

Ein effizienteres Herstellungsverfahren für Liposomen aus Wasser-in-Fluorocarbon Nanoemulsionen

zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

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

genehmigte

DISSERTATION

von
M. Sc. Kirsten Ullmann
aus Oelde

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl

Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2022

An dieser Stelle las ich bei vielen Kollegen
„Für meine Eltern“.

Auch ich widme diese Dissertation meinen Eltern.

Gemacht habe ich es jedoch

Für mich selbst.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in den Jahren 2017 bis 2021.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl, für das entgegengebrachte Vertrauen, dass ich als Biotechnologin das Bindeglied zwischen den verfahrenstechnischen und pharmazeutischen Aspekten sein konnte. Ferner möchte ich mich für die hilfreichen Anregungen, die Unterstützung und die Möglichkeit meine Arbeit auf zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu dürfen, bedanken.

Ein ebenso besonderer Dank geht an Herrn Dr. Gero Leneweit, der mich während meiner Beschäftigung am MVM fachlich betreut hat. Der Austausch und die Diskussionen, besonders während der Erstellung der Fachpublikationen, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders angenehm empfand ich die Nähe zur Forschungs- und Entwicklungsabteilung eines mittelständischen Unternehmens. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit!

Herrn Prof. Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und sein Interesse an meiner Arbeit.

Ferner danken möchte ich dem Phospholipid Forschungszentrum aus Heidelberg, insbesondere Herrn Peter van Hoogevest und Herrn Simon Drescher, für die finanzielle Unterstützung der Projekte sowie den fachlichen Austausch während der Phospholipid Symposien und Doktorandentage. Für mich als Verfahrenstechnikerin war bei jedem Zusammentreffen die Kommunikation mit den Naturwissenschaftler:innen ein Gewinn.

Während meiner Zeit am MVM durfte ich mit vielen engagierten Studierenden zusammenarbeiten. Namentlich sind dies Lukas Poggemann, Lea Fachel, Christopher Heck, Carolyn Benner, Nadine Zimmerer, Patric Siefermann, Dominik Ditton, Christian Beck, Niklas Krappel und Jean-Claude Nuebissi. Durch die gemeinsamen Diskussionen haben sich auch mir immer wieder neue Wege aufgetan. Vielen Dank dafür.

Meinen Kolleginnen und Kollegen am MVM möchte ich für das schöne Miteinander danken. Ich konnte immer auf die Unterstützung der Mitarbeiter:innen der Partikelmesstechnik und der Werkstätten zählen.

Ein riesiges Dankeschön geht an das Verwaltungspersonal Frau Hafendörfer, Kerstin Schwab, Verena Barth sowie Kerstin Bertsch und Amuthavalli Schnepf. Hier gab es nicht nur Antworten auf viele verwaltungstechnische Fragen, sondern auch die nötigen Gummibärchen, wenn die Energiereserven aufgefüllt werden mussten.

Ebenso möchte ich den wissenschaftlichen Mitarbeiter:innen danken. Diverse Grillabende, das Wanderseminar, der Austausch beim Kaffee und beim Kickern lassen mich gerne an diese schöne Zeit zurückdenken. Ganz besonders danke ich meinem „Mädelsbüro“, Lisa und Marie, für das offene Ohr und dass aus Kolleginnen Freundinnen geworden sind! Namentlich erwähnen möchte ich an dieser Stelle auch Mira Simmler und Almuth Schwarz für Spaziergänge, die geholfen haben, die Gedanken zu sortieren, und Manuel Meier, der um Ideen nie verlegen war. Danke für Eure Freundschaft!

Vielen lieben Dank auch an meine Eltern und meine Schwester, die mich immer unterstützen und mich darin bestärkt haben, dass ich meine gesetzten Ziele erreichen kann.

Zum Schluss gilt mein ganz persönlicher Dank Dir, lieber Steffen, für deinen unermüdlichen Rückhalt und für das Korrekturlesen dieser Arbeit, dass Du mich zu (sportlichen) Höchstleistungen anspornst und mich jederzeit zum Lachen bringst. Es ist schön, Dich auch bei den kommenden Herausforderungen – beruflich und privat als Eltern – an meiner Seite zu wissen!

Zusammenfassung

Die Verabreichung von Wirkstoffen ohne einen vorzeitigen Abbau im Körper stellt in manchen pharmazeutischen Anwendungen eine Herausforderung dar. Untersuchungen von verschiedenen Transportsystemen wie Liposomen nehmen sich dieser Problematik an. Liposomen sind kugelförmige Vesikel, die aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehen und Bestandteil von natürlichen Membranen sind. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und der Analyse eines neuen Herstellungsprozesses von Liposomen aus Wasser-in-Fluorocarbon Nanoemulsionen für die pharmazeutische Anwendung. Der neue Prozess kommt ohne die Verwendung von organischen Lösungsmitteln aus, sodass eine aufwendige Entfernung entfällt. Im Fokus der Arbeit liegen drei Schwerpunkte, die den wesentlichen Bestandteil des Prozesses ausmachen: Die Auswahl des passenden Stoffsystems, deren Charakterisierung mit geeigneten Analysemethoden und die Herstellung sowie Einkapselungseffizienz von Liposomen.

Der erste Schwerpunkt liegt in der tensiometrischen Wechselwirkung zwischen der wässrigen und hydrophoben Phase. Als hydrophobe Phase kommt das Perfluorocarbon Perfluoroperhydrophenanthren zum Einsatz, welches aufgrund seiner inerten Eigenschaften für die pharmazeutische Anwendung zunehmend an Bedeutung gewinnt. An der Grenzfläche zwischen dem Perfluorocarbon und der wässrigen Phase lagern sich diffusionskontrolliert verschiedene Phospholipide an, die im Transferprozess als Baustein für die Doppelschicht der Liposomen dienen.

Herausfordernd ist die Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen, da hohe Dichteunterschiede und fast identische Brechungsindizes den Einsatz von visuellen Methoden wie der Tropfenprofilanalyse unmöglich machen. Gegenätzlich der zeitintensiven, nicht-invasiven Spinning Drop Tensiometrie liefert die invasive Du Noüy-Ring Methode effizienter reproduzierbare Ergebnisse.

Die Analyse der Grenzflächen zwischen verschiedenen Phospholipid-Suspensionen und der hydrophoben Phase zeigt, dass die Dauer zum Erreichen der Gleichgewichts-Grenzflächenspannung mit zunehmender Länge der Fettsäurekette zunimmt. Dies zeigt sich insbesondere bei der minimal erreichbaren Grenzflächenspannung. Auch der Temperaturbereich beeinflusst den Adsorptionsprozess, da sich oberhalb der Übergangstemperatur der jeweiligen Phospholipide der Anlagerungsprozess an die Grenzfläche beschleunigt und Unterschiede zwischen den Fettsäureketten nicht mehr auszumachen sind.

Im zweiten Abschnitt erfolgt die Herstellung der Nanoemulsionen über die Ultraschallermulgiung mit anschließender Tropfengrößenanalyse. Ähnliche Brechungsindizes zwischen hydrophober und hydrophiler Phase erschweren die Messung der Nanoemulsionströpfchen mittels dynamischer Lichtstreuung. Aufgrund des Eintrags von Gasblasen in das System ist der anzahlgewichtete Durchmesser als Vergleichswert direkt nach der Herstellung zu bevorzugen. Langzeitanalysen zeigen, dass unabhängig vom verwendeten Phospholipid eine Langzeitstabilität von mehreren Wochen bei einer Größe von < 200 nm zu erreichen ist. Die Ergebnisse mit Perfluoroperhydrophenanthren und der Vergleich mit anderen Fluorocarbonen zeigen, dass die Eigenschaften des Stabilisators weniger ins Gewicht fallen als die Eigenschaften des Fluorocarbons selbst. Eine geringere Dichte der hydrophoben Phase führt zu größeren Tropfen und einer höheren Polydispersität der Nanoemulsionen.

Da die Tropfengröße der Nanoemulsionen im Zielbereich liegt, ist der Transfer zur Liposomenherstellung als zweiter Verfahrensschritt möglich. Durch den Transfer entstehen Liposomen mit einer mittleren Größe von etwa 60 nm, welche sowohl mit der dynamischen Lichtstreuung als auch der Röntgenkleinwinkelstreuung gemessen sind.

