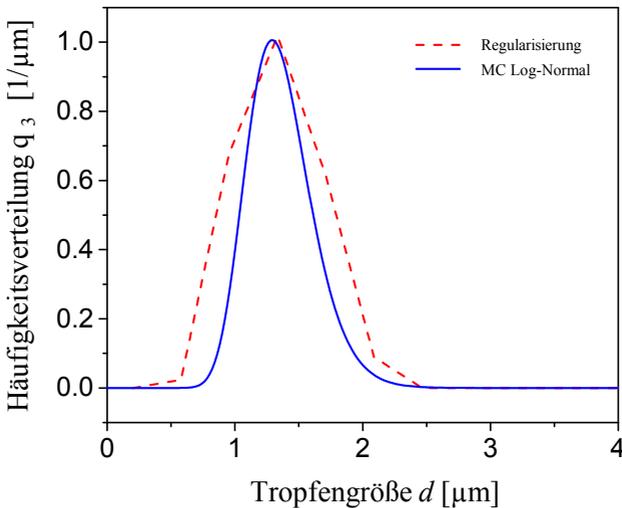


Abbildung 4.8: Tropfengrößenverteilung einer Wasser in Öl Emulsion, dargestellt in einer Häufigkeitsverteilung q_3 über dem Partikeldurchmesser d . Die Log-Normal-Verteilung nach Murday-Cotts und die Regularisierung liefern übereinstimmende Ergebnisse.

Im ersten Schritt wurde eine monomodale Emulsion mit einer Tropfengrößenverteilung im Bereich von mehreren Mikrometern produziert, wie im Methodenteil erläutert, und der Signalzerfall mittels NMR Diffusometrie bestimmt. Beide Ansätze, die etablierte Methode und die Regularisierung, beschrieben erfolgreich den Signalzerfall in sehr ähnlichen Tropfengrößenverteilungen, die in Abbildung 4.8

dargestellt sind. Die Messung ergab eine mittlere Größe von 1 bis $1,5\mu\text{m}$ und eine monodisperse Verteilung, die für die numerische Methode etwas breiter ausfällt. Die Randbedingung der Log-Normalverteilung führt zu einer glatteren Kurve, wegen des analytischen Charakters, während die Regularisierung in diskreten Intervallen arbeitet, was in der Verteilung sichtbar wird. Im Falle einer unregelmäßigen Verteilung ist diese Variabilität des numerischen Verfahrens von großem Vorteil. Für die präsentierte Lebensmittelemulsion mit einer gleichmäßigen Tropfengrößenverteilung zeigt sich kein Vorteil in einer der beiden Methoden. Beide können verwendet werden und insbesondere im Hinblick auf die Fehlerresiduen der mathematischen Anpassung auf ihre Validität geprüft werden. Auch hier sind keine Unterschiede zu finden, die Residuen sind in beiden Fällen vernachlässigbar klein. Um die Methoden weiter zu prüfen, wurden anspruchsvollere Verteilungen analysiert.

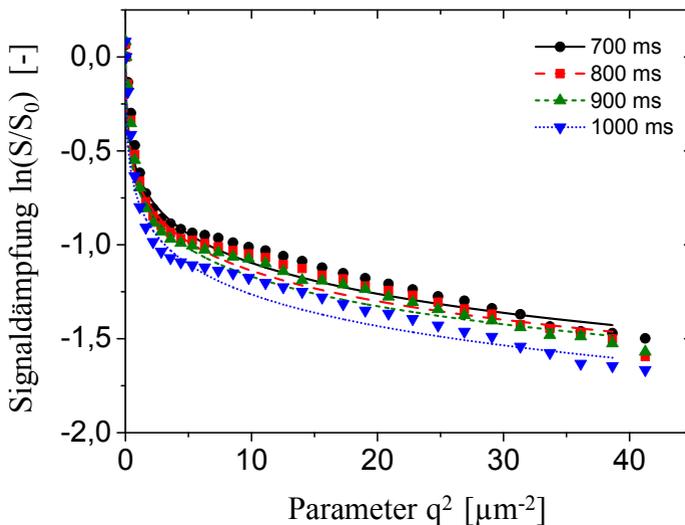


Abbildung 4.9: Signalzerfall einer bimodalen Emulsion für die Diffusionszeiten von 700, 800, 900 und 1000 ms, ausgewertet mit einer monomodalen Log-Normalverteilung nach Murday und Cotts. Die Messwerte können nicht hinreichend mit dem Modell approximiert werden.

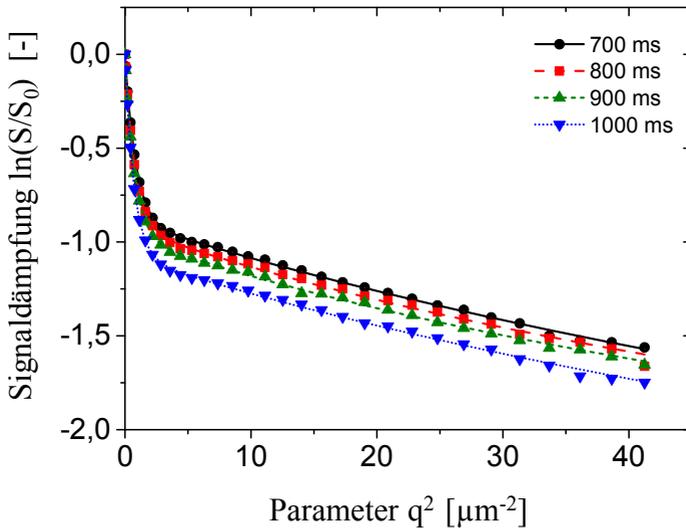


Abbildung 4.10: Signalzerfall einer bimodalen Emulsion für die Diffusionszeiten 700, 800, 900 und 1000 ms, ausgewertet mit einer bimodalen Log-Normal-Verteilung nach Murday und Cotts. Deutlich geringere Residuen zeigen eine gute Approximation der Messdaten.

NMR wird regelmäßig dafür kritisiert, dass multimodale Verteilungen nicht dargestellt werden könnten. Die ist jedoch prinzipiell eine Frage der implementierten Software und nicht von physikalischen Restriktionen. Eine bimodale Emulsion, nach Bernewitz et al. [105], wurde analysiert. Der logarithmische Signalzerfall $\log(S/S_0)$ über $q^2 = \gamma^2 \cdot g^2 \cdot \delta^2$ dieser bimodalen Emulsion wurde mit einem a) regulärem Exponentialansatz mit einer Komponente in Abbildung 4.9 und b) zwei Komponenten Exponentialanpassung nach Murday und Cotts in Abbildung 4.10 mit entsprechender monomodaler und bimodaler Verteilung dargestellt. Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, kann der Signalzerfall mit dem monomodalen Ansatz nicht ausreichend beschrieben werden und führt zu großen Residuen mit offensichtlichen Abweichungen des Modells von den Messdaten. Eine Tropfengrößenverteilung kann daraus zwar berechnet werden, wird aber aufgrund der falschen Anpassung inkorrekt sein. Eine solche Tropfengrößenverteilung kann auch als Falschinterpretation der Messdaten bezeichnet werden. Das bimodale Modell in Abbildung 4.10 beschreibt den Signalzerfall sehr gut mit kleinen Residuen. Die Wahl einer bimodalen Log-Normalverteilung kann daher als gute Approximation

gewertet werden und führt zu der bimodalen Verteilung in Abbildung 4.11. Die Verwendung der Regularisierung für den gleichen Datensatz führt ebenfalls zu einer guten Anpassung und zeigt die Verteilung in Abbildung 4.12. Vergleicht man die beiden Verteilungen, zeigen beide erfolgreich die Bimodalität, allerdings mit leichten Unterschieden in der Häufigkeit der größeren Fraktion. Bei beiden Methoden muss die Qualität der Anpassung beachtet werden. Während die Log-Normalverteilung dazu neigt die Verteilung zu unterschätzen und ein vereinfachtes Modell mit Annahmen verwendet, kann die Regularisierung die Daten aufgrund des numerischen Charakters überinterpretieren. Wird der Algorithmus mit zu vielen Iterationen durchgeführt, so wird Signalrauschen in die Anpassung miteinbezogen und als polydisperse Verteilung dargestellt.

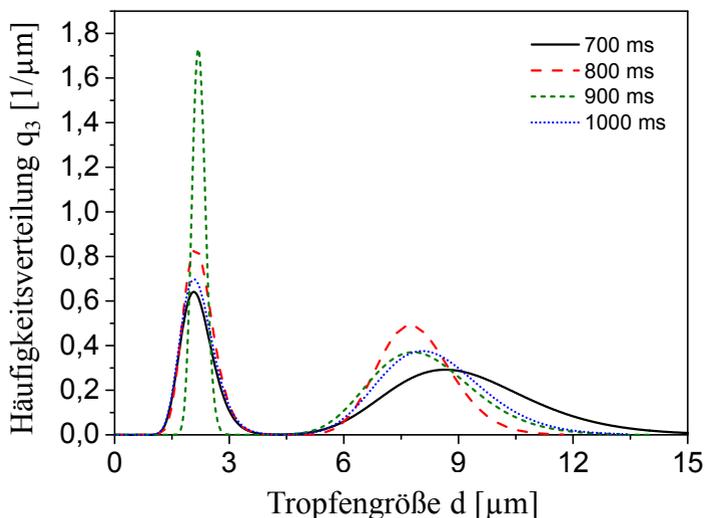


Abbildung 4.11: Tropfengrößenverteilung, berechnet aus dem Signalzerfall in Abbildung 4.10. Die bimodale Log-Normalverteilung führt zu einer Tropfengrößenverteilungen mit zwei Fraktionen um 2,5 μm und 7,5 μm .

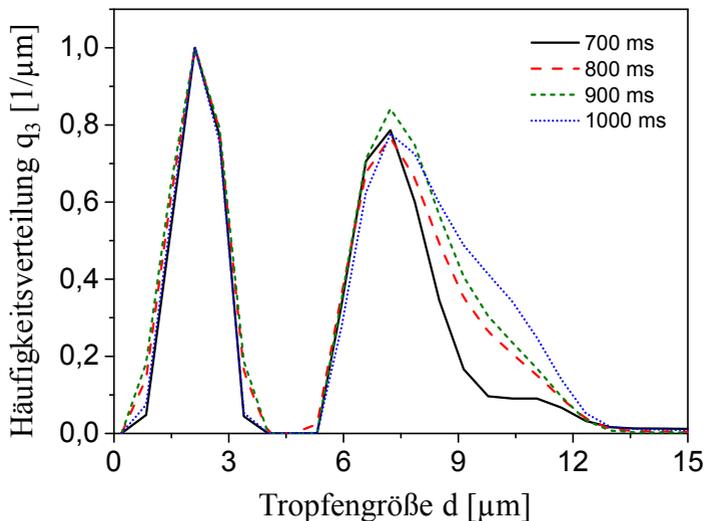


Abbildung 4.12: Tropfengrößenverteilung, berechnet aus dem Signalzerfall in Abbildung 4.10. Die Regularisierung führt zu ähnlichen Tropfengrößenverteilungen wie die bimodale Log-Normalverteilung mit zwei Fraktionen um $2,5\mu\text{m}$ und $7,5\mu\text{m}$.

4.2.2 Interpretation von Nanoemulsionen mit PFG-NMR

Mit Squalen in Wasser und E80 als Emulgator wurde eine stabile WO Nanoemulsion mit enger Tropfengrößenverteilung hergestellt. Die Tropfengrößenverteilung wurde mit DLS in hoher Verdünnung bestimmt und zeigte einen volumengewichteten Mittelwert von 300nm . In Abbildung 4.13 zeigt der Signalzerfall S/S_0 dieser Emulsion eine starke Abhängigkeit von der Diffusionszeit Δ , was zu erwarten ist, wenn die Stejskal-Tanner Gleichung betrachtet wird [124]. Für die Emulsionen kann der relative Signalzerfall durch eine Kombination von einer Verteilungsfunktion $P(r)$ des Radius r beschrieben werden, die im Falle von Murday und Cotts dem Zerfall in einer limitierenden Tropfengeometrie entspricht. Dabei entsprechen $r_{50,3}$ und σ dem volumengewichteten mittleren Radius und der Verteilungsbreite, sodass sich das Signaldämpfung E mit der folgenden Formel ergibt

$$\frac{S(\delta, \Delta, g, D, r_{50,3}, \sigma)}{S_0(\delta, \Delta, g, D, r_{50,3}, \sigma)} = \frac{\int_0^{\infty} r^3 \cdot P(r) \cdot E(\delta, g, \Delta, D, r) dr}{\int_0^{\infty} r^3 P(r) dr} \quad (4-3)$$

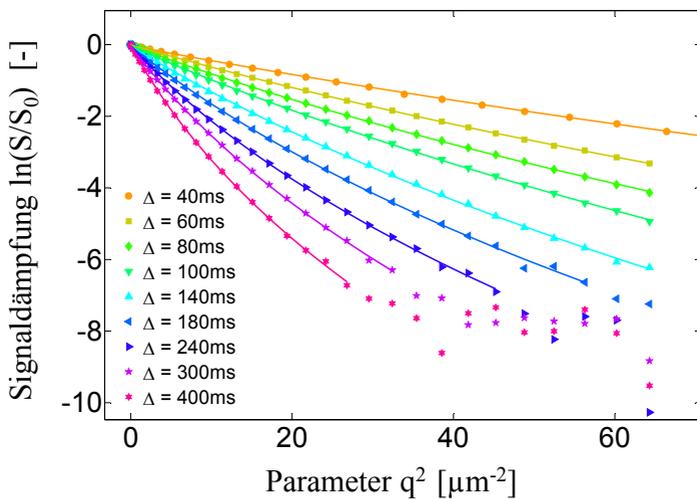


Abbildung 4.13: PFG-STE Signalzerfall als Funktion der Diffusionszeit Δ einer WO Nanoemulsion mit ca. 300nm Tropfendurchmesser.