Fluoreszein-Natrium, Rinderserumalbumin und Fluoreszenz-markiertes Dextran kamen als Modellwirkstoffe zum Einsatz. Als Nachweismethode für deren Einkapselungseffizienzen dient die UV-Vis Spektroskopie. Unter Verwendung von Reinstwasser als hydrophile Phase und Fluoreszein-Natrium als niedrigmolekularem Wirkstoff ist eine Einkapselungseffizienz von bis zu 99% zu erreichen. Die hochmolekularen Modellwirkstoffe Rinderserumalbumin und Dextran erreichen eine Effizienz von bis zu 89% bzw. 98%. Der Zusatz von Salzen in der wässrigen Phase verschlechtert die Einkapselungseffizienz. Ebenso führen unterschiedliche osmotische Bedingungen innerhalb und außerhalb des Liposoms zu einem höheren Verlust der Markersubstanzen. Analog zur Herstellung von Nanoemulsionen zeigt sich, dass auch bei der Einkapselung

Fluorocarbone mit einer geringeren Dichte weniger effizient Wirkstoffe einschließen. Die höchsten Einkapselungseffizienzen lassen sich mit einer Phospholipidkonzentration zwischen 150 mM und 300 mM erzielen, während die Zugabe von Cholesterin als natürlicher Membranbestandteil eine Verschlechterung hinsichtlich der Einkapselungseffizienz bewirkt.

Mit Perfluoroperhydrophenanthren als hydrophobem Phasenanteil gelingt die Herstellung stabiler Wasser-in-Fluorocarbon Nanoemulsionen. Der verfahrenstechnische Zentrifugationsprozess erlaubt die Produktion von Liposomen mit hohem Einkapselungsvermögen für verschiedene Wirkstoffe.

Summary

The delivery of active ingredients without premature degradation in the body is a challenge in some pharmaceutical applications. Studies of various transport systems such as liposomes are addressing this issue. Liposomes are spherical vesicles composed of a phospholipid bilayer and are part of natural membranes. The present work deals with the development and analysis of a new manufacturing process of liposomes from water-in-fluorocarbon nanoemulsions for pharmaceutical applications. The new process does not require the use of organic solvents, eliminating the need for time-consuming removal. The work focuses on three key aspects that make up the essential part of the process: The selection of the appropriate material system, their characterization with suitable analytical methods, and the production and encapsulation efficiency of liposomes.

The first focus is on the tensiometric interaction between the aqueous and hydrophobic phases. The hydrophobic phase used is the perfluorocarbon perfluoroperhydrophenanthrene, which is becoming increasingly important for pharmaceutical applications due to its inert properties. At the interface between the perfluorocarbon and the aqueous phase, various phospholipids accumulate in a diffusion-controlled manner and serve as building blocks for the bilayer formation of liposomes during the transfer.

Determining the interfacial tension between the two phases is challenging because high density differences and nearly identical refractive indices make it impossible to use visual methods such as drop profile analysis. In contrast to the time-consuming, non-invasive spinning drop tensiometry, the invasive Du Noüy ring method provides more efficient reproducible results.

The analysis of the interfaces between different phospholipid suspensions and the hydrophobic phase shows that the time to reach the equilibrium interfacial tension increases with increasing fatty acid chain lengths. This also holds for approaching the minimum interfacial tension. The

temperature regime has a strong influence on the adsorption process: above the transition temperature of the respective phospholipids, the adsorption at the interface accelerates and differences between the chain lengths of phospholipids can no longer be detected.

In the second section, the preparation of the nanoemulsions is carried out via ultrasonic emulsification followed by droplet size analysis. Similar refractive indices between hydrophobic and hydrophilic phases complicate the measurement of nanoemulsion droplets by dynamic light scattering. Due to the occurrence of gas bubbles within the system, the number mean diameter is preferred as a comparative quantity immediately after preparation. Long-term analyses show that independent of the used phospholipid, a long-term stability of several weeks can be achieved at a size < 200 nm. The results with perfluoroperhydrophenanthrene and the comparison with other fluorocarbons show that the properties of the stabilizer are less important than the properties of the fluorocarbon itself. A lower density of the hydrophobic phase leads to larger droplets and increased polydispersity of the nanoemulsions.

Since the investigated nanoemulsions have the desired droplet size, transfer to liposome production is subsequently possible. The transfer results in liposomes with an average size of about 60 nm, which are measured by both dynamic light scattering and small-angle X-ray scattering. Fluorescein sodium, bovine serum albumin and fluorescently labeled dextran were used as model agents. UV-Vis spectroscopy was used as a detection method for their encapsulation efficiencies. Using ultrapure water as the hydrophilic phase and fluorescein sodium as the low molecular weight drug, an encapsulation efficiency of up to 99% can be achieved. The high molecular weight model drugs bovine serum albumin and dextran achieve efficiencies of up to 89% and 98%, respectively. The addition of salts in the aqueous phase worsens the encapsulation efficiency. Similarly, different osmotic conditions inside and outside the liposome lead to a higher loss of the marker substances. Encapsulation experiments also confirm the observation that fluorocarbons with a lower density entrap a lower amount of the drug. The highest encapsulation efficiencies can be obtained with a phospholipid concentration between 150 mM and 300 mM, while the addition of cholesterol as a natural membrane component causes deterioration regarding the encapsulation efficiency.

With perfluoroperhydrophenanthrene as the hydrophobic phase component, it is possible to produce stable water-in-fluorocarbon nanoemulsions. The centrifugation process leads to liposomes with high encapsulation capacity for various active ingredients.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	4
2	Theoretische Grundlagen	7
2.1	Grundlagen der Grenzflächen und kolloidalen Systeme.....	7
2.1.1	Oberflächen- und Grenzflächenspannung im fluiden System	8
2.1.2	Zwischenmolekulare Kräfte.....	9
2.2	Tenside	10
2.2.1	Aufbau und Funktion	10
2.2.2	Phospholipide in ihrer Funktion als Tensid	11
2.3	Emulsionen.....	13
2.3.1	Arten von Emulsionen	13
2.3.2	Herstellung von Emulsionen.....	14
2.3.3	Instabilitätsmechanismen.....	15
2.4	Liposomen.....	17
2.4.1	Aufbau	17
2.4.2	Pharmazeutische Anwendung.....	18
3	Materialien und experimentelle Methoden	21
3.1	Materialien	21
3.1.1	Phospholipide	21
3.1.2	Perfluorocarbone.....	22
3.1.3	Puffersystem	22
3.2	Herstellungsmethoden.....	23

3.2.1	Vorbereitung von Lipid-Suspensionen	23
3.2.2	Herstellung von Nanoemulsionen	26
3.3	Analytische Messmethoden.....	27
3.3.1	Dynamische Lichtstreuung.....	27
3.3.2	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	30
3.3.3	UV-Vis Spektroskopie	31
3.3.4	Phosphat-Assay nach Fiske.....	32
4	Tensiometrie zwischen Phospholipid-Suspensionen und Fluorocarbon-Phase	33
4.1	Stand der Technik und Zielsetzung	33
4.2	Angewandte Methoden zur Messung von Grenzflächenspannungen	36
4.2.1	Ring-Tensiometrie nach Du Noüy	36
4.2.1.1	Equilibrierung von DPPC	39
4.2.1.2	Einfluss des Ringes auf die Grenzflächenspannung	40
4.2.2	Spinning Drop Tensiometer	42
4.2.3	Vergleich beider Methoden.....	45
4.3	Einfluss der Phospholipid-Kettenlänge	49
4.4	Temperatureinfluss auf die Grenzflächenspannung	54
4.5	Konzentrations- und zeitabhängige Berechnung der Fläche pro Molekül	59
4.6	Schlussfolgerungen	63
5	Charakterisierung von Fluorocarbon-Emulsionen	65
5.1	Stand der Technik und Zielsetzung	65
5.2	Kurzzeitstabilität von Nanoemulsionen	68
5.3	Messtechnische Herausforderung.....	70
5.4	Einfluss von Kettenlänge und Konzentration.....	72
5.5	Untersuchung verschiedener Fluorocarbone	74
5.6	Schlussfolgerungen	76
6	Liposomenherstellung mittels Zentrifugation und deren Einkapselungseffizienz	79
6.1	Stand der Technik und Zielsetzung	79
6.2	Beschreibung des Herstellungsprozesses	82
6.3	Charakterisierung der Liposomen	84
6.3.1	Einfluss der Konzentration.....	85