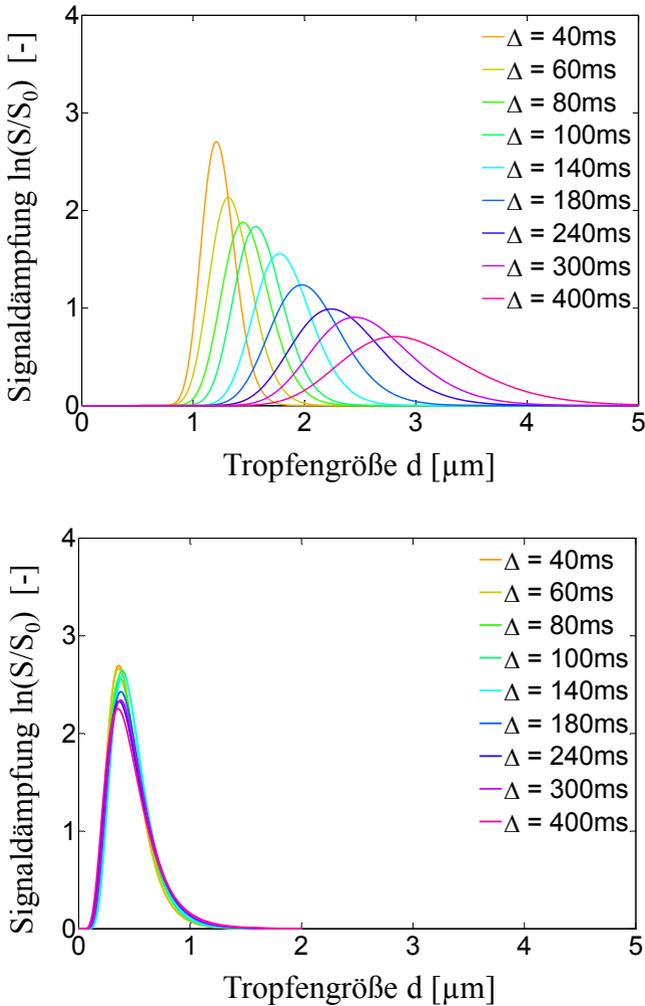


Abbildung 4.14: Log-Normal Tropfengrößenverteilungen berechnet aus dem Signalzerfall in Abbildung 4.13 nach a) MurdayCotts, mit einer veränderlichen, Δ abhängigen Verteilung und b) nach dem Stokes-Einstein Modell mit einer konsistenten Verteilung.

Das Modell nach Murday und Cotts selbst ist ebenfalls abhängig von Δ . Misst man die Signaldämpfung als Funktion von der Diffusionszeit Δ , so kann man

intrinsisch die Messdaten validieren, da die resultierende Tropfengrößenverteilung für den Fall einfacher Emulsionen unabhängig von Δ sein muss. Zusätzlich können so Messfehler entdeckt werden. Insbesondere ist damit ein gut bekanntes Problem, explizit der Einfluss möglicher Konvektion in der Probe durch Temperaturgradienten oder Inhomogenität, gemeint. Konvektiver Transport würde zum Signalzerfall im PFG Experiment beitragen, der das Ergebnis durch die verstärkte Diffusion verändert. Im Falle der Nanoemulsionen, trägt die thermische Bewegung der Tropfen zum Signalzerfall bei. Somit ergibt sich für Nanoemulsionen ein neuer Ansatz, mit der Signaldämpfung auf Basis der Stokes-Einstein Gleichung

$$E(\delta, g, \Delta, D, r) = \exp\left(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \cdot \frac{k_B T}{6\pi\eta r}\right). \quad (4-4)$$

Die Bewegung der Tropfen oder Moleküle aufgrund thermischer Energie wird durch die Stokes-Einstein Gleichung beschrieben. In Emulsionen wird sich die Bewegung insbesondere im Falle von Öl in Wasser auswirken, da sich die Mobilität proportional zu der reziproken Viskosität der kontinuierlichen Phase verhält, und Wasser mit einer sehr geringen Viskosität zu einer hohen Mobilität der Tropfen führt. Die kalkulierte Strecke der Tropfenbewegung eines 300nm Öltröpfen in Wasser liegt bei dem Vielfachen der Größe, somit überwiegt die Stokes-Einstein Bewegung die gemessene Molekülverschiebung im NMR Experiment. Die Gleichung könnte für hochkonzentrierte Emulsionen um weitere Terme zur Darstellung der Hinderung erweitert werden [125].

Die abweichenden Signalzerfälle in Abbildung 4.13 führen zu sehr weit gestreuten Tropfengrößenverteilungen, wenn sie mit dem Modell des geometrisch limitierten Tropfens nach Murday und Cotts interpretiert werden, siehe Abbildung 4.14 a). Dies kann missverstanden werden, da der Signalzerfall nicht alleine durch die Wände der Phasengrenze bestimmt wird, wenn der gesamte Tropfen sich in dem betrachteten Zeitrahmen bewegt. Wie zuvor beschrieben, zeigt die Molekülbewegung für lange Diffusionszeiten Δ eine mittlere Position im Zentrum des Tropfens auf. Korrekter kann die Dislokation mit der Stokes-Einstein Gleichung beschrieben werden, die ebenso mit einer Verteilungsfunktion kombiniert werden kann, wie zuvor für den Ansatz nach Murday und Cotts beschrieben. Abbildung 4.14 b) zeigt die resultierende Tropfengrößenverteilung eines Stokes-Einstein Fits mit einer Log-Normalverteilung für $P(r)$, mit einer guten Anpassung an die Messdaten und einer konsistenten, Δ -unabhängigen, Tropfengrößenverteilung. Die Tropfen-

größenverteilung für alle Diffusionszeiten Δ konvergiert bei einer mittleren Größe von 300nm, was der DLS Messung entspricht. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass für Tropfen unter $1\mu\text{m}$, bei denen die thermische Bewegung Hauptfaktor für die Dislokation ist, der Ansatz nach Stokes-Einstein absolut valide ist.

Es konnte zudem erfolgreich gezeigt werden, dass mono- und bimodale Emulsionen sowohl mit der log-normal Verteilung als auch der Regularisierung nach dem Ansatz von Murday und Cotts gemessen werden können. Beide Ansätze lieferten gleichwertige Ergebnisse, wenn die Anpassung an die experimentellen Daten ausreichend ist. Für sehr unregelmäßige oder komplett unbekannte Verteilungen ist die Regularisierung besser geeignet.

Kleine Emulsionen mit Tropfen unterhalb von $1\mu\text{m}$ werden durch die Tropfenbewegung nach Stokes-Einstein beeinflusst. Der Signalzerfall solcher Emulsionen ist so stark von der Diffusionszeit abhängig, dass das Modell zur gehinderten Diffusion in Tropfen nach Murday Cotts nicht hinreichend ist. Der Ansatz nach Stokes-Einstein mit einer Verteilungsfunktion hingegen lässt sich nutzen, um die gewonnenen Diffusionsverteilungen in Größenverteilungen umzurechnen. Um dieses Verfahren noch weiter zu verbessern, sollte im Falle höherer Konzentrationen die Stokes-Einstein Gleichung noch durch erweiterte Ansätze ergänzt werden. Diese adaptieren die Gleichung für eine mögliche Interaktion der Tropfen untereinander, während die Stokes-Einstein Gleichung auf der Annahme einzelner Tropfen beruht.

4.3 Transfer kolloidaler Feststoffpartikel

In Hinblick auf die beim Transfer von kolloiden Partikeln wirkenden Kräfte wurde ein Modellsystem hinzugezogen, um die Parameter für einen erfolgreichen Transfer zu identifizieren. Dabei wurde zunächst ein allgemeines Modell in einer Energiebilanz aufgestellt und im Folgenden mit Partikeln verschiedener Größen verifiziert. Im makroskopischen Bereich lassen sich die Modellpartikel mit dem bloßen Auge oder mithilfe optischer Methoden direkt verfolgen. Dies wurde genutzt, um das Modell anzupassen und zu validieren. Für die übergeordnete Fragestellung des Transfers von Emulsionstropfen wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf kolloidale Partikel übertragen und ebenso experimentell untersucht.

4.3.1 Modell für den Transfer von Feststoffpartikeln

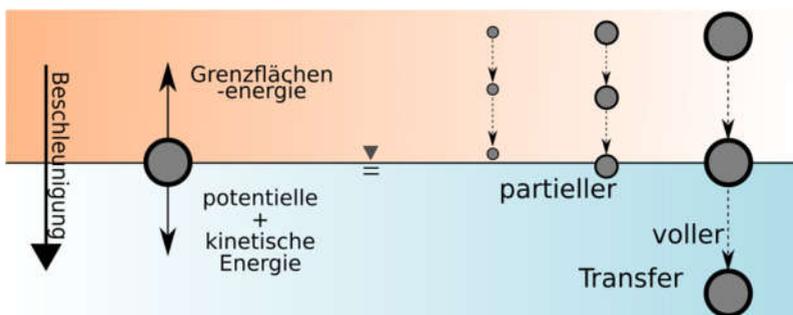


Abbildung 4.15: Skizze für den Transfer von Feststoffpartikeln aus einer leichteren Ölphase in eine wässrige Phase

Für die Abschätzung des Phasentransfers wurde ein einzelnes Partikel betrachtet. Die grundsätzlich wirkenden Kräfte sind die volumetrischen Kräfte der Erdanziehung und des Auftriebs, die im Falle der Zentrifugation durch die entsprechende relative Zentrifugalbeschleunigung multipliziert werden. Zusätzlich wirken Kräfte an der Oberfläche des Partikels: 1.) Reibung während der Sedimentation und 2.) eine Differenz in der Grenzflächenspannung durch das Wechseln der umgebenden Flüssigkeit. Insgesamt stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Energie die nötig ist, um die Grenzfläche zu ändern, sowie der Summe aus der kinetischen Energie der Partikelbewegung zur Grenzfläche und der Energie aus Zentrifugalkraft und Auftrieb beim Ortswechsel ein. Das Gleichgewicht aus Phasentransfer

(E_{PT}), kinetischer Energie (E_{kin}) und potentieller Arbeit, bestehend aus Masse und Auftrieb, kann daher wie folgt beschrieben werden

$$E_{PT} = E_{kin} + E_{pot} . \quad (4-5)$$

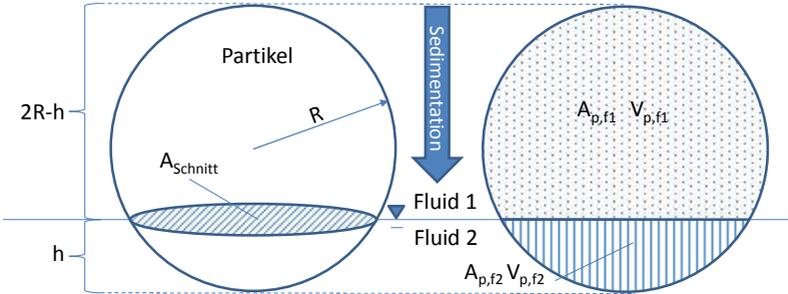


Abbildung 4.16: Skizze eine Partikels an der Phasengrenze zwischen Fluid 1 und 2, mit einem Durchmesser von $2R$ und einer Eintauchtiefe h in die zweite Flüssigphase. Für die Abschätzung des Transfers sind die Flächen $A_{schnitt}$ der flüssig-flüssig Phasengrenze, die durch den Partikel eingenommen wird, sowie die Oberflächen des Partikels $A_{p,f1}$ und $A_{p,f2}$ mit dem entsprechenden Fluid hervorgehoben.

Die Energie des Phasentransfers E_{PT} , die für einen erfolgreichen Transfer überwunden werden muss, kann mit der Benetzung des Partikels mit einem zweiten Fluid und subsequenter Änderung der Grenzflächenspannung beschrieben werden. Die Benetzbarkeit und Oberflächenenergie von Nanopartikeln an flüssig-flüssig Grenzflächen ist Gegenstand aktueller Forschung [94,126,127] und kann sehr komplex sein, wie im Theorieteil angesprochen. Hier wird eine valide Vereinfachung, die mit komplexeren Ansätzen in Übereinstimmung steht, für die Betrachtung der Größenabhängigkeit R^2 genutzt [98]. Die Grenzflächenspannung γ ist per Definition die Energie, die benötigt wird, um eine Kontaktfläche zu ändern. Im konkreten Beispiel in Abbildung 4.16 wird die Fläche $A_{p,f2}$ des Partikels zu Fluid 2 erhöht und im gleichen Maße die Fläche $A_{p,f1}$ reduziert. Weiterhin wird während des Durchtritts die Grenzfläche zwischen den Flüssigphasen $A_{schnitt}$ verändert und zeitweilig durch den Partikel eingenommen, bis ein vollständiger Transfer vollzogen wurde.

$$E_{PT}(h) = \int_0^{A_{p,f2}} (\gamma_{p,f2} - \gamma_{p,f1}) dA_{p,f} - \int_0^{A_{schnitt}} \gamma_{f1,f2} dA_{schnitt} . \quad (4-6)$$

$$E_{PT}(\mathbf{h}) = A_{p,f}(\mathbf{h}) \cdot (\gamma_{p,f2} - \gamma_{p,f1}) - A_{schnitt}(\mathbf{h}) \cdot \gamma_{f1,f2}, \quad (4-7)$$

mit der geometrischen Abhängigkeit $A_{p,f}(h) = 2\pi Rh$ und $A_{schnitt}(h) = 2\pi Rh - \pi h^2$, von dem Partikelradius R sowie der Eintauchtiefe h .

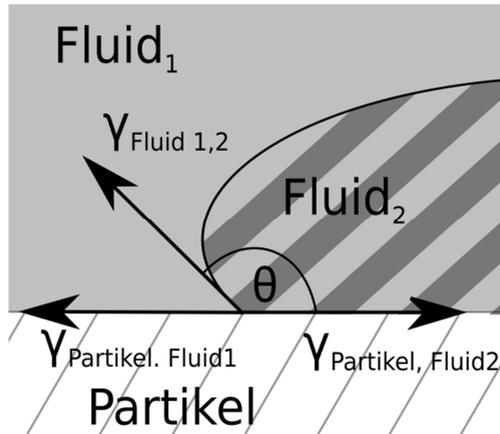


Abbildung 4.17: Die Young'sche Gleichung an einem Dreiphasensystem mit einer Partikelwand in einem flüssig-flüssig System. Die Affinität der zwei Lösemittel zum Partikel und umgekehrt kann durch den Kontaktwinkel θ und der Grenzflächenenergie γ zwischen den Fluiden dargestellt werden.