6.3.2	Einfluss der Kettenlänge.....	88
6.3.3	Langzeitstabilität von DPPC-stabilisierten Liposomen.....	90
6.4	Auswahl der Nachweismethoden zur Einkapselung.....	91
6.4.1	Einkapselungseffizienz.....	94
6.4.2	Wiederfindungsrate.....	95
6.4.3	Positivnachweis der Einkapselung.....	98
6.5	Einkapselung verschiedener Modellwirkstoffe.....	99
6.5.1	Fluoreszein-Natrium.....	99
6.5.1.1	Einfluss verschiedener Fluorocarbone.....	99
6.5.1.2	Einfluss verschiedener Phospholipide und Zugabe von Cholesterin	100
6.5.2	Einkapselung von Rinderserumalbumin unter Anwendung osmotischer Bedingungen	103
6.5.3	Einkapselung von FITC-D unter Anwendung osmotischer Bedingungen ...	105
6.6	Theoretische Betrachtung des Transfers.....	106
6.7	Schlussfolgerungen.....	109
7	Schlussfolgerungen und Ausblick für zukünftige Arbeiten	113
7.1	Schlussfolgerungen.....	113
7.2	Ausblick.....	116
	Anhang	119
	Abkürzungsverzeichnis	133
	Symbolverzeichnis	135
	Literaturverzeichnis	139

Kapitel 1

Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Im Jahr 2020 sind mehr als 19 Millionen Menschen weltweit neu an Krebs erkrankt, im gleichen Jahr sind fast 10 Millionen Menschen an Krebs gestorben [1]. Bis heute bleibt Krebs eine der schwerwiegendsten Erkrankungen, auch wenn die Sterblichkeit aufgrund der stetigen Verringerung des Rauchens und der Fortschritte bei der Früherkennung und Behandlung von Patienten insgesamt gesunken ist [2]. Die Zahl der Todesfälle ist jedoch für einige Krebsarten von 2012 bis 2016 gestiegen, wie z.B. bei Krebserkrankungen der Leber, der Bauchspeicheldrüse, der Gebärmutter, des Gehirns und des Nervensystems, sodass besonders im Bereich der spezifischen Therapie weiterhin großes Forschungsinteresse besteht [3]. Gängige Methoden zur Behandlung in der Krebstherapie, wie z.B. der Einsatz von chemotherapeutischen Substanzen, wirken nicht spezifisch auf Krebszellen alleine, sondern beeinträchtigen auch gesunde Zellen und schaden dem Patienten in hohem Maße. Die Forschung arbeitet daher stetig daran, die Therapiemaßnahmen zu verbessern.

Eine Möglichkeit, die unnötige Schädigung des menschlichen Körpers zu verhindern, ist die spezifische Ausrichtung auf den Tumor. Dies ist beispielsweise durch die Verwendung von protein-behafteten Antikörpern realisierbar und Bestandteil der aktuellen Forschung [4]. Statt sich im gesamten Körper zu verteilen und anzureichern, haften die Antikörper spezifisch an der Tumorzelle und setzen dort den Wirkstoff frei. Diese Ansätze stehen jedoch vor dem Problem des vorzeitigen Abbaus der Antikörper und Proteine während des Transports zur Tumorzelle. Die

körpereigene Abwehr erkennt die Antikörper, die das Wirkprotein tragen, als Eindringling. Bevor genügend Wirkstoff die Tumorzelle erreicht, ist ein Großteil bereits abgebaut und steht für die Zerstörung der Zielzelle nicht mehr zur Verfügung.

Ein anderer Ansatz ist die Einkapselung von pharmazeutischen Wirkstoffen in Liposomen [5]. Liposomen sind kugelförmige Bläschen, auch Vesikel genannt, mit einem wässrigen Kern, bestehend aus zwei Schichten an Fettmolekülen, der sogenannten Doppelmembran. Enthält der wässrige Kern einen pharmazeutischen Wirkstoff, kann dieser in den Liposomen durch den Körper transportiert werden. Die Fettmoleküle, aus denen die Liposomen bestehen, besitzen einen fett- und einen wasserliebenden Anteil und sind damit amphiphil. Vertreter der Fettmoleküle können z.B. Phospholipide sein. Phospholipide sind, wie auch andere Lipide, Bestandteil von allen Organismen und bilden als Membran die Barrieren zwischen verschiedenen Zellkompartimenten. Aufgrund ihres natürlichen Vorkommens auch in menschlichen Membranen, erkennt das Immunsystem die Phospholipide nicht als körperfremd an. Das Liposom ist sozusagen ein trojanisches Pferd. Da Phospholipide als absolut unbedenklich gelten und amphiphil sind, werden sie außerdem häufig als natürliche Emulgatoren in der Lebensmittelindustrie eingesetzt [6]. Wenn Phospholipide als Emulgatoren oder Bausteine für Liposomen verwendet werden, tragen sie aufgrund ihrer eigenen Charakteristiken ebenfalls zu den Eigenschaften des Transportsystems bei. Die Amphiphilie und ihr natürliches Vorkommen in allen biologischen Membranen ermöglichen es damit, einen Wirkstoff im Inneren zu tragen, während der Transport durch den Blutkreislauf möglich ist, ohne eine unmittelbare Immunreaktion zu provozieren [6].

An dieser Stelle knüpft die vorliegende Arbeit an. Ziel ist es, einen Herstellungsprozess für Liposomen zu erarbeiten und zu optimieren, wodurch letztendlich eine pharmazeutische Anwendung möglich werden soll. Herausfordernd ist dabei nicht nur die sehr kleine Größe der Liposomen, sodass der Transport durch die Blutbahnen möglich ist, sondern auch deren Einkapselungseffizienz. Das Liposom sollte einen möglichst hohen Anteil an Wirkstoff einkapseln und gleichzeitig kaum Wirkstoff ungenutzt außen vorlassen. Konventionell erfolgt die Herstellung von Liposomen über das Verdampfen von organischen Lösungsmitteln wie Methanol. Die Zugabe der wässrigen Phase im Anschluss enthält den Wirkstoff und bewirkt das Aufschwellen und Zusammenlagern der Phospholipide zu kugelförmigen Vesikeln. Die Einkapselung ist jedoch nicht zielgerichtet. Obwohl Herstellungsmethoden für Liposomen bereits seit mehr als 30 Jahren Gegenstand von intensiver Forschung sind [7], erreicht die Einkapselungseffizienz dieser Methoden vor allem für

hochmolekulare Wirkstoffe nach wie vor nicht mehr als 50% [8,9]. Die Anforderungen an den Prozess beinhalten außerdem, dass die Nutzung organischer Lösungsmittel auszuschließen ist, denn diese bedürfen einer kaum zu realisierenden vollständigen und kostenintensiven Entfernung. Um die Liposomenherstellung effizient gestalten zu können, ist der Prozess in seine einzelnen Bestandteile zu zerlegen – die Charakteristiken der einzelnen Komponenten sind genauso entscheidend wie deren Zusammenspiel. Daher erfolgt in einem ersten Schritt die Untersuchung der grenzflächenspezifischen Eigenschaften des ausgewählten Stoffsystems, bevor aus den Einzelkomponenten Wasser-in-Fluorocarbon (W/FC) Nanoemulsionen herzustellen sind. Mittels Zentrifugation entstehen daraus Liposomen, welche in Bezug auf ihre Größe und Einkapselungseffizienz der verwendeten Modellwirkstoffe zu analysieren sind. Ziel des Prozesses ist es, eine möglichst komplette Einkapselung zu erreichen.

1.2 Zielsetzung

Diese Arbeit verfolgt das Ziel, Liposomen aus Wasser-in-Öl Nanoemulsionen (W/O) im Zentrifugalfeld für die pharmazeutische Anwendung herzustellen. Dabei ist nicht nur die Effizienz des Prozesses entscheidend, sondern auch die Auswahl der Stoffkomponenten. Das hier ausgewählte Stoffsystem für die Emulsionsherstellung besteht aus einer Phospholipid-Suspension als hydrophile Phase und einem Perfluorocarbon als hydrophobe Phase. Der Grund für die Auswahl des Perfluorocarbons liegt in seinen Eigenschaften. Die üblich verwendeten Öle zeigen eine hohe Mischbarkeit mit Phospholipiden und begünstigen daher die Bildung von Gelphasen an Grenzflächen [10,11], welches für den gewünschten Phasentransfer hinderlich wäre. Darüber hinaus sind Emulsionen aus natürlichen Ölen weniger stabil und ungesättigte Öle neigen zur schnellen Oxidation [12]. Fluorocarbone haben sich als gut für die Verwendung von pharmazeutischen Emulsionen erwiesen. Die meisten Fluorocarbone sind inert, sehr stabil, biokompatibel und eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Ölen [13–15]. Die Anwendung von Fluorocarbon- und Perfluorocarbon-Nanoemulsionen hat entsprechend in den letzten Jahren zugenommen. Sie finden beispielsweise Anwendung in der Magnetresonanztomographie (MRT) als Kontrastmittel (^{19}F) [16]. Zhang et al. [17] nutzten Fluoroamphiphile für eine effizientere Proteinverabreichung. Darüber hinaus ermöglichen flüchtige Fluorocarbone aufgrund der niedrigen Verdampfungstemperatur eine getriggerte Freisetzung von Wirkstoffen [18]. Diese Eigenschaften machen Perfluorocarbone zu einer interessanten Öl-Alternative. Das Verständnis und die Charakterisierung von Fluorocarbonen, insbesondere in Kombination mit Phospholipiden, bedürfen jedoch noch ausführlicher Untersuchungen, sodass sich folgende Teilaspekte für das Ziel dieser Arbeit ergeben:

- (1) *Verständnis des Adsorptionsverhaltens von Phospholipiden an Fluorocarbon-Grenzflächen*
Phospholipide sind grenzflächenaktive Substanzen, die wie Tenside wirken und daher die Grenzflächenspannung beeinflussen. Mit einer zentrifugalen Herstellung von Liposomen aus einer W/O Nanoemulsion sind sowohl die Grenzfläche als auch das Verhalten der Phospholipide entscheidend. Zum einen stabilisieren die Phospholipide die Emulsionströpfchen, zum anderen wandern die Emulsionströpfchen durch eine mit Phospholipiden beladene Grenzfläche während der Zentrifugation. Das Adsorptionsverhalten der Phospholipide zwischen einer Fluorocarbon- und Wasserphase ist also nötig für die weitere Prozessentwicklung.

In einem ersten Schritt ist daher die Auswahl einer adäquaten Messmethode für das Fluorocarbon-System notwendig. Fluorocarbone sind aufgrund ihrer hohen Dichte, welche deutlich oberhalb der Dichte von Wasser liegt, nicht zwangsläufig mit jeder beliebigen tensiometrischen Methode zu analysieren, sodass hier eine passende Auswahl zu erfolgen hat. Der Du Noüy-Ring steht daher im Fokus dieser Arbeit, weshalb dessen Potential im Vergleich zu herkömmlichen Methoden herauszuarbeiten ist.

Da auch die grenzflächenspezifischen Eigenschaften zwischen einem Fluorocarbon und einer Phospholipid-Suspension bisher nicht ausreichend erforscht sind, ist dieser Teilaspekt berücksichtigt. Phospholipide unterschiedlicher Kettenlänge sind auf ihr Adsorptionsverhalten an die Grenzfläche untersucht und geben Aufschluss darüber, wann die kritische Mizellbildungskonzentration erreicht ist. Aus dem Adsorptionsverhalten ist außerdem die Berechnung der Fläche pro Phospholipid-Molekül möglich. Diese Informationen dienen der passenden Einstellung der Wasser-in-Fluorocarbon (W/FC) Nanoemulsionen. Als letzter Aspekt ist die Temperatur zu betrachten, denn diese beeinflusst die Struktur der Phospholipide und damit das Adsorptionsverhalten.

(2) *Stabilitätsanalyse von W/FC Nanoemulsionen für die spätere Liposomenherstellung*

Mithilfe der Fläche pro Molekül aus den tensiometrischen Untersuchungen ist die entsprechende Konzentration an Phospholipiden für die Stabilisierung der W/FC Nanoemulsionen zu bestimmen. Fluorocarbon-in-Wasser (FC/W) Emulsionen finden bereits erste Anwendungen, der umgekehrte Fall ist jedoch in Bezug auf Stabilität und Tropfengröße noch nicht ausreichend untersucht. Besonders die Anwendung natürlicher Tenside, wie die hier verwendeten Phospholipide, bedürfen genauerer Analysen. Entscheidend für den weiteren Prozess ist zum einen die Größe der Emulsionströpfchen – diese darf eine bestimmte Größe nicht überschreiten, sodass auch die hergestellten Liposomen ausreichend klein für den Transport durch die Blutbahn sind –, zum anderen sollen die Nanoemulsionen stabil sein. Damit ist der nachgeschaltete Schritt der Liposomenherstellung möglich.

Wie bereits bei den tensiometrischen Untersuchungen der Fluorocarbon-Grenzfläche sind auch die Fluorocarbon-Nanoemulsionen zu analysieren. Es stellt sich die Frage, welche Messmethode sich für die Bestimmung der Tropfengröße eignen und welche Schwierigkeiten in Bezug auf das Stoffsystem unter Umständen auftreten können. Die Stabilität der Nano-

emulsionen ist anhand von Phospholipiden unterschiedlicher Kettenlängen sowie Konzentrationen zu untersuchen. Des Weiteren findet ein Vergleich unterschiedlicher Fluorocarbone zur Emulsionsherstellung statt.

(3) *Entwicklung des Herstellungsprozesses von Liposomen aus W/FC Nanoemulsionen sowie deren Einkapselungseffizienz*

Für die Herstellung der Liposomen aus den W/FC Nanoemulsionen sind die Erkenntnisse aus den tensiometrischen Untersuchungen und der Analyse der W/FC Nanoemulsionen zusammenzuführen. Der Herstellungsprozess ist ohne die Anwendung organischer Lösungsmittel, welche in jeglichen Vorbereitungsschritten unter Umständen vorkommen könnten, zu entwickeln. Die hergestellten Liposomen benötigen außerdem eine Größe < 200 nm, sodass für eine spätere pharmazeutische Anwendung der Transport durch die Blutbahn gewährleistet ist. Neben der notwendigen Größe ist außerdem die Einkapselungseffizienz entscheidend. Hier besteht besonderes Verbesserungspotential im Vergleich zu herkömmlichen Methoden, denn die Einkapselungseffizienz ist oft viel zu gering, sodass ein Großteil des Wirkstoffes außerhalb des Liposoms verbleibt und damit nicht nutzbar ist. Besonders für Makromoleküle oder sensitive Wirkstoffe ist bisher kein effizientes Verfahren etabliert, mit dem eine hohe Einkapselungseffizienz zu erreichen ist und gleichzeitig die Wirkstoffe nicht zu hohen Belastungen durch chemische Reagenzien ausgesetzt sind. In dieser Arbeit kommen daher sowohl der niedermolekulare Modellwirkstoff Fluoreszein-Natrium zum Einsatz als auch die Makromoleküle Rinderserumalbumin und Dextran. Um die Effizienz zu quantifizieren, ist außerdem eine Nachweismethode zu etablieren. Diese sollte die unterschiedlichen Komponenten, die im Prozess vorkommen, unterscheiden können und außerdem das Potential für die Skalierbarkeit sowie von Online-Messungen aufweisen.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Grenzflächen und kolloidalen Systeme

Die Grundlagen von Grenzflächen und kolloidalen Systemen sind in der Physik und in der Thermodynamik zu finden. Sowohl die Eigenschaften der Kolloide als auch die Grenzflächen zwischen allen Bestandteilen beeinflussen das Gesamtsystem. Die in Suspensionen vorliegenden Kolloide können fest oder flüssig sein und unterschiedliche Größenordnungen umfassen. Kolloide Systeme sind nach der heutigen Definition von Wolfgang Ostwald¹ Teilchen in der Größenordnung von 1 nm-500 nm, welche in einer homogenen Phase dispergiert sind [19]. Kolloide sind in unterschiedliche Arten unterteilt: Assoziationskolloide sind als Mizellen geformte kleine Tröpfchen, deren Struktur eine Hülle und ein Kern aufweist. Dispersionskolloide sind dagegen fein verteilte und in sich homogene Teilchen. Als dritte Form sind Molekülkolloide zu nennen, welche einzelne Makromoleküle wie beispielsweise Polymere darstellen.

Die Kolloide liegen in der dispersen Phase vor, welche wiederum mit den kolloidalen Teilchen in einem kontinuierlichem Medium dispergiert ist und aus mindestens einer weiteren Phase besteht. Die Phasen sind nicht miteinander mischbar, sodass eine Grenzfläche entsteht, welche je nach Zustand die Stabilität des gesamten Systems beeinflusst. Da die disperse Phase unterschiedliche Aggregatzustände einnehmen kann, ändert sich daher auch das System selbst. Ist z.B. die kontinuierliche Phase flüssig und die kolloidalen Teilchen gasförmig, ist von einem Schaum zu sprechen. Das umgekehrte System ist das Aerosol, während zwei feste Bestandteile eine feste

¹ Carl Wilhelm Wolfgang Ostwald (* 27. Mai 1883, † 22. November 1943), Biologe und Physikochemiker und einer der Begründer der Kolloidchemie.