Die Oberflächenspannung eines Feststoffpartikels zum umgebenden Fluid ist entscheidend für die Größe und das Vorzeichen von E_{PT} . Grenzflächenenergien von Feststoffen werden generell mit Kontaktwinkelmessungen bestimmt. Es ist herausfordernd die Grenzflächenenergie $\gamma_{p,f}$ des Partikels zum Fluid zu messen, sodass der Term $\gamma_{p,f2} - \gamma_{p,f1}$ schwierig zu handhaben ist [128]. Die Young Gleichung, die oft herangezogen wird, um das Beispiel der Meniskusbildung zu erklären, beschreibt das Gleichgewicht zwischen den Grenzflächenenergien in einem Dreiphasensystem und kann hier angepasst werden zu $\gamma_{p,f1} = \gamma_{p,f2} + \cos(\theta) \cdot \gamma_{f1,f2}$ mit dem Kontaktwinkel θ . Der Vorteil der Substitution ist, dass $\gamma_{f1,f2}$ mit der bereits genutzten und zuverlässigen flüssig-flüssig Tensiometrie bestimmt werden kann [45], sodass nur der Kontaktwinkel als Variable bestehen bleibt. Die Substitution der Gleichung (4-3) mit der Young Gleichung und den Flächen einer Kugel führt zu

$$E_{PT}(h) = \gamma_{f1,f2} \cdot [\pi h^2 - 2\pi R h - 2\pi R h \cdot \cos(\theta)]. \quad (4-8)$$

Diese beschreibt die Energie, die aufgebracht werden muss, um den Partikel in die zweite Flüssigphase um die Strecke h einzutauchen. Im Falle eines kompletten Transfers ist die Strecke gleich dem Durchmesser zu setzen ($h = 2R$) und die Fläche A_{schnitt} wird auf null reduziert, wodurch sich folgende Gleichung ergibt

$$E_{PT}(2R) = f(R^2) = -\cos(\theta) \cdot 4\pi R^2 \cdot \gamma_{f1,f2}. \quad (4-9)$$

Diese Gleichung ist stark von dem Kontaktwinkel θ abhängig, was auch die relative Affinität der zwei Fluide zum Partikelmaterial widerspiegelt. Eine gute Benetzbarkeit liegt per Definition bei einem Kontaktwinkel unter 90° vor. Demnach wird das Fluid 2 einfacher zum Partikel gezogen, als Fluid 1. Dies ist der Standard für einen Transfer, welcher keinen weiteren Energieeintrag benötigt, da der Cosinus dann zwischen 0 und 1 liegt und E_{PT} damit negativ wird. Das Partikel erreicht durch den Transfer einen stabileren Energielevel und der Transfer findet „spontan“ oder exergonisch in einer flüssig-flüssig Extraktion statt, wenn ein Partikel die Grenzfläche erreicht. Der gegensätzliche Fall wäre ein Kontaktwinkel zwischen 90 und 180° , was zu einem positiven Wert für E_{PT} führt und zeigt, dass der Transfer einen Energieeintrag benötigt. Dieser Eintrag kann in Form einer gerichteten Kraft durch Zentrifugation erzeugt werden.

Die Oberflächeneigenschaften von Silikapartikeln, die hier als Modellsystem genutzt wurden, sind stark von der Größe und chemischen Zusammensetzung abhängig. Partikel mit exakt den gleichen Oberflächeneigenschaften wären ideal, um den Einfluss der Größe unmittelbar darzustellen. Es ist jedoch zu beachten, dass a) die Grenzflächeneigenschaften selbst sich mit der Größe ändern und b) der Produktionsweg von Silika sehr unterschiedlich sein kann, was ebenso die Grenzflächeneigenschaften beeinflusst. Punkt a) basiert hauptsächlich auf der Tatsache, dass in kleinerem Maßstab die Porosität und Rauigkeit auf der Oberfläche stärkere Auswirkungen für kleine Partikel haben, da die Geometrie und Krümmung den Kontaktwinkel beeinflusst. Punkt b) ergibt sich aus der chemischen Komposition bzw. kristallinen Struktur des hier verwendeten Modellsystems Silika, welche durch das Herstellungsverfahren des Materials beeinflusst wird. Pyrogenes oder

präzipitiertes Silika haben weitgehend verschiedene Kristallstrukturen, die sich auch in einer veränderten Oberflächenladung bemerkbar machen.

Es ist möglich, die Grenzflächenspannung $\gamma_{f1,f2}$ und den Kontaktwinkel θ mit Tensiden zu beeinflussen. Ein Tensid ist üblicherweise in einem Medium löslich, Öl oder Wasser, und ändert dessen Verhalten deutlich [129]. Wenn das Tensid im Extrakt (der aufnehmenden Phase) vorliegt, also hier Wasser oder Fluid 2, kann es E_{pT} reduzieren und somit den Transfer begünstigen, während ein Tensid in der primären Phase ungünstig wirkt, da Partikel stabilisiert werden und E_{pT} folglich erhöht wird. Die Bandbreite möglicher Tenside ist sehr groß und wird in anderer Literatur diskutiert [24,121,130].

Gegenüberstehend zu der Energie E_{pT} der Grenzflächenkräfte wirken die kinetische Energie E_{kin} der bewegten Partikel an der Grenzfläche und die potentielle Energie E_{pot} der Positionsänderung durch die Grenze. Die kinetische Energie kann mit der Stokes-Sedimentation abgeschätzt werden

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{1}{2} \cdot V_p \cdot \rho_p \cdot v_s^2. \quad (4-10)$$

Zusammen mit der Annahme der Stokes'schen Sinkgeschwindigkeit $v_{stokes} = \frac{2 \cdot R^2 (\rho_p - \rho_{f1})}{9\eta} \cdot a$ und dem Partikelvolumen $V_p = \frac{4}{3} \pi R^3$ ergibt sich

$$E_{kin} = f(R^7, a^2) = \frac{2}{3} \cdot a^2 \cdot \rho_p \cdot \pi R^3 \left(\frac{2 \cdot R^2 (\rho_p - \rho_{f1})}{9\eta} \right)^2. \quad (4-11)$$

Die kinetische Energie erreicht für Nanopartikel sehr kleine absolute Werte. Deutlich wird in der Gleichung, wie der Partikelradius R mit einer Potenz von 7 und die Beschleunigung a in quadratischer Form eingehen. Beide Faktoren weisen darauf hin, dass die kinetische Energie besonders bei hohen Beschleunigungen und großen Partikeln starke Auswirkungen hat.

Zusätzlich zu der kinetischen Energie gibt es volumetrische Kräfte, die besonders während der Zentrifugation relevant werden. Um die Änderung in potentieller Energie für den Transfer abzuschätzen, wird die Arbeit beachtet, die nötig ist, um den Partikel um die Strecke h in das Fluid 2 zu bewegen. Es muss dabei beachtet werden, dass sich während des Transfers der Auftrieb ändert, da sich der volumet-

rische Anteil des Partikels in dem entsprechenden Fluid ändert. Die Energie aus dem Volumen ergibt sich damit aus

$$E_{pot}(\mathbf{h}) = \int_0^h \mathbf{F}_{masse} - \mathbf{F}_{auftrieb}(\mathbf{h}) \, d\mathbf{h}. \quad (4-12)$$

$$\text{Mit } \mathbf{F}_{masse} = V_p \cdot \rho_p \cdot \mathbf{a} \quad (4-13)$$

$$\text{und } \mathbf{F}_{auftrieb}(\mathbf{h}) = [V_{p,f2}(\mathbf{h}) \cdot \rho_{f2} + V_{p,f1}(\mathbf{h}) \cdot \rho_{f1}] \cdot \mathbf{a}. \quad (4-14)$$

Mit dem Volumen der Kugelsektion $V_{p,f2} = \frac{1}{3}\pi h^2 \cdot (3R - h)$, ergibt sich

$$\mathbf{F}_{auftrieb}(\mathbf{h}) = \left[\frac{1}{3}\pi h^2 \cdot (3R - h) \cdot \rho_{f2} + \left(\frac{4}{3}\pi R^3 - \frac{1}{3}\pi h^2 \cdot (3R - h) \right) \cdot \rho_{f1} \right] \cdot \mathbf{a}. \quad (4-15)$$

Die Integration von Gleichung (4-12) mit den substituierten Termen führt zu

$$E_{pot}(\mathbf{h}) = f(R^3, \mathbf{a}) = \frac{4}{3}\pi R^3 \cdot \rho_p \cdot \mathbf{a} - \left[\frac{1}{12}\pi(4R^3 - h^4) \cdot \rho_{f2} + \frac{1}{12}\pi(4R^3 - (2R - h)^4) \cdot \rho_{f1} \right] \cdot \mathbf{a}. \quad (4-16)$$

Entsprechend ergibt sich für einen kompletten Transfer bei $h=2R$ eine potentielle Arbeit von

$$E_{pot}(2R) = f(R^3, \mathbf{a}) = V_p \cdot \rho_p \cdot \mathbf{a} - \left[\frac{1}{3}\pi(R^3 - 4R^4) \cdot \rho_{f2} + \frac{1}{3}\pi R^3 \cdot \rho_{f1} \right] \cdot \mathbf{a}. \quad (4-17)$$

Kombiniert man diese Terme in Gleichung (4-5) ergibt sich ein umfassender Term für den Transfer, basierend auf den Parametern des Partikelradius R , Dichte ρ , Beschleunigung a , Grenzflächenspannung γ mit dem Kontaktwinkel θ und der Eintauchtiefe h in das zweite Fluid. Es gibt mehrere angemessene Wege diesen Zusammenhang zu validieren oder zu nutzen. Für große Partikel kann die Eintauchtiefe h mit einer Kamera beobachtet werden, was genutzt wurde, um das

Modell zu validieren und die eingehenden Parameter für Grenzflächenspannungen und Kontaktwinkel zu prüfen. Für kleinere kolloidale Partikel kann die Eintauchtiefe nicht gemessen werden, jedoch kann der Erfolg eines Transfers als Anhaltspunkt genutzt werden. Ein kompletter Transfer mit $h=2R$ führt zu einem Sediment am Boden der Proben, was experimentell mit variierender Beschleunigung und Partikelgröße getestet werden kann.

4.3.2 Experimente zum Transfer von Feststoffen unter Verwendung des Modells

Der Transfer ist grundlegend von der Partikelgröße abhängig, insbesondere wenn Maßstäbe zwischen kolloidalen und makroskopischen Dimensionen betrachtet werden. Ein theoretischer Ansatz zur Abschätzung der involvierten Kräfte und deren Zusammenhang zur Partikelgröße wurde im vorhergehenden Abschnitt dargestellt. Es wurde ausführlich hergeleitet, dass während des Durchtritts zwischen zwei Medien Grenzflächenkräfte (Differenz in der Benetzbarkeit) und volumetrische Kräfte (Masse im Erdschwere- oder Zentrifugalfeld, Auftrieb, kinetische Energie) auf den Partikel wirken. Die Grenzflächenkräfte dominieren in kleineren Dimensionen und erschweren den Phasentransfer, während die volumetrischen Kräfte bei größeren Partikeln entscheidend sind und einen einfacheren Transfer ermöglichen. Die Zentrifugation kann genutzt werden, um die volumetrischen Kräfte zu erhöhen und auch kleinere Partikel in die zweite Phase zu bringen, unabhängig von den Grenzflächenkräften. Verschiedene Größen an SiO_2 Partikeln wurden dazu, mittels einer variierenden Zentrifugalbeschleunigung, von Öl in die wässrige Phase übertragen. SiO_2 Kugeln im Millimeterbereich wurden mit einem Kamerasystem beobachtet und zeigten Eintauchtiefen, die den Ergebnissen des Modells entsprachen. Partikel im kleineren Maßstab eines kolloidalen Systems von Nano- bis Mikrometer zeigten eine deutliche Akkumulation an der Grenzfläche und durchtraten diese als Agglomerate, wenn die Zentrifugalbeschleunigung unzureichend war, um Einzelpartikel zu transferieren (siehe Anhang 3). Daher beeinflussen Partikelkonzentration und die folgende Akkumulation an der Grenzfläche ebenso den Transfer. Die Nutzung von Tensiden kann sich positiv auf den Transfer auswirken, ist jedoch wiederum stark abhängig von der Art des Tensids in Lösung.

4.3.3 Ablagerung und Transfer von makroskopischen Partikeln

Der Modellansatz erlaubt die Berechnung der Eintauchtiefe h einzelner Partikel. Die Validierung des Modells wurde mit SiO_2 Kugeln im Millimeterbereich, mit Größen von 0,8 bis 2,2 mm, durchgeführt. Bei dieser Größe wurde beobachtet, dass die Kugeln bei gegebener Dichte des Materials und einer Beschleunigung von normaler Erdschwere $a=g=9,81\text{m/s}^2$ teilweise oder komplett in die zweite Phase eintauchen. Die Kugeln werden in der oberen Phase platziert und sinken dann bis in die Grenzfläche ein. Die Größenskala im Millimeterbereich erlaubt die Messung der Eintauchtiefe mit der Kamera.