Suspension bilden, in denen sich Adhäsion und Kohäsion als vorherrschende Kräfte ausbilden. Beispiele für kolloidale Systeme sind Farben oder Lacke mit einer flüssigen kontinuierlichen Phase und festen Teilchenphase, Rauch mit einer gasförmigen kontinuierlichen und festen dispersen Phase, auch Aerosol genannt, oder Milch mit zwei flüssigen Phasen, auch Emulsion genannt. In dieser Arbeit sind die disperse und kontinuierliche Phase wie bei der Milch jeweils flüssig, sodass eine Emulsion entsteht. Hier sind Grenzflächenspannungen zwischen den Phasen die vorherrschenden Kräfte [19,20].

2.1.1 Oberflächen- und Grenzflächenspannung im fluiden System

Für die Charakterisierung der Oberflächen- oder Grenzflächenspannungen in einem fluiden System ist die Betrachtung der Energie der vorliegenden Moleküle von Bedeutung. Entscheidend ist das Bestreben der Teilchen nach dem energetisch günstigsten Zustand. An der Oberfläche besitzen die Moleküle eine deutlich höhere Energie als im Inneren des Systems. Durch die Wechselwirkungen der Moleküle mit benachbarten Teilchen innerhalb der Phase ist eine bessere Absättigung der Valenzen möglich, sodass auch die Gesamtenergie niedriger ist. Im Zustand der niedrigsten Energie tendiert die disperse Phase zur geometrischen Bildung einer Kugel, die das niedrigste Oberflächen- zu Volumenverhältnis aufweist.

An der Phasengrenze zwischen zwei Fluiden herrscht ein höherer Energiezustand, gleichzeitig ist die Größe der Phasengrenze abhängig von den vorliegenden geometrischen Abmessungen. Die Phasengrenze ist demnach auch keine planare Fläche, sondern bildet einen dreidimensionalen Raum ab. Während jede Phase für sich isotrop ist, besteht die Phasengrenze selbst aus einem kontinuierlichen Übergang der Eigenschaften beider einzelnen Phasen (vgl. Abbildung 2.1). Zwischen der Phasengrenze und den Phasen 1 und 2 liegt die als Spannungsfläche definierte Grenze, an der eine sprunghafte Änderung der Eigenschaften auftritt. Ist diese Oberfläche bei konstanter Temperatur und Volumen zu vergrößern, ist die reversible Arbeit W_{rev} zu verrichten. Daraus ergibt sich außerdem die Definition der spezifischen freien Grenzflächenenergie σ :

$$-dW_{rev} = \sigma dA, \quad (2.1)$$

wobei die Änderung der reversiblen Arbeit mathematisch der Änderung der freien Energie dW entspricht und dA die Änderung der Oberfläche darstellt. Die Grenzflächenenergie ist damit die reversible Arbeit, die für die Vergrößerung der Oberfläche notwendig ist [19].

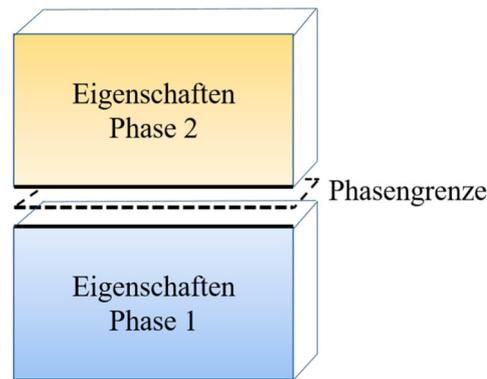


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Phasengrenze, welche sich zwischen zwei fluiden Phasen 1 und 2 ausbildet. Die Phasengrenze ist dabei keine planare Fläche, sondern dreidimensional. Die Eigenschaften der Phasengrenze hängen von den Eigenschaften der Phasen 1 und 2 ab und ändern sich kontinuierlich, dargestellt durch den Farbverlauf. Die sprunghafte Änderung der Eigenschaften tritt an der Phasengrenze auf. Nach [19].

2.1.2 Zwischenmolekulare Kräfte

Kolloide in der dispersen Phase sind, wie die einzelnen Phasen für sich, isotrop. Dies bezieht sich nicht nur auf die Eigenschaften, sondern auch auf die Kräfte, welche auf die einzelnen Teilchen wirken. In der kontinuierlichen Phase selbst wirken von jeder Seite Kräfte auf die Kolloide ein (Abbildung 2.2 A), sodass sich die Kräfte zu Null addieren. Anders verhält es sich mit Kolloiden in einer Flüssigphase, welche beispielsweise an eine Gasphase grenzt. In diesem Fall sind die Kräfte aus der Gasphase zu vernachlässigen und lediglich die Kräfte aus der Flüssigphase wirken auf die Teilchen (Abbildung 2.2 B). Hier ist die Summe der Kräfte ungleich Null. Dies bedeutet, dass die Stabilität geringer und der energetische Zustand ungünstig ist. Um diese Teilchen an die Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase zu bringen, ist eine Kraftaufwendung nötig. Gleichzeitig ist das System bestrebt, seine Oberfläche zu minimieren, indem sich z.B. die Kugelform ausbildet, um damit einen energetisch günstigeren Zustand zu erreichen. Die Art der Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, spielen dabei ebenso eine Rolle wie im Fall einer zweiten Flüssigkeit die Eigenschaften ebendieser. Die Stärke der Wechselwirkungen bzw. die Kraft richtet sich, da sie ungleich Null ist, in eine Richtung aus und resultiert damit in der Grenzflächenspannung. Diese erlaubt damit eine Auskunft über das Gesamtsystem [21]. Voraussetzung ist, dass sich das System im Gleichgewicht befindet. In der Phasengrenze selbst sind die Wechselwirkungen in beiden Phasen zu be-

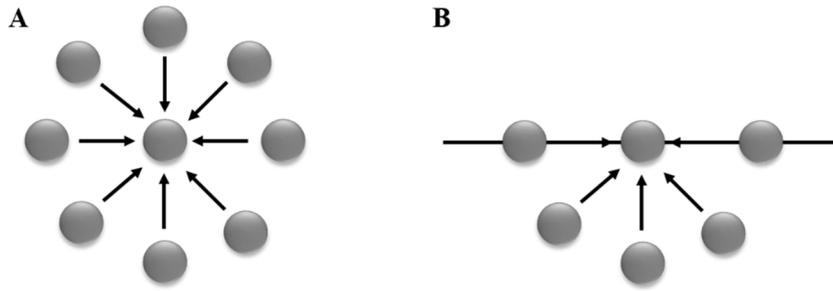


Abbildung 2.2: Kräfteeinwirkung der Teilchen untereinander bei vollständig umgebender Flüssigkeit (A) und an der Grenzfläche zur Gasphase (B). Nach [19].

rücksichtigen. Darüber hinaus sind die Verhältnisse der Teilchen zu umgebender Phase in der Volumen- und Grenzphase unterschiedlich, sodass sich folglich auch die Gibbs'sche² freie Enthalpie unterscheidet – jedoch nur in der Oberflächenenergie. Das bedeutet auch, dass je nach Menge der Teilchen in den vorliegenden zwei Flüssigkeitsphasen die Grenzflächenspannung variieren kann. Durch den Zusatz weiterer Stoffe besteht die Möglichkeit, die Grenzflächenspannung weiter herabzusetzen. Dies können beispielsweise Tenside sein [19,20].

2.2 Tenside

Tenside kommen in vielen Bereichen des täglichen Lebens vor, wie z.B. in Waschmittel oder kosmetischen Produkten sowie als Stabilisator in pharmazeutischen Emulsionen. Für das Verständnis von Grenzflächen spielen Tenside eine entscheidende Rolle. Im Folgenden sind diese in ihrem Aufbau, ihrer Funktion sowie am Beispiel von Phospholipiden genauer erläutert.

2.2.1 Aufbau und Funktion

Charakteristisch für Tenside ist die Amphiphilie: Durch den hydrophoben und hydrophilen Anteil kann das Tensidmolekül sowohl in einer wässrigen als auch in einer Öl-Phase als Stabilisator fungieren. Der hydrophobe Abschnitt ist in der Regel eine unpolare Kohlenwasserstoffkette, wohingegen der hydrophile Teil eine polare Kopfgruppe zeigt. Tenside sind anhand ihrer Ladungsstruktur in verschiedene Gruppen unterteilbar. Positiv bzw. negativ geladene Kopfgruppen gehören den Anion- bzw. Kationtensiden an. Eine sich ausgleichende Ladung ist als Amphotensid

² Josiah Willard Gibbs (* 11. Februar 1839; † 28. April 1903), US-amerikanischer Physiker.