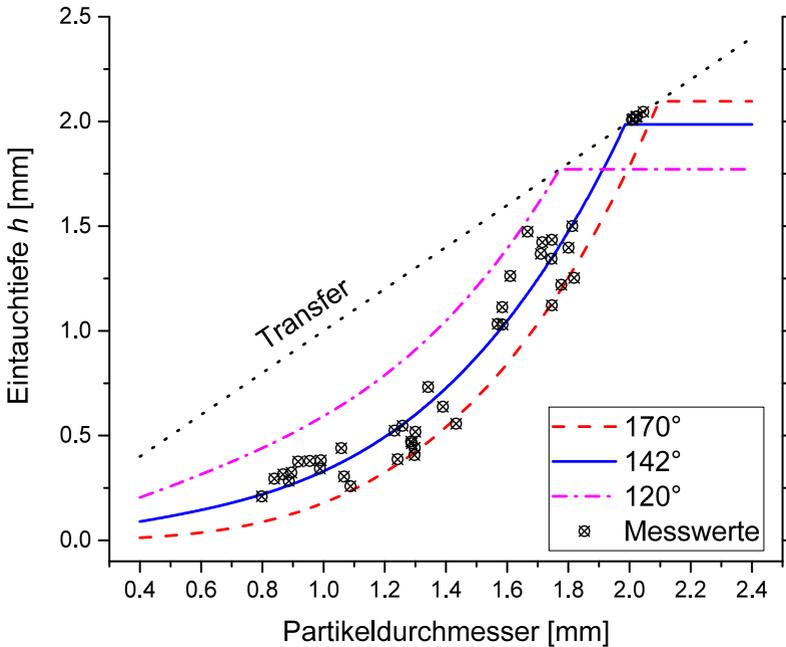


Abbildung 4.18: Eintauchtiefe h der SiO_2 Kugeln mit dem Durchmesser $2R$ bei einer Beschleunigung von $a=g=9.81\text{m/s}^2$ und einer Dichte $\rho = 2.5\text{ g/cm}^3$. Die gepunktete Winkelhalbierende zeigt einen kompletten Durchtritt der Partikel durch die Phasengrenze. Die gekreuzten Punkte stellen experimentell bestimmte Eintauchtiefen der Partikel dar. Die Linien entsprechen den erwarteten Ergebnissen nach dem Modell mit entsprechenden Kontaktwinkeln von 120° (Strich-Punkt), 142° (Voll) und 170° (Gestrichelt). Der Schnittpunkt der Winkelhalbierenden und der Modellergebnisse zeigen die kritische Partikelgröße für einen kompletten Transfer.

Abbildung 4.18 zeigt die gemessenen Eintauchtiefen h von SiO_2 Kugeln mit dem Durchmesser $2R$. Experimentelle Werte sind durch gekreuzte Kreise dargestellt, die Modellberechnung durch Linien, ergänzt durch die Ursprungsgerade, die einen vollen Durchtritt markiert. Die Berechnung basiert auf den Gleichungen aus dem vorhergehenden Abschnitt: $E_{PT}(h, R) = E_{kin}(R) + E_{pot}(h, R)$, mit der Abhängigkeit der Eintauchtiefe h und dem Kugelradius R , berechnet in einem iterativen Verfahren, schrittweise für jede Eintauchtiefe h . Zu Beginn des Durchtritts (siehe Abbildung 4.15) liegt die verfügbare Energie in Form von E_{kin} und E_{pot} über der benötigten Energie für den Transfer E_{PT} , die sich aus der Benetzung des Partikels ergibt. Mit fortschreitender Eintauchtiefe h , gibt es zwei mögliche Ergebnisse: a) $E_{PT} \geq E_{kin} + E_{pot}$, wenn die benötigte Energie für den Transfer größer wird als

die verfügbare, und der Partikel in der Phasengrenze stecken bleibt, oder b) die Eintauchtiefe h wird größer als der Partikeldurchmesser $2R$ und der Transfer findet komplett statt. Die maximale Eintauchtiefe wurde entsprechend eingezeichnet. Weitere Parameter in der Berechnung stellt die Beschleunigung bei Erdschwere $a = g = 9.81 \text{ m/s}^2$, die entsprechende Dichte von Silika, Öl und Wasser mit $\rho = 2,5, 0,85$ und $0,998 \text{ g/cm}^3$, sowie die Grenzflächenspannung von Squalenöl zu Wasser mit $\gamma = 47 \text{ mN/m}$ dar. Die experimentellen Daten zeigen eine zunehmende Eintauchtiefe mit zunehmender Größe der Partikel. Wenn die Eintauchtiefe den Durchmesser überschreitet, haben die Partikel die Phasengrenze durchdrungen und somit den Transfer komplett vollzogen und liegen entsprechend in der zweiten Phase vor. Dieser Grenzwert ist in der Abbildung 4.18 durch eine gestrichelte Ursprungsgerade mit Steigung von 1 eingezeichnet. Weiterhin sind drei Variationen des Kontaktwinkels für das Modell eingezeichnet mit 120° , 142° und 170° . Deutlich wird, dass der Transfer bei kleineren Kontaktwinkeln bereits für kleinere Kugeln möglich ist, die sonst von einer höheren Grenzflächenspannung zurückgehalten werden würden. Der Kontaktwinkel von 142° gibt die experimentellen Daten am besten wieder und entspricht ebenso separaten Kontaktwinkelmessungen.

Um den Kontaktwinkel θ zu messen, wurde in einem separaten Experiment ein Wassertropfen in Squalen auf einer Quarzglasplatte aufgebracht, wie im Methodenteil 3.3 dargestellt. Die gemessenen Kontaktwinkel sind relativ weit gestreut, da die Methode sehr anfällig für Fehler ist. Es gibt zwei Hauptfaktoren für eine fehlerhafte Auswertung: Erstens gibt es Limitierungen in der technischen Umsetzung, z.B. einem guten Kontrast für ein hinreichendes Bild und die Lokalisation des exakten Kontaktpunktes der drei Phasen, und zweitens gibt es Materialeigenschaften, wie die Rauigkeit der Oberflächen. Beide führen zu einer Variation der Tangente am Tropfen, die den Kontaktwinkel θ bestimmt. Die Ergebnisse liegen zwischen 130° und 160° , was in die Validierung des Modells in Abbildung 4.18 als Annahme eingeflossen ist. Weitere Details dieser Messung sind in Material und Methoden Teil 3.3 zu finden. Alle bestimmten Kontaktwinkel liegen weit über 90° , was bestätigt, dass die Affinität von Squalen zu SiO_2 höher ist als zu Wasser. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Partikel dazu neigen an der Grenzfläche zu verbleiben und nicht einfach durch die Affinität oder Extraktion übertreten. Die Messergebnisse schwanken zu stark, um direkt in das Modell eingebracht zu werden, jedoch sind sie konform mit den Messungen der Eintauchtiefe. Wenn das Modell an die Messdaten zum Eintauchen angepasst wird, indem der Kontaktwinkel variiert wird, so ergibt sich die kleinste Wurzel der mittleren

Fehlerquadrate bei einem Kontaktwinkel von 142° und einem Fehler von 0,119 mm. Dieser Kontaktwinkel wurde für alle weiteren Berechnungen genutzt.

Es ist anzumerken, dass die Oberflächeneigenschaften und resultierenden Grenzflächenspannungen und Kontaktwinkel von größeren Silikakugeln für kolloidales Silika abweichen könnte, da die chemische Zusammensetzung, Kristallstruktur und Größe selbst einen Einfluss haben können [131]. Trotzdem sind die tensio-metrischen Daten konform mit anderen aktuellen Literaturwerten [126] und passen zu den in Abbildung 4.18 gezeigten Messergebnissen. In den folgenden Paragraphen soll der Einfluss der Größe auf die Energie für den Transfer E_{PT} genauer betrachtet werden, was eine Funktion der Größe und des Materials sein kann.

4.3.4 Einfluss der Partikelgröße auf den Transfer

Die entscheidende Anwendung für das Modell ist der angestrebte Transfer von kolloidalen Partikeln im Bereich von Mikro- bis Nanometern. Die drei Komponenten aus Gleichung (4-5), E_{PT} , E_{kin} und E_{pot} sind stark von der Größe abhängig, wie auch in den Gleichungen (4-9), (4-11) und (4-16) der einzelnen Komponenten selbst sichtbar. Für einen erfolgreichen Transfer muss die Energie E_{PT} von der Summe aus E_{kin} und E_{pot} übertroffen werden. Abbildung 4.19 zeigt die Abhängigkeit der drei Komponenten von der Größe in einer doppellogarithmischen Auftragung, die die Steigungen verdeutlicht. E_{PT} wird durch die Oberfläche des Partikels, also einem quadratischen Beitrag des Radius, bestimmt und unterliegt somit einer Steigung von 2 in der logarithmischen Auftragung. Die Masse und der Auftrieb in E_{pot} werden durch das Volumen des Partikels festgelegt und haben daher eine Steigung von 3. Der letzte Faktor E_{kin} hat, durch den Beitrag des Volumens und der quadratischen Geschwindigkeit, die selbst wieder quadratisch vom Radius abhängt, eine gesamte Steigung von 7. Diese verschiedenen Steigungen sind in dem Einschub der Abbildung 4.19 für drei verschiedene Beschleunigungen $a = 1, 100$ und $10,000$ G mit je einer gestrichelten, einer gepunkteten und einer strich-punkt Linie gezeigt. E_{PT} ist unabhängig von der Beschleunigung und bleibt konstant. Die Summe von E_{kin} und E_{pot} führen zu der Darstellung in dem Hauptgraph der Abbildung 4.19 und zeigen einen deutlichen Knick in der Geraden, der den Übergang zwischen den Beiträgen der beiden Komponenten zeigt. Unterhalb dieser Anstiegsänderung trägt E_{pot} den größeren Anteil bei, während oberhalb E_{kin} die Summe der beiden Komponenten dominiert.

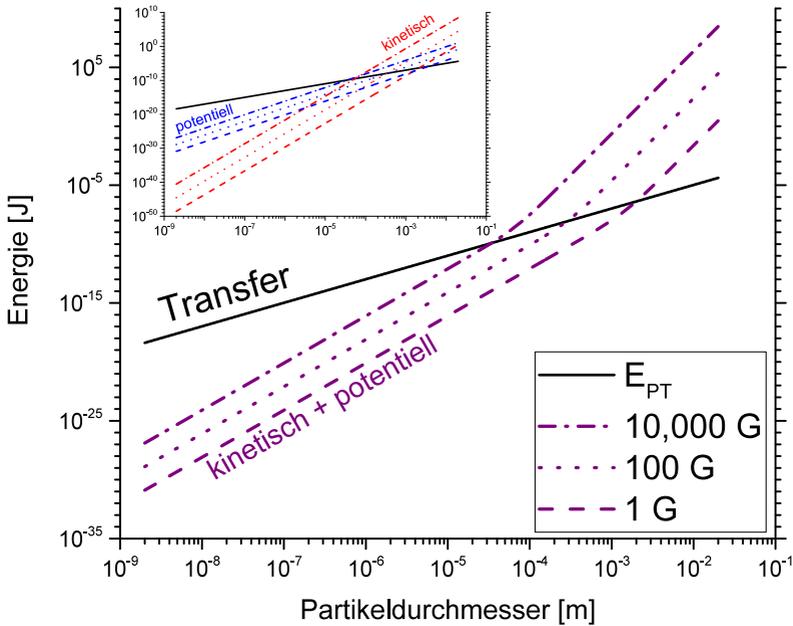


Abbildung 4.19: Energieanteile eines Silika-Einzelpartikels nach dem Modellansatz aus Gleichung (4-5) mit einer Dichte von $\rho = 2.5 \text{ g/cm}^3$, einem Kontaktwinkel von 142° und der Grenzflächenspannung von 42 mN/m . Die Energie E_{PT} (Voll) muss durch die Summe aus E_{kin} und E_{vol} übertroffen werden. Die letzteren beiden sind abhängig von der Zentrifugation, wie hier dargestellt für 1 G (Strich), 100 G (Punkt) und 10.000 G (Strich-Punkt). Der Schnittpunkt der Komponenten zeigt den kritischen Radius ab dem ein Transfer auftritt. Der Einschub verdeutlicht die Steigungen mit 7 für E_{kin} , 4 für E_{vol} und 2 für E_{PT} .

Um sehr kleine, kolloidale Partikel zu übertragen, gibt es zwei generelle Möglichkeiten: Eine Reduzierung der Energie E_{PT} durch eine Beeinflussung der Grenzflächenspannung mit Tensiden oder eine Erhöhung der verfügbaren Energie durch höhere Beschleunigungen in einer Zentrifuge. Wie durch den Schnittpunkt von E_{PT} und der entsprechenden Geraden der verfügbaren Energie in Abbildung 4.19 verdeutlicht wird, führt eine höhere Beschleunigung von 100 G den Grenzwert für einen kompletten Transfer zu einer Größe von $290 \mu\text{m}$. Die Beschleunigung von 10.000 G reicht aus, um $34 \mu\text{m}$ Partikel in die Ölphase zu bringen. Für SiO_2 Partikel im kolloidalen Bereich übertrifft die Energie des Transfers E_{PT} die verfügbare Energie um 5 bis 10 Ordnungen, da die Steigung in dieser Region von E_{pot} mit dem Exponenten von 3 bestimmt wird. Der Transfer von kolloidalem Silika kann

daher nicht ohne sehr große Beschleunigungen oder dem Einsatz von Tensiden erfolgen.

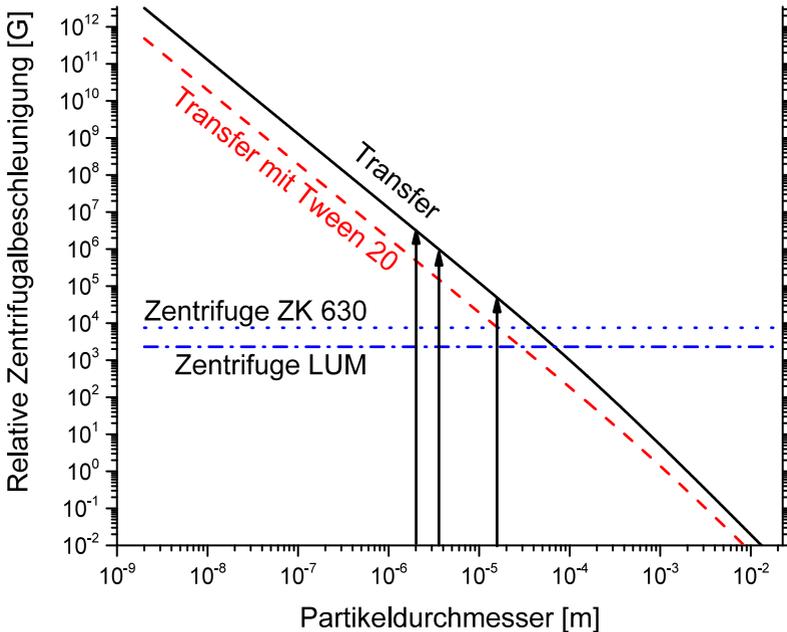


Abbildung 4.20: Die berechnete relative Zentrifugalbeschleunigung in G, die nötig ist um den kompletten Transfer eines SiO_2 Partikels mit einer spezifischen Größe von 42 mN/m zu Squalen zu realisieren (schwarze Linie). Die Grenzflächenspannung von Wasser zu Squalen und der Kontaktwinkel von 142° gelten aus den hervorgehenden Versuchen. Die rote gestrichelte Linie zeigt eine niedrigere Beschleunigung für Partikel mit einer Grenzflächenspannung von 10 mN/m und einem Kontaktwinkel von 120° , wie es bei der Nutzung von Tween 20 der Fall wäre. Die zwei Horizontalen zeigen die verfügbaren Zentrifugen: die ZK 630 Becherzentrifuge bei 8000 G (punkt) und analytischen Zentrifuge LUM mit 2300 G (strich-punkt). Die Pfeile symbolisieren die Partikelgrößenverteilung eines kolloidalen SiO_2 vom Typ "SF600" von links nach rechts mit dem $d_{3,10}$, $d_{3,50}$ und $d_{3,90}$, dass für weitere Experimente verwendet wurde

In der Folge stellt sich die Frage, welche Beschleunigungen nötig sind, um Partikel einer bestimmten Größe zu übertragen. Abbildung 4.20 zeigt die Abhängigkeit der relativen Zentrifugalbeschleunigung von der Partikelgröße in einer doppellogarithmischen Auftragung für die spezifischen Eigenschaften der SiO_2 Partikel. Der starke Trend zeigt die immensen Beschleunigungen, die nötig wären um kolloidale Partikel zu übertragen, wenn man von dem Modellansatz ausgehend

extrapoliert. Während Partikel im Millimeterbereich bei normaler Erdanziehung durchtreten, liegt die benötigte Beschleunigung für Partikel von $10\ \mu\text{m}$ bereits bei $100.000\ \text{G}$, was mit handelsüblichen Zentrifugen eine Herausforderung darstellt. Für Partikel unterhalb von $1\ \mu\text{m}$ sind Beschleunigungen oberhalb von $10^7\ \text{G}$ nötig, was außerhalb der Umsetzbarkeit für eine technische Anwendung mit einem akzeptablen und angebrachten Aufwand und Komplexität ist. Die Anwendung von Tensiden wäre ratsam, um die Grenzflächenspannung von Wasser zu Öl, als auch Wasser zu Silika zu senken, was durch ein wasserlösliches Tensid erreicht werden kann. Ein öllösliches Tensid würde nur zu einer besseren Suspension von SiO_2 in Öl führen, was nicht von Vorteil für den Transfer wäre. Tween 20 ist ein gebräuchliches und wasserlösliches Tensid, das die Grenzflächenspannung γ zwischen Wasser und Squalen auf $10\ \text{mN/m}$ und den Kontaktwinkel auf 120° senkt, wie im Methodenteil 3.3 dargestellt. Die gestrichelte Linie in Abbildung 4.20 zeigt den reduzierten Aufwand in der Beschleunigung bei diesen Parametern, wodurch kleine Partikel bei gleichem Aufwand übertragen werden können.

4.3.5 Transfer von kolloidalen Partikeln als Agglomerate

Experimente haben gezeigt, dass kleine Partikel mit Größenverteilungen nahe der kritischen Zentrifugalbeschleunigung dazu tendieren an der Grenzfläche zu akkumulieren und dann als Agglomerate überzutreten, wie in Versuchen mit der photometrischen Zentrifuge beobachtet. Einzelne Experimente zur Akkumulation des kolloidalen Silika sind im Anhang dargestellt. Zusammenfassend für diese Ergebnisse ist in Abbildung 4.21 für Silikapartikel mit einer Größenverteilung von $d_{3,10} = 1.06\ \mu\text{m}$, $d_{3,50} = 3.71\ \mu\text{m}$ und $d_{3,90} = 10.76\ \mu\text{m}$ dargestellt, die in der vorherigen Abbildung 4.20 mit Pfeilen markiert sind, um die zu erwartende benötigte Zentrifugalbeschleunigung abzuschätzen. Die zugehörigen kritischen Beschleunigungen liegen bei $50.000\ \text{G}$ für die Größten 10% des Kollektivs und $1.000.000\ \text{G}$ für 50% des volumenmetrischen Äquivalents, was entsprechend nur ein kleinerer Anteil an der gesamten Anzahl der Partikel ist. Die Experimente zeigen, dass diese Partikel schon bei wesentlich niedrigeren Beschleunigungen von $10.000\ \text{G}$ übertreten, was einem anderen Mechanismus zugeschrieben werden muss, da diese Partikel nicht einzeln, sondern als Agglomerate übergehen. Einzelne Partikel verfügten nicht über ausreichende Energie für den Durchtritt und verbleiben an der Grenzfläche, gefolgt von weiteren sedimentierenden Partikeln. Die maximale Größe der Agglomerate wird durch die Konzentration an Partikeln vorgegeben, wenn die verfügbare Grenzfläche zwischen den Flüssigphasen konstant bleibt. Abbildung 4.21 zeigt daher die kritische Zentrifugalbeschleunigung, bei der zuerst

ein Transfer stattfindet und dass diese für niedrige Konzentrationen größer ist. Bei diesen kleinen Konzentrationen können sich nur kleine Agglomerate formen, während höhere Konzentrationen in größeren Agglomeraten resultieren, die auch einfacher die Grenzfläche passieren und sich am Boden der Küvette sammeln. Um daraus wieder eine kolloidale Suspension herzustellen, wäre eine weitere Dispergierung notwendig. Dies ist natürlich unerwünscht, obwohl es weiterhin anderen etablierten Methoden, wie beispielsweise einer thermischen Trocknung der Suspension und Re-Dispergierung, vorzuziehen wäre. Der Vorteil eines direkten Phasentransfers liegt in der absoluten Vermeidung von Agglomeraten, was nur stattfinden kann, wenn einzelne Partikel über ausreichend Energie für den Transfer verfügen. Weiterhin sind die vorliegenden Agglomerate nicht genau definiert und von dem Transport der Partikel zu der Grenzfläche abhängig. Der gezeigte Mechanismus benötigt weitere Untersuchungen, insbesondere bezüglich der Agglomeratbildung und deren Eigenschaften.

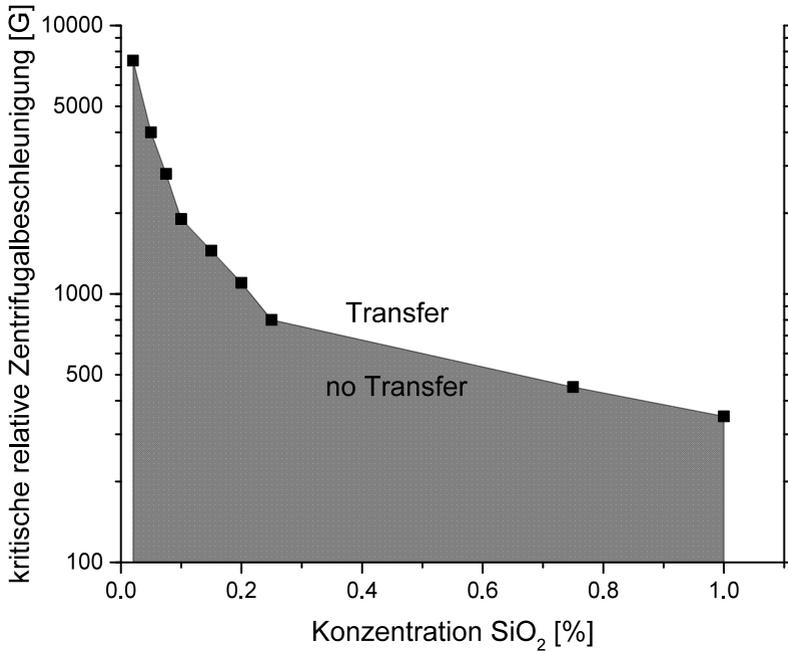


Abbildung 4.21: Experimentell bestimmte relative Zentrifugalbeschleunigung für einen erfolgreichen Transfer von kolloidalen SiO₂ Partikeln mit einer Größe von $d_{3,50} = 3,7 \mu\text{m}$ in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Messpunkte zeigen die geringste Beschleunigung für einen Transfer, während es darunter zu einer Akkumulation der Partikel an der Grenzfläche zwischen Wasser und Squalen kommt.

4.3.6 Schlussfolgerungen für den Transfer von Emulsionen

Zusammenfassend wurde erfolgreich ein Modell für den Transfer von Feststoffpartikeln zwischen zwei Phasen durch Zentrifugation aufgezeigt und experimentell geprüft. Die Betrachtung der verfügbaren und benötigten Energie eines Einzelpartikels eröffnet eine Möglichkeit festzustellen, ob ein System bei gegebenen Umständen den Transfer erlaubt, oder ob eine Anpassung, z.B. durch Änderung der Zentrifugalbeschleunigung oder durch Tenside, erforderlich ist. Der Transfer wäre dann, im Gegensatz zu einer klassischen flüssig-flüssig Extraktion, nicht durch die Affinität der Lösungen, sondern durch die eingebrachte mechanische

Energie getrieben. Mit sinkenden Größen eines kolloidalen Partikelsystems wird der Transfer schwieriger umzusetzen, da der Zusammenhang zu den Energieniveaus exponentielles Verhalten zeigt. Die benötigte Energie der Benetzung steigt mit einem Exponenten von 2, während die verfügbare Energie aus zwei Komponenten besteht, sodass entweder die kinetische (mit einem Exponenten von 7) oder die potentielle Energie (mit dem Exponenten von 4) dominiert. Daraus resultiert ein relativ enger Grenzwert in der Größe, für den ein Transfer erfolgreich mit Einzelpartikeln möglich ist. SiO₂ Partikel oberhalb dieser kritischen Größe zeigten experimentell ein Verhalten, dass dem vorgestellten Modell für den Transfer entspricht. Unterhalb des Grenzwertes neigen Partikel dazu, an der Grenzfläche zu akkumulieren und durchtreten diese nur als Agglomerate, wenn ausreichende Konzentrationen an kolloidalem Material vorhanden sind.

Eine industrielle Anwendung des Transfers von Einzelpartikeln muss der Herausforderung von sehr hohen Drehzahlen gerecht werden, was es ökonomisch sehr anspruchsvoll macht. Auf industrieller Ebene wären die Nutzung anderer Partikelmaterialien und der Einsatz von Tensiden sowie vorhergehende Agglomeration denkbar. Die Abhängigkeit des Transfers von der Größe sollte für Anwendungen, wie die Synthese und Lagerung von Metallnanopartikeln [76,83] oder dem Transfer von Emulsionstropfen [41], beachtet werden. Mit dem Wissen über einen möglichen Grenzwert kann der Prozess entsprechend angepasst oder verändert werden, um industriell sinnvoll eingesetzt zu werden.

Der Transfer von anderen Partikeln oder Materialien wird von den gleichen, hier ausführlich dargestellten, Restriktionen betroffen sein. Insbesondere der Transfer von Emulsionstropfen zur Herstellung von Liposomen ist schwer umzusetzen, da die Dichtedifferenzen zwischen dem Liposom und den kontinuierlichen Phasen sehr gering sein kann. Die beabsichtigte Größe für Liposomen im pharmazeutischen Anwendungsgebiet liegt im Bereich von Nanometern, was bereits für das dargestellte System von Silika nicht zugänglich war. Silikapartikel verfügen über eine wesentlich höhere Dichte und gute Stabilität als Dispersion, was in Konsequenz den Transfer von Liposomen schwieriger erscheinen lässt. Dem gegenüberzustellen ist, dass eine Benetzung oder Änderung der Grenzfläche für Liposomen tendenziell sehr einfach oder zumindest gering sein kann und sich damit die benötigte Energie für den Transfer grundlegend anders verhalten kann. Weiterhin können die Tropfen der Emulsion bei dem Transfer deformiert werden oder flüssige Phase mit dem umgebenden Medium ausgetauscht werden.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden wichtige Voraussetzungen geschaffen, um das Verfahren zur Herstellung von Liposomen zu realisieren. Weitgehende Fortschritte konnten insbesondere bei der Minimierung und Stabilisierung der Tropfengrößenverteilung in WO Nanoemulsionen, der Charakterisierung disperser Systeme mit NMR sowie der Untersuchung des Transfers an der Phasengrenze gemacht werden. Insgesamt ergibt sich ein sehr detailliertes und komplexes Bild für den Prozess. Für eine erfolgreiche Herstellung ist ein weitgehendes Verständnis für den Sachverhalt erforderlich, da es eine Vielzahl von Fehlerquellen gibt oder im Umkehrschluss sehr definierte Parameter für eine Realisierung nötig sind.

Aus den Prozessanforderungen können bei detaillierterer Betrachtung orthogonale Einflüsse identifiziert werden, die ein Optimierungsproblem darstellen. Allen voran ergibt sich der Großteil der Faktoren aus der Anforderung an die Partikel- oder Tropfengröße. Da diese im kolloidalen Bereich liegt, um den Ansprüchen einer pharmazeutischen Nutzung zu genügen, resultieren gehobene Ziele für den Emulgierprozess, die Messtechnik und die genutzten Apparate. Allgemein müssen die Grenzflächenkräfte und kolloidalen Phänomene bei allen Schritten beachtet werden. Dieses soll im Folgenden zusammenfassend erläutert werden.