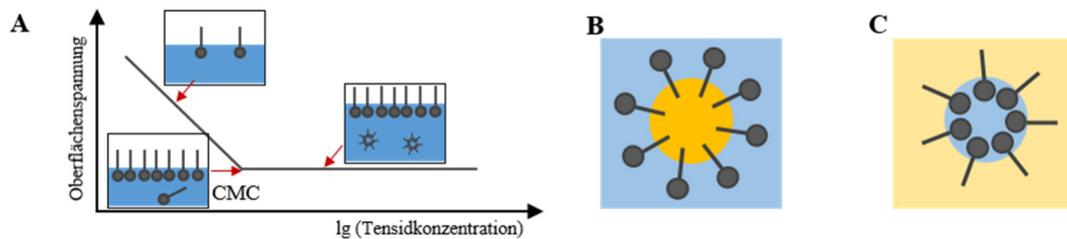


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Anlagerung von Tensiden an einer Wasser-Luft Grenzfläche (A). Sobald die Grenzfläche komplett mit Tensiden belegt ist, bilden sich in der kontinuierlichen Phase Mizellen aus. Der Zeitpunkt wird kritische Mizellbildungskonzentration genannt (CMC). (B) Darstellung einer Mizelle, bei der sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten nach Innen zur dispersen Phase richten, und (C) einer inversen Mizelle, bei der die hydrophilen Kopfgruppen nach Innen gerichtet sind. Die Kohlenwasserstoffketten ragen in die kontinuierliche Phase.

zu bezeichnen. Keinerlei Ladung besitzen Niotenside. In einem flüssigen System richten sich die amphiphilen Tenside entsprechend ihrer Hydrophilie aus und belegen die Grenzfläche zwischen den beiden nicht-mischbaren Phasen. Ist die Grenzfläche vollständig mit Tensiden belegt, bilden die übrigen Tenside Aggregate in der kontinuierlichen Phase aus, sogenannte Mizellen. Der Zeitpunkt der Aggregation ist demnach erst bei einer ausreichend hohen Anzahl an Tensiden erreicht und wird kritische Mizellkonzentration („critical micelle concentration“, CMC) genannt (Abbildung 2.3 A). Mizellkolloide sind thermodynamisch stabil und nehmen je nach Form des Tensids eine unterschiedliche Geometrie an. So bilden kegelförmige Tenside die bekannten Kugelmizellen aus, während keilförmige Tenside stäbchenartige Mizellen formen. Eine scheibenförmige Doppelschicht ist dagegen das Resultat von zylinderförmigen Tensiden. Die Bildung der Mizellen hängt auch vom eingesetzten Lösungsmittel ab. In einer hydrophilen Umgebung richten sich die Kohlenwasserstoffketten nach innen aus (Abbildung 2.3 B), während in hydrophoben Lösungsmitteln die Kohlenwasserstoffkette nach innen zeigt und die inverse Mizelle formt (Abbildung 2.3 C). Eine Sonderform von Tensiden sind Phospholipide [22–24].

2.2.2 Phospholipide in ihrer Funktion als Tensid

Phospholipide sind natürlich vorkommende Tenside, die zu den Lipiden gehören, jedoch aufgrund der vorkommenden Phosphatgruppe dieser Untergruppe zuzuordnen sind. Sie sind weiter in Sphingomyeline und Phosphoglyceride einzuteilen. In ersteren kommt das Sphingosin im Grundgerüst vor, welches eine Aminogruppe enthält. Letztere bestehen aus Glycerin im Grundgerüst. Wie synthetisch hergestellte Tenside sind sie amphiphil, wobei die zwei Fettsäureketten

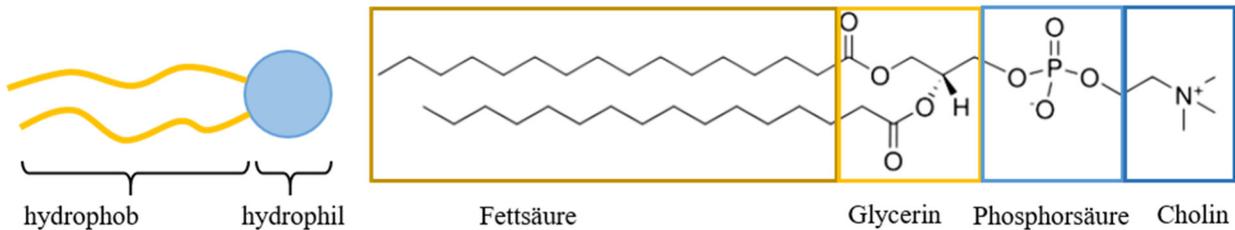


Abbildung 2.4: Schematische Abbildung des Aufbaus eines Lipids mit hydrophober Region und hydrophiler Kopfgruppe (links) sowie der Aufbau eines Phosphatidylcholins als Vertreter der Phosphoglyceride (rechts) mit denselben Regionen.

und das Glycerin der hydrophoben Region zuzuschreiben sind, während die Phosphorsäure und eine weitere Molekülgruppe, auch Rest X genannt, den hydrophilen Kopf bilden. Der Rest X, welcher mit der Phosphatgruppe verestert ist und aus unterschiedlichen Alkoholen besteht, bestimmt die Phospholipidklasse. In Abbildung 2.4 ist der Rest X beispielsweise ein Cholin, welche wiederum zu den Lecithinen gehören [25]. Phospholipide können ihren Ursprung sowohl in natürlichen Quellen haben, wie beispielsweise im Eigelb und Soja, als auch in der chemischen Synthese. Der Vorteil natürlicher Quellen sind geringere Kosten, allerdings nur so lange keine hohe Reinheit erforderlich ist. Da Phospholipide aus natürlichen Ressourcen verschiedene Arten von Lipiden enthalten können, ist eine Aufreinigung entsprechend teuer. Synthetisch hergestellte Phospholipide besitzen dagegen eine hohe Reinheit und definierte Eigenschaften, sind aber entsprechend teurer [6,26].

Phospholipide sind Bestandteil von menschlichen, tierischen und pflanzlichen Membranen. Sie trennen Zellkompartimente ab und können sich als Mizellen organisieren, um z.B. Cholesterin durch die Blutbahn zu transportieren oder auch die Aufnahme von lipophilen Substanzen für den Körper zu ermöglichen. Die Anordnung von Doppelmembranen findet hauptsächlich zwischen verschiedenen Zellkompartimenten statt. Die Dicke dieser Membran beträgt im Mittel etwa 4,5 nm und kann abhängig von den eingebauten Phospholipiden und Membranproteinen in der Größe variieren [24,27].

2.3 Emulsionen

Emulsionen sind der flüssig-flüssig Fall eines kolloidalen Systems, bestehend aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten, welche über den Eintrag externer Energie eine homogene Mischung bilden. Hinzugefügte Tenside erlauben eine verbesserte Stabilität für einen Zeitraum von mehreren Minuten bis hin zu einigen Jahren. Die Grenzflächenspannungen zwischen den vorliegenden Flüssigkeiten stellen die dominierenden Kräfte für die Wechselwirkungen in Emulsionen dar. Die Stabilisatoren minimieren den benötigten Energieaufwand zur Aufrechterhaltung der genannten Grenzflächen zwischen Tropfen und kontinuierlicher Phase. Je nach Zusammensetzung der verschiedenen Flüssigkeiten kann beispielsweise ein anderes Fließverhalten provoziert, die Konsistenz verschiedener Produkte verdünnt oder verfestigt werden. Nicht mischbare, flüssige Inhaltsstoffe sind mit Hilfe von Stabilisatoren beliebig kombinierbar. Diese verschiedenen Eigenschaften erlauben die unterschiedlichsten Anwendungen. So hat sich ein sehr breites Einsatzgebiet für Emulsionen entwickelt, wie beispielsweise in der Lebensmittel- und Pharmabranche, in der Kosmetikherstellung und in der Kunststoffindustrie als Schmiermittel. Für diese spezifischen Anwendungsgebiete ergeben sich unterschiedliche Herstellungsmethoden und Arten von Emulsionen. [28,29]

2.3.1 Arten von Emulsionen

Die Unterteilung von Emulsionen erfolgt zum einen nach der Größe der vorliegenden verteilten dispersen Phase als auch nach dem Aufbau von disperser und kontinuierlicher Phase. Tropfen mit einer Größe von 1 μm -1000 μm sind den Makroemulsionen zuzuordnen und weisen in der Regel eine milchig-weiße Farbe auf. Aufgrund der großen Tropfen und der oftmals breiten Tropfengrößenverteilung handelt es sich hier um thermodynamisch instabile Emulsionen [30]. Dem entgegengesetzt sind die Mikro- und Nanoemulsionen, deren Tropfengröße bei 10-200 nm liegt und daher im sichtbaren Licht transparent erscheinen. Sie können thermodynamisch stabil sein und sich je nach Beschaffenheit der zugrundeliegenden Flüssigkeiten und etwaiger Tenside spontan mischen, ohne das extra Energie einzubringen ist.