Die Stabilität der Emulsion verhält sich orthogonal zu der Mobilität der Tropfen. Zwar ist eine stabile Emulsion wünschenswert, um wohldefinierte Eingangsparameter für den Prozess zu schaffen und eine gute Vorlage für das Produkt, die Liposomen, zu etablieren, jedoch müssen die Tropfen dabei beweglich bleiben, um den Transfer zu ermöglichen. Eine Erhöhung der Viskosität in der kontinuierlichen Phase ist insbesondere für die Stabilisierung von WO Emulsionen üblich, hier jedoch nicht möglich. Um die nötige Stabilität zu erreichen, könnte der Emulgator angepasst werden, jedoch sollten Phospholipide mindestens den Hauptanteil darstellen, um in den Liposomen tatsächlich eine gute biologische Kompatibilität und daraus eine gute Verträglichkeit zu gewährleisten. Der Dichte-

gradient zwischen den zwei Phasen ist ebenso im Kompromiss zu wählen, da dieser die Sedimentationsgeschwindigkeit beeinflusst. Der Stabilität der Emulsion wäre eine geringe Differenz zuträglich, während der Transfer erschwert werden würde. Denkbar wäre es, die Viskosität der Tropfen selbst zu erhöhen, was den Emulgierprozess beeinträchtigt, jedoch technisch umsetzbar wäre, um somit die Formstabilität der Tropfen, auch beim Transfer, zu erhöhen. Die Ausbildung eines Gels käme diesem Ansatz nach und würde die Tropfen festigen. Es ist eine Vielzahl an wasserbasierten Gelformulierungen bekannt, die auch den pharmazeutischen Ansprüchen gerecht werden würden. Es muss beachtet werden, dass dabei die Dichte der Tropfen höchstwahrscheinlich erhöht würde und die Oberflächen der Tropfen dadurch nicht unmittelbar modifiziert werden, sodass Agglomeration oder eine schnelle Separation weiterhin als Fehlerquellen bestehen blieben.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit und einiger vorläufiger Experimente wurde das Verhalten der Phospholipide zu Gelbildung bereits genauer untersucht. Generell bildet sich ein Organogel aus, wenn zu einer Mischung aus Squalen und Phospholipid geringe Mengen Wasser gegeben werden. Die Konzentration des Lipids muss dazu ein Vielfaches dessen sein, was bei einer Emulgierung benötigt würde. Die Zugabe von Wasser führt zu einer Strukturierung der Lipide, die in NMR Experimenten durch eine Interaktion des Wassers mit dem Lipid nachgewiesen werden konnte. Wahlweise sind auch andere Öle für eine Gelbildung zu verwenden. Für den oben beschriebenen Anwendungsfall zur Stabilisierung von Wassertropfen, ist diese Variante des Gels nicht geeignet, da das Öl die Basis bildet. Dennoch ist es denkbar, dass in Emulsionen die Struktur des Emulgators sehr lokal an den Phasengrenzen eben dieser Gelform gleicht und somit Auswirkungen auf die Stabilität der Grenzschicht hat. Auch kann es bei dem Transferprozess zu einer Akkumulation der Tropfen mit potentiellen Gelstrukturen kommen.

Wie in den Ergebnissen zum Transfer von Kolloiden dargestellt, spielt die Anzahl oder Konzentration an Tropfen in der Emulsion eine Rolle für den Transfer. Für die experimentelle Begutachtung und Machbarkeitsstudien eignen sich geringe Tropfenzahlen, um Kollisionen oder andere Interaktionen zu vermeiden. Dies ist selbstverständlich für die Effektivität des Prozesses negativ zu bewerten, bei dem eine hohe Anzahl und Dichte an Liposomen erreicht werden sollten. Da die Fläche zwischen den Phasen, der Emulsion und der wässrigen Produktphase, frei wählbar ist, wäre es effektiv diese möglichst groß zu gestalten. Um eine industrielle Nutzung zu ermöglichen, sind die Aspekte einer kontinuierlichen Auslegung und die Skalierbarkeit interessant. Die Schichtung der zwei Phasen lässt sich prinzipiell in

einer kontinuierlichen Flüssigzentrifuge umsetzen und bietet klare Vorteile für das Verfahren. Die Grenzfläche zwischen der Emulsion und der wässrigen Produktphase könnte in Hinblick auf eine große Fläche besser ausgelegt werden, als es in einem Batch möglich ist. Getrennte Feed- und Produktströme würden es ermöglichen, die Konzentrationen an Tropfen zu manipulieren, etwa indem mehr Feedemulsion und damit mehr Tropfen, die Produktphase überströmt. Dies könnte auch als Änderung der effektiven Fläche bezeichnet werden, die somit sozusagen größer wird, als rein geometrisch vorgegeben. In Folge könnten Konzentrationen an Liposomen erreicht werden, die sowohl den pharmazeutischen als auch wirtschaftlichen Anforderungen an eine Mindestkonzentration gerecht werden, ohne dass weitere Verfahrensschritte nach der Zentrifugation angeschlossen werden müssten.

Durch die Modellbetrachtung des Transfers konnten die Einflüsse der Grenzflächenkräfte klar aufgezeigt werden. Insbesondere die Dimension der beitragenden Kräfte in Abhängigkeit von der Größe hebt hervor, dass der Prozess für eine Produktion von Nanopartikeln wesentlich differenzierter von dem Transfer makroskopischer Tropfen oder Partikeln gesehen werden muss. Es ergaben sich Limitierungen für den Prozess, insbesondere für das explizit dargestellte Stoffsystem. Die benötigten Zentrifugalbeschleunigungen sind technisch sehr aufwändig. Dies stellt jedoch keinen Negativbeweis für die Machbarkeit dar. Das Modell berücksichtigt Grenzflächenkräfte aufgrund der Benetzung an der Partikelgrenze, diese sind für flüssige Tropfen jedoch schwieriger zu quantifizieren. Der modellhafte Aufbau eines zweiten Layers an Lipiden, wie es für ein Liposom nötig wäre, würde in anderen energetischen Effekten resultieren. Eventuell muss für diesen Fall die Elastizität der Lipidschicht an den Grenzflächen der Tropfen als auch zwischen den zwei kontinuierlichen Phasen, berücksichtigt werden. Das Phasengleichgewicht in einem solchen System könnte auch als Gleichgewicht zwischen drei Phasen definiert werden. Obwohl in der Produktphase mit den Liposomen Wasser auf beiden Seiten der Membran vorliegt, sind diese klar kompartimentiert und beinhalten verschiedene Stoffe, die im Gleichgewicht berücksichtigt werden müssen. Die Modellberechnung benötigt daher eine Erweiterung, um den Transfer von Tropfen exakt abzuschätzen.

In der gesamten Perspektive muss die potentielle pharmazeutische Nutzung berücksichtigt werden. Dies äußert sich in der Auswahl der Materialien, Chemikalien und Anlagen. Es liegt in diesem Bereich noch weiteres Optimierungspotential vor, da einige der genannten Fragestellungen, wie z.B. die Grenzflächenkräfte

oder Dichte, direkt von den chemischen Eigenschaften abhängen und somit den Prozess beeinflussen. In dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen und Zielpa-rameter im Detail beschrieben, die bei einer zukünftigen Auswahl eines anderen Stoffsystems oder die Ergänzung um weitere Hilfsmittel eine umfassende Basis darstellen. Für eine nicht-pharmazeutische Nutzung, bei der Liposomen für andere Zwecke, wie einer Verwendung als Mikroreaktor, eingesetzt werden, ist das Ver-fahren bereits einsetzbar. Möglich sind dabei größere Liposomen und deren Trans-fer im makroskopischen Bereich, sowie die Nutzung anderer grenzflächenaktiver Substanzen.

Die Messtechniken zur Charakterisierung der Emulsionen, der Grenzflächen und des Transfers wurden für die spezielle Anwendung angepasst und weiterentwi-ckelt. Insbesondere die NMR Diffusometrie ist eine sehr vielversprechende Me-thode. Die Messung der Diffusion und Mobilität einzelner Molekülspezies im Gemisch zu verfolgen bietet weitreichende Vorteile und sogar neue Möglichkei-ten, um dieses flüssig-flüssig System zu verstehen. Limitierungen auf stark trans-parente Lösemittel oder hohe Verdünnungen entfallen bei der NMR, ohne dabei die Probe zu verändern, zu zerstören oder mögliche Messartefakte durch die Prä-paration einer Probe einzubringen. Über die Mobilität der dispersen Phase konnte die Tropfengrößenverteilung von Emulsionen bestimmt werden. Die Methode konnte, wie ausführlich im Ergebnisteil dargestellt, sogar um die bisher unerreich-ten Nanoemulsionen erweitert werden. Weiterhin gibt es vielversprechende An-sätze auch die anderen Molekülspezies, wie den Emulgator, die kontinuierliche Phase und eingekapselte Wirkstoffe, zu lokalisieren. Dadurch kann etwa der Aus-tausch von disperser Phase zwischen den Tropfen, das Verhalten des Emulgators an der Grenzfläche und der Bulkphase oder die Einkapselungseffizienz eines Wirkstoffes im System bestimmt werden. Es ist zudem denkbar die Methode so zu adaptieren, dass die Wechselwirkung der kontinuierlichen Phase mit den Trop-fenwänden eingezogen wird, was zusätzlich die Möglichkeit eröffnen würde auch Suspensionen mit Feststoffpartikeln und deren Größenverteilung zu bestimmen. NMR sollte aufgrund dieser Perspektive weiterhin als sehr fortschrittliche Mess-methode betrachtet werden, auch um die Nachteile hoher Kosten, des Zeitaufwan-des und des benötigten Fachwissens zu minimieren. Als weitere vielversprechende Messmethode konnte die analytische Zentrifuge identifiziert werden, mit der eine Beobachtung des Transfers während der Zentrifugation möglich wird. Allein das Verhalten der einzelnen Phasen und das Sedimentationsprofil der Emulsionen bieten einen Zugang zur Ansteuerung des Herstellungsprozesses. Die Durchfüh-

zung des gesamten Transfers in der Zentrifuge ist ebenso möglich und sollte der Auslegung einer kontinuierlichen Anlage vorausgehen.

Resümierend konnten im Rahmen dieser Dissertation wichtige Voraussetzungen für die Herstellung von pharmazeutisch nutzbaren Liposomen geschaffen werden. Die Stabilität der Emulsionen ist im Bereich geringer Dispersphasenanteile hinreichend, um den Prozess im Labormaßstab zu realisieren. Der Mechanismus der Instabilität von phospholipidbasierten WO Emulsionen konnte weiter aufgeklärt werden. Mit der Erweiterung von NMR Diffusometrie wurden neue Methoden zur Charakterisierung der Emulsionen und Liposomen geschaffen. Der Transfer als solche und die wirkenden Kräfte wurden mit einem umfassenden Modell beschrieben und experimentell bestätigt. Die Vorteile des Herstellungsverfahrens bleiben als Perspektive bestehen, um ein konkurrenzfähiges und sehr effektives Verfahren für die direkte Einkapselung eines Wirkstoffes in Liposomen mit sehr hoher Einkapselungseffizienz in die Praxis zu bringen.

Literaturverzeichnis

- [1] 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* 1 (2) (2012) 147–168.
- [2] V.P. Torchilin, V. Weissig (Eds.), *Liposomes: A practical approach*, 2nd ed., Oxford Univ. Press, Oxford, 2003.
- [3] S.R. Paliwal, R. Paliwal, S.P. Vyas, A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery, *Drug delivery* 22 (3) (2015) 231–242.
- [4] S. Bibi, E. Lattmann, A.R. Mohammed, Y. Perrie, Trigger release liposome systems: Local and remote controlled delivery?, *Journal of microencapsulation* 29 (3) (2012) 262–276.
- [5] G. Gregoriadis, *Liposome preparation and related techniques*, 3rd ed., Informa Healthcare, New York, 2007.
- [6] D.D. Lasic, Novel applications of liposomes, *Trends in Biotechnology* 16 (7) (1998) 307–321.
- [7] Y. Malam, M. Loizidou, A.M. Seifalian, Liposomes and nanoparticles: Nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in pharmacological sciences* 30 (11) (2009) 592–599.
- [8] N. Monteiro, A. Martins, R.L. Reis, N.M. Neves, Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of The Royal Society Interface* 11 (101) (2014) 20140459.
- [9] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (1) (2013) 36–48.
- [10] 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* 63 (3) (1975) 651–658.

- [11] N.L. Boman, L.D. Mayer, P.R. Cullis, Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems, *Biochimica et biophysica acta* 1152 (2) (1993) 253–258.
- [12] 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* 1663 (1-2) (2004) 167–177.
- [13] 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* 1758 (1) (2006) 55–64.
- [14] D.W. Deamer, From "banghasomes" to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921-2010, FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 24 (5) (2010) 1308–1310.
- [15] 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* 557 (1) (1979) 9–23.
- [16] A. Sharma, Liposomes in drug delivery: Progress and limitations, *International Journal of Pharmaceutics* 154 (2) (1997) 123–140.
- [17] M.R. Mozafari, Liposomes: An overview of manufacturing techniques, *Cellular & molecular biology letters* 10 (4) (2005) 711–719.
- [18] G. Gregoriadis, Liposomes in Drug Delivery: How It All Happened, *Pharmaceutics* 8 (2) (2016).
- [19] D. Lichtenberg, Y. Barenholz, Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation, in: D. Glick (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 1988, pp. 337–462.
- [20] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: Classification, preparation, and applications, *Nanoscale research letters* 8 (1) (2013) 102.
- [21] H.P. Schuchmann, T. Danner, Emulgieren: Mehr als nur Zerkleinern, *Chemie Ingenieur Technik* 76 (4) (2004) 364–375.
- [22] K. Köhler, H.P. Schuchmann (Eds.), *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*, 3rd ed., Behr, Hamburg, 2012.
- [23] P. Karthik, P.N. Ezhilarasi, C. Anandharamakrishnan, Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions, *Critical reviews in food science and nutrition* 57 (7) (2017) 1435–1450.

-
- [24] D.J. McClements, C.E. Gumus, Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physico-chemical basis of functional performance, *Adv. Colloid Interface Sci.* 234 (2016) 3–26.
- [25] P. van Hoogevest, A. Wendel, The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (9) (2014) 1088–1107.
- [26] Y. Wu, T. Wang, Soybean lecithin fractionation and functionality, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (4) (2003) 319–326.
- [27] A. Kabalnov, T. Tarara, R. Arlauskas, J. Weers, Phospholipids as Emulsion Stabilizers: 2. Phase Behavior versus Emulsion Stability, *J. Colloid Interface Sci.* 184 (1) (1996) 227–235.
- [28] F.Y. Ushikubo, R.L. Cunha, Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions, *Food Hydrocolloids* 34 (2014) 145–153.
- [29] S. Friberg (Ed.), *Food emulsions*, 4th ed., Dekker, New York, NY, 2004.
- [30] A. Kabalnov, J. Weers, R. Arlauskas, T. Tarara, Phospholipids as Emulsion Stabilizers. 1. Interfacial Tensions, *Langmuir* 11 (8) (1995) 2966–2974.
- [31] T. Delmas, Piraux, Couffin, Anne-Claude, I. Texier, F. Vinet, P. Poulin, M.E. Cates, Bibette, How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions, *Langmuir* 27 (5) (2011) 1683–1692.
- [32] S. Freitas, G. Hielscher, H.P. Merkle, B. Gander, Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification—a useful tool for pharmaceutical development and production, *Ultrasonics Sonochemistry* 13 (1) (2006) 76–85.
- [33] O. Behrend, H. Schubert, Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification, *Ultrasonics Sonochemistry* 8 (3) (2001) 271–276.
- [34] L. Picart, M. Thiebaud, M. René, J. Pierre Guiraud, J.C. Cheftel, E. Dumay, Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments, *The Journal of dairy research* 73 (4) (2006) 454–463.
- [35] A.R. Kleinig, A.P.J. Middelberg, On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation, *Chemical Engineering Science* 53 (5) (1998) 891–898.
- [36] 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, *Adv. Colloid Interface Sci.* 140 (2) (2008) 67–76.

- [37] J. Li, R. Miller, R. Wüstneck, H. Möhwald, W.A. Neumann, Use of pendent drop technique as a film balance at liquid/liquid interfaces, *Colloids Surf., A* 96 (3) (1995) 295–299.
- [38] 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 Surf., A* 114 (1996) 113–121.
- [39] F. Ishii, T. Nii, Properties of various phospholipid mixtures as emulsifiers or dispersing agents in nanoparticle drug carrier preparations, *Colloids Surf., B* 41 (4) (2005) 257–262.
- [40] C.B. Fox, Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery, *Molecules* 14 (9) (2009) 3286–3312.
- [41] S. Pautot, B.J. Frisken, D.A. Weitz, Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion, *Langmuir* 19 (7) (2003) 2870–2879.
- [42] P.C. Hu, S. Li, N. Malmstadt, Microfluidic Fabrication of Asymmetric Giant Lipid Vesicles, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3 (5) (2011) 1434–1440.
- [43] Y. Elani, A.J. de Mello, X. Niu, O. Ces, Novel technologies for the formation of 2-D and 3-D droplet interface bilayer networks, *Lab Chip* 12 (18) (2012) 3514–3520.
- [44] E. Hildebrandt, A. Dessy, J.-H. Sommerling, G. Guthausen, H. Nirschl, G. Leneweit, Interactions between Phospholipids and Organic Phases: Insights in Lipoproteins and Nanoemulsions, *Langmuir* 32 (23) (2016) 5821–5829.
- [45] 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* 505 (505) (2016) 56–63.
- [46] K. Westensen, T. Wehler, Investigation of the Particle Size Distribution of a Model Intravenous Emulsion, *J. Pharm. Sci.* 82 (12) (1993) 1237–1244.
- [47] T. Tadros, Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109 (2004) 227–258.
- [48] W.I. Higuchi, J. Misra, Physical Degradation of Emulsions Via the Molecular Diffusion Route and the Possible Prevention Thereof, *J. Pharm. Sci.* 51 (5) (1962) 459–466.
- [49] M.Y. Koroleva, E.V. Yurtov, Effect of Ionic Strength of Dispersed Phase on Ostwald Effect of Ionic Strength of Dispersed Phase on Ostwald Ripening in Water-in-Oil Emulsions, *Colloid Journal* 65 (1) (2003) 40–43.

-
- [50] B. Deminiere, T. Stora, A. Colin, a. F. Leal-Calderon, J. Bibette, Surfactant Phase Transition Inducing Coalescence in Dense Emulsions, *Langmuir* 15 (7) (1999) 2246–2249.
- [51] H. Wang, R.H. Davis, Droplet Growth Due to Brownian, Gravitational, or Thermocapillary Motion and Coalescence in Dilute Dispersions, *J. Colloid Interface Sci.* 159 (1) (1993) 108–118.
- [52] T.W. Hansen, A.T. Delariva, S.R. Challa, A.K. Datye, Sintering of catalytic nanoparticles: Particle migration or Ostwald ripening?, *Accounts of chemical research* 46 (8) (2013) 1720–1730.
- [53] D.J. McClements, Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability, *Critical reviews in food science and nutrition* 47 (7) (2007) 611–649.
- [54] A. Kabalnov, Ostwald Ripening and Related Phenomena, *Journal of Dispersion Science and Technology* 22 (1) (2001) 1–12.
- [55] D.T. Piorkowski, D.J. McClements, Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications, *Food Hydrocolloids* 42 (2014) 5–41.
- [56] E. Hildebrandt, Erzeugung funktionaler Lipidkapseln aus Nanoemulsionen – Verfahrensentwicklung, Produktcharakterisierung und Erprobung, Karlsruhe, 2017.
- [57] E.L. Cussler, *Diffusion: Mass transfer in fluid systems*, 3rd ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2011.
- [58] A. Einstein, Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Ann. Phys.* 322 (8) (1905) 549–560.
- [59] A.L. Kholodenko, J.F. Douglas, Generalized Stokes-Einstein equation for spherical particle suspensions, *Phys. Rev. E* 51 (2) (1995) 1081–1090.
- [60] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (41) (2006) R635-R666.
- [61] J.S. Murday, R.M. Cotts, Self Diffusion Coefficient of Liquid Lithium, *The Journal of Chemical Physics* 48 (11) (1968) 4938–4945.
- [62] K.J. Packer, C. Rees, Pulsed NMR studies of restricted diffusion. I. Droplet size distributions in emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 40 (2) (1972) 206–218.
- [63] R. Bernewitz, U.S. Schmidt, H.P. Schuchmann, G. Guthausen, Structure of and diffusion in O/W/O double emulsions by CLSM and NMR comparison with W/O/W, *Colloids Surf., A* 458 (2014) 10–18.

- [64] L. Vermeir, P. Sabatino, M. Balcaen, A. Declerck, K. Dewettinck, J.C. Martins, G. Guthausen, P. van der Meeren, Effect of molecular exchange on water droplet size analysis as determined by diffusion NMR: The W/O/W double emulsion case, *J. Colloid Interface Sci.* 475 (2016) 57–65.
- [65] I.A. Lingwood, T.C. Chandrasekera, J. Kolz, E.O. Fridjonsson, M.L. Johns, Emulsion droplet sizing using low-field NMR with chemical shift resolution and the block gradient pulse method, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. 1997)* 214 (1) (2012) 281–288.
- [66] M.L. Johns, NMR studies of emulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14 (3) (2009) 178–183.
- [67] K.G. Hollingsworth, M.L. Johns, Measurement of emulsion droplet sizes using PFG NMR and regularization methods, *J. Colloid Interface Sci.* 258 (2) (2003) 383–389.
- [68] R. Bernewitz, F. Dalitz, K. Köhler, H.P. Schuchmann, G. Guthausen, Characterisation of multiple emulsions by NMR spectroscopy and diffusometry, *Microporous and Mesoporous Materials* 178 (2013) 69–73.
- [69] G.A. Webb, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 1st ed., Elsevier textbooks, s.l., 2003.
- [70] L. Ambrosone, S. Murgia, G. Cinelli, M. Monduzzi, A. Ceglie, Size Polydispersity Determination in Emulsion Systems by Free Diffusion Measurements via PFG-NMR, *J. Phys. Chem. B* 108 (48) (2004) 18472–18478.
- [71] M.L. Johns, K.G. Hollingsworth, Characterisation of emulsion systems using NMR and MRI, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 50 (2-3) (2007) 51–70.
- [72] G.J.W. Goudappel, J.P.M. van Duynhoven, M.M.W. Mooren, Measurement of Oil Droplet Size Distributions in Food Oil/Water Emulsions by Time Domain Pulsed Field Gradient 5NMR6, *J. Colloid Interface Sci.* 239 (2) (2001) 535–542.
- [73] T. Garasanin, T. Cosgrove, L. Marteaux, A. Kretschmer, A. Goodwin, K. Zick, NMR Self-Diffusion Studies on PDMS Oil-in-Water Emulsion, *Langmuir* 18 (26) (2002) 10298–10304.
- [74] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Huhn, C. Carrillo-Carrion, D.J. de Aberasturi, V. Merk, S. Barcikowski, W.J. Parak, Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles, *Journal of the Royal Society, Interface* 11 (96) (2014) 20130931.

-
- [75] I. Capek, Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) micro-emulsions, *Advances in colloid and interface science* 110 (1-2) (2004) 49–74.
- [76] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 0 (7) (1994) 801–802.
- [77] D. Zhao, Z. Fei, W.H. Ang, P.J. Dyson, A strategy for the synthesis of transition-metal nanoparticles and their transfer between liquid phases, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2 (7) (2006) 879–883.
- [78] D.I. Gittins, F. Caruso, Spontaneous Phase Transfer of Nanoparticulate Metals from Organic to Aqueous Media, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (16) (2001) 3001–3004.
- [79] S.-Y. Zhao, S.-H. Chen, D.-G. Li, H.-Y. Ma, Phase transfer of Ag nanoparticles by help of centrifugation, *Colloids Surf., A* 242 (1-3) (2004) 145–149.
- [80] S. Machunsky, P. Grimm, H.-J. Schmid, U.A. Peuker, Liquid-liquid phase transfer of magnetite nanoparticles, *Colloids Surf., A* 348 (1-3) (2009) 186–190.
- [81] J. Erler, S. Machunsky, P. Grimm, H.-J. Schmid, U.A. Peuker, Liquid–liquid phase transfer of magnetite nanoparticles — Evaluation of surfactants, *Powder Technology* 247 (2013) 265–269.
- [82] G. Mériquet, E. Dubois, R. Perzynski, Liquid–liquid phase-transfer of magnetic nanoparticles in organic solvents, *Journal of Colloid and Interface Science* 267 (1) (2003) 78–85.
- [83] Y. Lin, H. Skaff, T. Emrick, A.D. Dinsmore, T.P. Russell, Nanoparticle assembly and transport at liquid-liquid interfaces, *Science (New York, N.Y.)* 299 (5604) (2003) 226–229.
- [84] N. Mohammadidinani, A.H. Azimi, S. Elyasi, Experimental Investigation of Sand Jets Passing Through Immiscible Fluids, *J. Fluids Eng* 139 (5) (2017) 51303.
- [85] M. Konrath, A.-K. Brenner, E. Dillner, H. Nirschl, Centrifugal classification of ultrafine particles: Influence of suspension properties and operating parameters on classification sharpness, *Separation and Purification Technology* 156 (2015) 61–70.
- [86] C.M. Hansen, 50 Years with solubility parameters—past and future, *Progress in Organic Coatings* 51 (1) (2004) 77–84.
- [87] H.T. Ham, Y.S. Choi, I.J. Chung, An explanation of dispersion states of single-walled carbon nanotubes in solvents and aqueous surfactant solutions

- using solubility parameters, *J. Colloid Interface Sci.* 286 (1) (2005) 216–223.
- [88] L. Zhang, R. He, H.-C. Gu, Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles, *Applied Surface Science* 253 (5) (2006) 2611–2617.
- [89] A. Maestro, E. Santini, D. Zabiegaj, S. Llamas, F. Ravera, L. Liggieri, F. Ortega, R.G. Rubio, E. Guzman, Particle and Particle-Surfactant Mixtures at Fluid Interfaces: Assembly, Morphology, and Rheological Description, *Advances in Condensed Matter Physics* 2015 (6) (2015) 1–17.
- [90] F. Ravera, E. Santini, G. Loglio, M. Ferrari, L. Liggieri, Effect of nanoparticles on the interfacial properties of liquid/liquid and liquid/air surface layers, *The journal of physical chemistry. B* 110 (39) (2006) 19543–19551.
- [91] B.P. Binks, T.S. Horozov (Eds.), *Colloidal particles at liquid interfaces*, Cambridge University Press, Cambridge, 2006.
- [92] B.P. Binks, D. Yin, Pickering emulsions stabilized by hydrophilic nanoparticles: In situ surface modification by oil, *Soft Matter* 12 (32) (2016) 6858–6867.
- [93] K. Liu, J. Jiang, Z. Cui, B.P. Binks, pH-Responsive Pickering Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles in Combination with a Conventional Zwitterionic Surfactant, *Langmuir* 33 (9) (2017) 2296–2305.
- [94] A. Deak, E. Hild, A.L. Kovacs, Z. Horvolgyi, Contact angle determination of nanoparticles: Film balance and scanning angle reflectometry studies, *Physical chemistry chemical physics PCCP* 9 (48) (2007) 6359–6370.
- [95] E. Guzmán, L. Liggieri, E. Santini, M. Ferrari, F. Ravera, Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers, *J. Phys. Chem. C* 115 (44) (2011) 21715–21722.
- [96] H. Vatanparast, A. Javadi, A. Bahramian, Silica nanoparticles cationic surfactants interaction in water-oil system, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 521 (2017) 221–230.
- [97] H. Ma, M. Luo, L.L. Dai, Influences of surfactant and nanoparticle assembly on effective interfacial tensions, *Physical chemistry chemical physics PCCP* 10 (16) (2008) 2207–2213.
- [98] K. Du, E. Glogowski, T. Emrick, T.P. Russell, A.D. Dinsmore, Adsorption energy of nano- and microparticles at liquid-liquid interfaces, *Langmuir* 26 (15) (2010) 12518–12522.
- [99] M. Schmitt, S. Limage, R. Denoyel, M. Antoni, Effect of SPAN80 on the structure of emulsified aqueous suspensions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 521 (2017) 121–132.