Die Kategorisierung der Emulsionen erfolgt aber nicht nur nach Größe, sondern auch nach ihrer Morphologie. Ist die kontinuierliche Phase wässrig und die disperse Phase aus Öl, ist von einer „direkten“, „wasser-basierten“ bzw. Öl-in-Wasser (O/W) Emulsion zu sprechen. Das Tensid ist

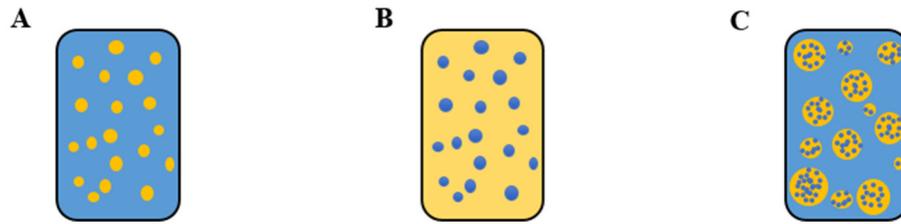


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Aufbaus verschiedener Emulsionen, wobei blaue Farbe jeweils die wässrige Phase (W) darstellt und gelb die Öl-Phase (O). Gezeigt sind eine O/W-Emulsion (A), eine inverse W/O-Emulsion (B) und eine W/O/W-Doppelemulsion (C).

in diesem Fall üblicherweise im Wasser löslich. Gegensätzlich dazu sind die sogenannten „inversen“, „öl-basierten“ bzw. Wasser-in-Öl (W/O) Emulsionen, in denen die kontinuierliche Phase das Öl darstellt und die disperse Phase aus Wasser besteht. Folglich ist auch das Tensid in der Regel in der Ölphase gelöst. Darüber hinaus sind Doppel-Emulsionen möglich, z.B. W/O/W- oder O/W/O-Emulsionen [31]. Eine schematische Darstellung der Emulsionen zeigt Abbildung 2.5. Die Analyse von Emulsionen kann über optische Methoden wie die Mikroskopie unter Anwendung verschiedener Kontraststoffe erfolgen. Für die deutlich kleineren Tropfen der Nanoemulsionen sind Methoden wie die dynamische Lichtstreuung (DLS), Röntgenstreuung, Cryo-Elektronen-Mikroskopie oder Rasterkraftmikroskopie geeignet [29].

2.3.2 Herstellung von Emulsionen

Zur Herstellung von Emulsionen ist meist der Eintrag von Energie erforderlich. Dieser ermöglicht die Tropfenbildung im zweiphasigen System und bewirkt eine Vergrößerung der Grenzfläche. Verschiedene Methoden stehen zur Verfügung, um Emulsionen herzustellen bzw. die Tropfengröße zu verkleinern und zu homogenisieren. Die gängigen Methoden sind dabei die Anwendung von Ultraschall und der Hochdruckhomogenisator, wobei die Emulgierung selbst in mehreren Schritten erfolgt. Zuerst ist eine Rohemulsion durch Vormischen herzustellen, in der die disperse und kontinuierliche Phase grob durchmischt sind und große Tropfen vorliegen. Hierfür kommt häufig der Rotor-Stator Mixer zum Einsatz. Zur Herstellung von kleineren Tropfengrößen ist eine weitere Dispergierung durch hohe Scherkräfte nötig [29,32].

Die Ultraschallsonotrode erzeugt diese Kräfte mittels Kavitation. Im Medium kommt es zu zeitlichen und örtlichen Druckschwankungen, dem Schwallwechseldruck. Dieser hängt vom Umgebungsdruck und dem erzeugten Druck durch die Amplitude ab. Unterhalb der Sonotroden spitze

entstehen kleine, mit Dampf gefüllte Luftblasen, welche aufgrund des Unterschieds zwischen innerem Blasendruck und Umgebungsdruck expandieren und letztendlich kollabieren. So kommt es zur Zerkleinerung der Blasen. Der Eintrag von Ultraschall ist dabei sowohl kontinuierlich über eine Durchflusszelle möglich als auch über einen Bypass, direkt über ein Ultraschallhorn oder mittels Ultraschallbad [33,34].

Eine weitere gängige Methode ist die Hochdruckhomogenisation. Der Zerkleinerungsmechanismus beruht auf dem Entspannen der Energie, welche über eine Hochdruckpumpe aufgebaut und über ein Ventil abgebaut wird. Die Geometrie der eingesetzten Düse ist maßgeblich an der Verweilzeitverteilung der Flüssigkeiten und der Größe der Tropfen beteiligt. Unabhängig von der Geometrie bewegen sich die Tropfen jedoch durch den Radialspalt nach dem Austreten aus der Düse in einen größeren Raum in Richtung des Ventilstempels, wodurch die Entspannung auftritt. Mögliche Düsen können z.B. die Flachdüse, die Zackensüde oder Messerkantendüse sein. Alle diese Düsenarten sind den Radialdiffusoren zuzuordnen. Bei Gegenstrahldispersatoren bewegen sich zwei oder mehr Strahlen aus gegenüberliegenden Ventilen aufeinander zu. Auch eine Lochblende kann hier zum Einsatz kommen. Für größere Durchsätze von bis zu 50 000 L/h ist der Hochdruckhomogenisator ideal [35].

Als letzte Emulgiermethode ist das Membranemulgieren zu nennen. Mittels Druckaufbau durchdringt die Rohemulsion die feinen Poren einer Membran, welche die größeren Tropfen in kleinere aufspaltet. Typischerweise liegt die entstehende Tropfengröße oberhalb des Porendurchmessers der verwendeten Membran. Die Wahl der Porengrößenverteilung hat in diesem Verfahren daher einen entscheidenden Einfluss auf die Tropfengrößenverteilung der Emulsion. Vorteilhaft ist der geringere Energieeintrag im Vergleich zum Ultraschallmulgieren und Hochdruckhomogenisieren und dadurch eine geringere Wärmebildung.

2.3.3 Instabilitätsmechanismen

Grundsätzlich spielen für eine stabile Nanoemulsion nicht nur die Herstellungsmethoden eine Rolle, sondern vor allem die Zusammensetzung und Eigenschaften der beiden flüssigen Phasen. So sollte die disperse Phase möglichst nicht in der kontinuierlichen Phase löslich sein, um eine zu schnelle Ostwald-Reifung zu verhindern [29]. Die Ostwald-Reifung beschreibt den selbstab-

laufenden Reifeprozess von Kolloiden von kleinen hin zu größeren Tropfen. Die kleineren Tropfen besitzen einen größeren Dampfdruck als größere Tropfen und versuchen diesen Unterschied in einem geschlossenen System, analog zu Konzentrationsunterschieden, auszugleichen. Die großen Tropfen nehmen folglich weiter an Größe zu und die Gesamtzahl der Kolloide verringert sich. Schreitet der Prozess so weit fort, dass sich alle Kolloide vereinigen, ist von einer Phasentrennung zu sprechen [36,37].

Die Koaleszenz ist der zweite Hauptmechanismus, durch den sich Emulsionen entmischen. Durch das aktive Aufeinandertreffen zweier Tropfen vereinigen sich diese zu Einem und können ebenfalls zu einer vollständigen Entmischung beider Phasen führen. Sowohl die thermische Bewegung, die Anzahl der Tropfen als auch die Viskosität des umgebenden, kontinuierlichen Mediums wirken sich auf die Stoßwahrscheinlichkeit aus [29,38].

Des Weiteren können Sedimentation, Aufrahmung oder Flockung auftreten. Hier ist die Dichtedifferenz der beiden Phasen von Bedeutung. Bei einer hohen Dichtedifferenz ist ein Auf- oder Absteigen der Tropfen wahrscheinlich. Bei der Flockung lagern sich die Tropfen zu Aggregaten zusammen, ohne wie bei der Koaleszenz oder Ostwald-Reifung miteinander zu verschmelzen. Diesen Prozessen geht in der Regel ein geringerer Energieeintrag voraus, sodass die Mechanismen reversibel sind. Bei Nanoemulsionen liegt der Hauptgrund der Instabilität bei der Koaleszenz und Ostwald-Reifung. Sedimentation oder Aufrahmung finden aufgrund der sehr kleinen Tropfengröße seltener statt [39].