-
- [100] 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* 9 (3) (1971) 373–380.
- [101] L. Zhang, J. Hu, Z. Lu, Preparation of Liposomes with a Controlled Assembly Procedure, *J. Colloid Interface Sci.* 190 (1) (1997) 76–80.
- [102] K. Nishimura, H. Suzuki, T. Toyota, T. Yomo, Size control of giant unilamellar vesicles prepared from inverted emulsion droplets, *J. Colloid Interface Sci.* 376 (1) (2012) 119–125.
- [103] T. Hamada, Y. Miura, Y. Komatsu, Y. Kishimoto, M. Vestergaard, M. Takagi, Construction of Asymmetric Cell-Sized Lipid Vesicles from Lipid-Coated Water-in-Oil Microdroplets, *The Journal of Physical Chemistry B* 112 (47) (2008) 14678–14681.
- [104] J. Whittenton, S. Harendra, R. Pitchumani, K. Mohanty, C. Vipulanandan, S. Thevananther, Evaluation of Asymmetric Liposomal Nanoparticles for Encapsulation of Polynucleotides, *Langmuir* 24 (16) (2008) 8533–8540.
- [105] R. Bernewitz, G. Guthausen, H.P. Schuchmann, NMR on emulsions: Characterisation of liquid dispersed systems, *Magnetic resonance in chemistry* MRC 49 Suppl 1 (2011) S93-104.
- [106] T. Detloff, T. Sobisch, D. Lerche, Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems), *Powder Technology* 174 (1-2) (2007) 50–55.
- [107] T.J. Wooster, M. Golding, P. Sanguansri, Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability, *Langmuir* 24 (22) (2008) 12758–12765.
- [108] M. Campana, J.R.P. Webster, M.J. Lawrence, A. Zarbakhsh, Structural conformation of lipids at the oil-water interface, *Soft Matter* 8 (34) (2012) 8904–8910.
- [109] S. Abel, N. Galamba, E. Karakas, M. Marchi, W.H. Thompson, D. Laage, On the Structural and Dynamical Properties of DOPC Reverse Micelles, *Langmuir* 32 (41) (2016) 10610–10620.
- [110] K. Kittipongpittaya, A. Panya, D.J. McClements, E.A. Decker, Impact of Free Fatty Acids and Phospholipids on Reverse Micelles Formation and Lipid Oxidation in Bulk Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91 (3) (2014) 453–462.
- [111] J. Rodriguez Patino, A. Caro, M. Rodriguez Nino, A. Mackie, A. Gunning, V. Morris, Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers, *Food chemistry* 102 (2) (2007) 532–541.

- [112] P. Taylor, Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase, *Adv. Colloid Interface Sci.* 106 (13) (2003) 261–285.
- [113] S. Suriyarak, J. Weiss, Cutoff Ostwald ripening stability of alkane-in-water emulsion loaded with eugenol, *Colloids Surf., A* 446 (2014) 71–79.
- [114] P. Taylor, Ostwald ripening in emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 75 (2) (1998) 107–163.
- [115] I. Hoffmann, M. Simon, A. Hörmann, T. Gravert, P. Heunemann, S.E. Rogers, M. Gradzielski, Kinetics of Oil Exchange in Nanoemulsions Prepared with the Phase Inversion Concentration Method, *Langmuir* 32 (46) (2016) 12084–12090.
- [116] J. Weiss, N. Herrmann, D.J. McClements, Ostwald Ripening of Hydrocarbon Emulsion Droplets in Surfactant Solutions, *Langmuir* 15 (20) (1999) 6652–6657.
- [117] A.E. Wiącek, Effect of ionic strength on electrokinetic properties of oil/water emulsions with dipalmitoylphosphatidylcholine, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 302 (1-3) (2007) 141–149.
- [118] J. Chaprenet, C.C. Berton-Carabin, R.J. Elias, J.N. Coupland, Effect of interfacial properties on the reactivity of a lipophilic ingredient in multi-layered emulsions, *Food Hydrocolloids* 42 (2014) 56–65.
- [119] A. Knoth, I. Scherze, G. Muschiolik, Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-depleted lecithin, *Food Hydrocolloids* 19 (3) (2005) 635–640.
- [120] J.D. Weete, S. Betageri, G.L. Griffith, Improvement of lecithin as an emulsifier for water-in-oil emulsions by thermalization, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (7) (1994) 731–737.
- [121] G.L. Hasenhuettl, R.W. Hartel, *Food emulsifiers and their applications*, 2nd ed., Springer, New York, NY, 2008.
- [122] E. Guzmán, D. Orsi, L. Cristofolini, L. Liggieri, F. Ravera, Two-dimensional DPPC based emulsion-like structures stabilized by silica nanoparticles, *Langmuir* 30 (39) (2014) 11504–11512.
- [123] J.-H. Sommerling, M.B.C. de Matos, E. Hildebrandt, A. Dessy, R.J. Kok, N. Hermann, Instability mechanisms of water in oil nanoemulsions with phospholipids: temporal and morphological structures. In *Revision*, *Langmuir*.
- [124] 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* 42 (1) (1965) 288–292.

-
- [125] D.W. de Kort, J.P.M. van Duynhoven, H. Van As, F. Mariette, Nanoparticle diffusometry for quantitative assessment of submicron structure in food biopolymer networks, *Trends in Food Science & Technology* 42 (1) (2015) 13–26.
- [126] A. Maestro, E. Guzmán, E. Santini, F. Ravera, L. Liggieri, F. Ortega, R.G. Rubio, Wettability of silicananoparticle–surfactant nanocomposite interfacial layers, *Soft Matter* 8 (3) (2012) 837–843.
- [127] T.S. Horozov, D.A. Braz, P.D.I. Fletcher, B.P. Binks, J.H. Clint, Novel film-calliper method of measuring the contact angle of colloidal particles at liquid interfaces, *Langmuir* 24 (5) (2008) 1678–1681.
- [128] C.W. Extrand, Origins of Wetting, *Langmuir* 32 (31) (2016) 7697–7706.
- [129] J.M. Pollard, A.J. Shi, K.E. Göklen, Solubility and Partitioning Behavior of Surfactants and Additives Used in Bioprocesses, *J. Chem. Eng. Data* 51 (1) (2006) 230–236.
- [130] M.M. Fryd, T.G. Mason, Advanced nanoemulsions, *Annual review of physical chemistry* 63 (2012) 493–518.
- [131] A. Maestro, E. Guzmán, F. Ortega, R.G. Rubio, Contact angle of micro- and nanoparticles at fluid interfaces, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 19 (4) (2014) 355–367.

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

a) Lateinische Symbole

k_B	Boltzmann-Konstante ($= 1,381 \cdot 10^{-23}$)	$\text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$
A	Fläche	m^2
D	translationale Diffusionskonstante	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
E	Energie	$\text{J} = \text{N} \cdot \text{m}$
F	Kraft	$\text{N} = \text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
M	Molmasse	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$
\mathbb{R}	universelle Gaskonstante ($= 8,314$)	$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
R, r	Radius	m
S	Signalintensität (NMR)	$[-]$
T	absolute Temperatur	K
a	Zentrifugalbeschleunigung	$\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
c	Konzentration	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
d	Durchmesser von Partikel oder Tropfebn	m
g	Gravitationskonstante ($= 9,807$)	$\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
l	Länge	m
v	Geschwindigkeit	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
V_m	molares Volumen	$\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$
q^2	Substitut $q^2 = \gamma^2 g^2 \delta^2$	m
w_{50}	halbmaximale Verteilungsbreite	m
h	Eintauchtiefe	m
m	Steigung	$[-]$
m	Masse	kg
g	Gradient	

b) Griechische Symbole

θ (theta)	Kontaktwinkel	°
γ (Gamma)	Grenzflächenspannung	$\text{N}\cdot\text{m}^{-1} = \text{kg}\cdot\text{s}^{-2}$
γ (Gamma)	Gyromagnetisches Verhältnis	$\text{N}\cdot\text{m}^{-1} = \text{kg}\cdot\text{s}^{-2}$
δ (Delta)	chemische Verschiebung	$\text{ppm} = 1 \times 10^{-6}$
δ (Delta)	Gradientendauer	ms
Δ (Delta)	Diffusionsdauer	ms
η (Eta)	dynamische Viskosität	$\text{Pa}\cdot\text{s} = \text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
π (Pi)	Kreiszahl	(= 3,1415)
ρ (Rho)	Dichte	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$

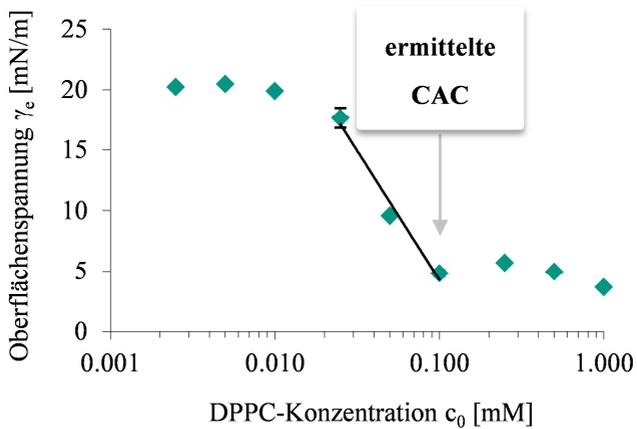
d) Abkürzungen

ACQ	Zeit der Datenerfassung bei der NMR(“ <i>acquisition</i> “)
CAC	kritische Aggregationskonzentration („ <i>critical concentration</i> “)
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration („ <i>critical concentration</i> “)
DLS	dynamische Lichtstreuung
DPPC	1,2-dipalmitoyl-PC, Phospholipid
h	Stunde
min	Minute
NMR	Kernspin-Resonanzspektroskopie („ <i>nuclear magnetic</i> “)
PAT	Profil-Analyse-Tensiometrie
PC	Phosphatidylcholin, Phospholipid
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie („ <i>corellation</i> “)
PDI	Polydispersitätsindex, Lichtstreuung
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PC, Phospholipid
s	Sekunde
PL	Phospholipid
WO	Wasser-in-Öl Emulsion
OW	Öl-in-Wasser Emulsion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumlaurylsulfat, Tensid
PFG	Pulsed field gradient, PFG-STE, NMR Pulssequenz
STE	stimulated echo, PFG-STE, NMR Pulssequenz
WFI	water for injection

DSA	d rop s hape a nalysis, Tensiometrie
DCR	d erived count r ate, Lichtstreuung
RMSD	r oot m ean s quare d isplacenment
RMSE	r oot m ean s quare error
%-vol	V olumen p rozent

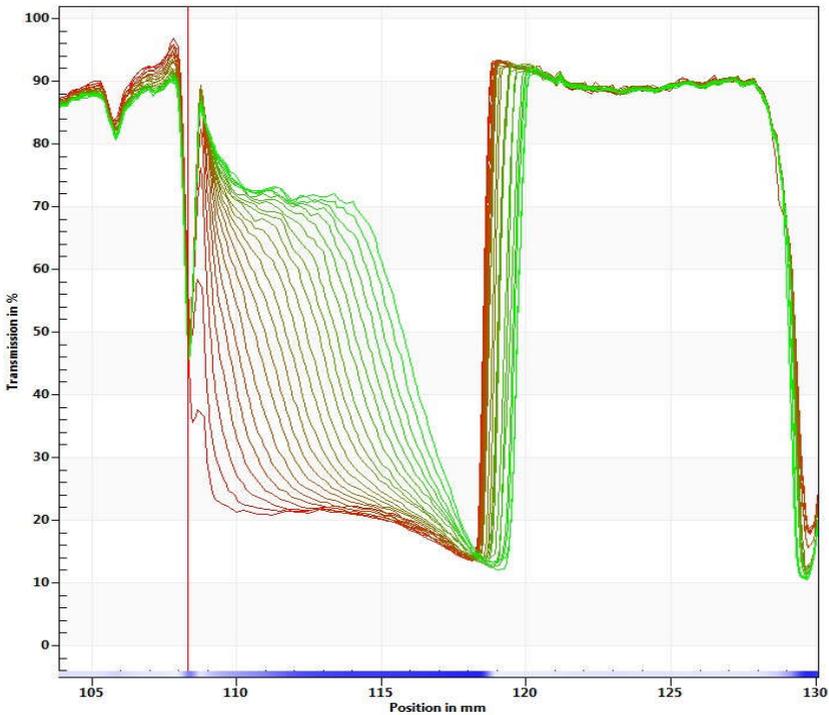
Anhang

A.1 Tensiometrische Daten



Anhang 1: Tensiometrische Daten von DPPC in Squalen an der Grenzfläche zu Wasser im Equilibrium. Mit steigender Konzentration an DPPC sinkt die Grenzflächenspannung von etwa 20 mN/m bis auf 4 mN/m. Die CAC liegt bei 0,103 mM.

A.2 Daten zu Versuchen des Transfers von Feststoffpartikeln



Anhang 2: Beispielhafte Darstellung der Transmission über der Position der Küvette für den Transfer von kolloidalen Partikeln. Der Zeitverlauf ist durch den Farbgradienten von rot zu grün gekennzeichnet. Im oberen Teil der Küvette zwischen 108 und 119mm wurde eine kolloidale Suspension mit SF600 in Squalen über einer wässrigen Phase geschichtet, die von 120 bis 130mm zu sehen ist. Die Transmission wird durch die Suspension auf 20% reduziert und bildet während der Zentrifugation eine Sedimentationsfront aus, sodass die Partikel zu der Phasengrenze wandern. In der wässrigen Phase ist hingegen keine Änderung festzustellen, sodass geschlussfolgert werden kann, dass keine Partikel die Grenze durchtreten.



Anhang 3: Küvetten mit Schichtungen aus einer Dispersion mit SF600 über Wasser nach der Zentrifugation. Links ist eine Konzentration von 0,8% mit deutlich ausgeprägter Zwischenschicht und Tropfen von ~1mm am Küvettenboden zu sehen. Die rechte Seite zeigt eine Konzentration von 0,1% mit sehr kleinen Agglomeraten an der Phasengrenze.

Publikationsliste

Sommerling, J.-H., Matos, M. B. C. de, Hildebrandt, E., Dessy, A., Kok, R. J., Nirschl, H., Lenewit, G. Instability Mechanisms of Water-in-Oil Nanoemulsions with Phospholipids: Temporal and Morphological Structures. *Langmuir* **2018**, *34*, 572–584.

Sommerling, J.-H., Uhlenbruck, N., Lenewit, G., Nirschl, H. Transfer of colloidal particles between two non-miscible liquid phases. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2017**, *535*, 257–264.

Sommerling, J.-H., Simon, A., Haber, A., Johns, M., Guthausen, G., Nirschl, H. Interpretation of NMR diffusometry data regarding droplet size distributions in micro- and nanoemulsions. In *Proceedings of the XIII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*; IM Publications, **2016**, p. 67.

Hildebrandt, E., Dessy, A., **Sommerling, J.-H.**, Guthausen, G., Nirschl, H., Lenewit, G. Interactions between Phospholipids and Organic Phases: Insights in Lipoproteins and Nanoemulsions. *Langmuir* **2016**, *32*, 5821–5829.

Hildebrandt, E., **Sommerling, J.-H.**, Guthausen, G., Zick, K., Stürmer, J., Nirschl, H., Lenewit, G. 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.