Der Zusatz von Stabilisatoren wirkt allen Instabilitätsmechanismen entgegen. Dies können beispielsweise feste Partikeln sein, die sich um die Tropfen lagern, oder elektrische Ladungen. Die Ladung kann dabei sowohl von zugesetzten Stoffen als auch von den Ionen in beiden vorliegenden Phasen stammen. Auch eine hohe Viskosität der kontinuierlichen Phase hat einen stabilisierenden Effekt. Die Tropfenbeweglichkeit verringert sich, es entstehen weniger Kontaktmöglichkeiten zwischen den Tropfen und damit eine geringere Koaleszenz. Als letztes seien sterische Behinderungen durch Emulgatoren genannt. Die Verzweigungen von Kohlenwasserstoffresten von beispielsweise Phospholipiden, oder Polyethylenoxidgruppen schaffen in dem Fall eine räumliche Barriere zwischen den Phasen [30].

2.4 Liposomen

Liposomen sind kugelförmige Konstrukte aus Phospholipiden, auch Vesikel genannt, welche als Doppelmembran vorliegen oder aus mehreren Doppelschichten bestehen können und einen inneren, wässrigen Kern aufweisen. Liposomen ähneln von ihrer Struktur den biologischen Doppelmembranen in Zellen.

2.4.1 Aufbau

Liposomen erfüllen in erster Linie ähnliche Zwecke wie die Phospholipide, aus denen sie bestehen, und können sowohl hydrophile als auch hydrophobe Moleküle einkapseln. Hydrophile Moleküle liegen im Inneren, wässrigen Kern vor, während sich hydrophobe Stoffe innerhalb der Membran einkapseln lassen. Häufig ist das Medium innerhalb und außerhalb des Vesikels identisch. Die Größe der Vesikel als auch die Anzahl der Doppelschichten kann variieren und ist namensgebend für verschiedene Arten von Liposomen: Kleine Vesikel, die nur eine Doppelschicht enthalten, sind unilamellar (engl. „small unilamellar vesicles“, SUV) und weisen eine Größe zwischen 0,02 und 0,1 μm auf. Große Vesikel (engl. „large unilamellar vesicles“, LUV) liegen bereits zwischen 0,1 und 1 μm , während die sogenannten riesigen Liposomen (engl. „giant unilamellar vesicles“, GUV) auch größer als 1 μm sein können. Darüber hinaus ist die Anzahl der Doppelschichten Teil der Namensgebung. Neben den unilamellaren Vesikeln sind auch oligo- und multilamellare Doppelschichten möglich, sodass beispielsweise von großen multilamellaren Vesikeln („multi lamellar vesicle“, MLV) zu sprechen ist (vgl. Abbildung 2.6).. Kürzlich fand ebenfalls die Kategorisierung der Liposomen nach ihrer Funktion Einzug, z.B. nach Liganden-Zielprotein, Freisetzungsrate oder gezielter Freisetzung [40].

Der osmotische Druck kann als Faktor Einfluss auf die Form der Liposomen nehmen. In diesem Fall besteht ein Unterschied der gelösten Moleküle innerhalb des Vesikels und des umgebenden Mediums, sodass sich die Liposomen entweder zusammenziehen, ausdehnen oder in gänzlich andere Formen übergehen. Statt Kugeln formen sich Ellipsen oder auch lang gezogene, plättchenförmige Strukturen [41].

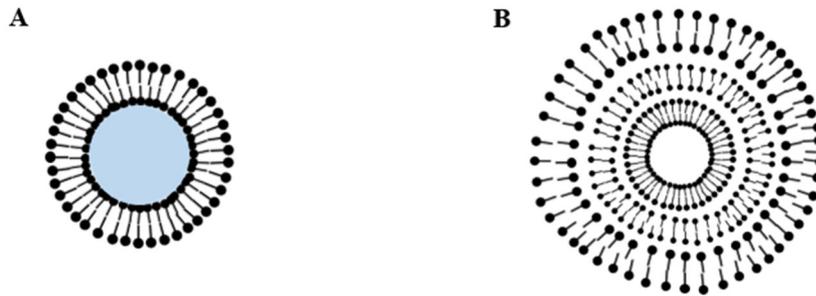


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines unilamellaren Vesikels, auch Liposom genannt, mit wässrigem Einschluss (A) und eines multilamellaren Vesikels, bestehend aus mehreren Doppelschichten (B).

Die in Abbildung 2.6 schematisch dargestellten Liposomen bestehen aus ein und demselben Phospholipid. Die innere und äußere Membran kann jedoch auch aus unterschiedlichen Phospholipiden bestehen und ähnelt somit den biologischen Membranen. In dem Fall ist von asymmetrischen Liposomen zu sprechen [42]. In dieser Arbeit sind lediglich uniforme Liposomen aus demselben Phospholipid Teil der Untersuchungen, die asymmetrischen Liposomen seien jedoch der Vollständigkeit halber genannt.

2.4.2 Pharmazeutische Anwendung

Während der letzten 35 Jahre sind Liposomen in den Fokus der biopharmazeutischen Forschung gelangt und finden große Anwendung als Träger von Wirkstoffen. Dies ist aufgrund der Amphiphilie möglich. Bereits Verwendung finden sie bei der Vakzination, in der medizinischen Diagnostik als Signalverstärker oder -träger, oder als Lösungsmittel für verschiedene Materialien. Vorteilhaft ist auch, dass sie geringere Immunantworten im Körper hervorrufen als herkömmliche Medikamente, da sie natürlicherweise Bestandteil von Zellmembranen sind. Besonders im Bereich der Krebstherapie ist diese Eigenschaft nützlich. Darüber hinaus eignen sich die Liposomen als Transporter für schwer lösliche Krebsmittel und verbessern damit deren Aufnahme. Ihre gute Bioverfügbarkeit macht sie zu wertvollen Alternativen, da sie den Wirkstoff über längere Zeit transportieren können, ohne dass ein vorzeitiger Abbau stattfindet.

Um die Verweilzeit im Körper weiter zu erhöhen, ist es möglich, spezifische Liganden an der Oberfläche der Liposomen anzubringen. Polyethylenglykol (PEG) verlängert beispielsweise die Zirkulationsdauer von Liposomen im Organismus. Gleichzeitig erhöhen Liganden wie Antikörper die Spezifität der Vesikel. Dies bedeutet, dass ein Liposom mit Antikörpern als Liganden aktiv zur Tumorzelle transportiert wird und spezifisch daran binden kann. Antikörper können

auch als Freisetzungsmechanismus für den Wirkstoff dienen, z.B. über Temperatur-sensitive Liposomen. Ab einer bestimmten Temperatur brechen die Wärme-sensitiven Liposomen auf und geben den Wirkstoff frei [43–45].

Die Herausforderungen bei der Nutzung von Liposomen als industriell hergestellter Wirkstofftransporter liegen damit sowohl in einem guten und verlässlichen Freisetzungsmechanismus als auch bei hohen Einkapselungseffizienzen, der engen Größenverteilung und ihrer Langzeitstabilität [46].

Kapitel 3

Materialien und experimentelle Methoden

3.1 Materialien

Eine genaue Auflistung aller Materialien, Chemikalien und Geräte ist dem Anhang A1 zu entnehmen. In den folgenden Abschnitten sei nur auf die wichtigsten Materialien und Methoden genauer eingegangen.

3.1.1 Phospholipide

In dieser Arbeit kamen verschiedene Phospholipide zum Einsatz, um deren Einflüsse auf die Grenzfläche zu dem ausgewählten Fluorocarbon und der Eignung zur Stabilisierung der Nanoemulsionen zu überprüfen. Der Fokus liegt auf der Verwendung von synthetischen Phospholipiden unterschiedlicher Fettsäurekettenlängen: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) mit einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen (Fettsäurekettenlänge zu Doppelbindungen-Verhältnis = 14:0), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, 16:0) und 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC, 18:0). Für einige Versuche wurde das Phospholipidgemisch aus Ei-Lecithinen, genannt E80, mit 80% Phosphatidylcholin, verwendet. E80 besteht aus einer Reihe von gesättigten und ungesättigten Phospholipiden mit unterschiedlichen Kettenlängen. Als letztes Phospholipid ist 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-glycerol-Natriumsalz (DPPG-Na) zu nennen, ein Phospholipid mit negativ geladener Kopfgruppe. Alle Phospholipide liegen als Pulver vor und sind von der Firma Lipoid (Ludwigshafen, Deutschland) zur

Verfügung gestellt. Im Anhang A2 Tabelle A 2.1 sind die verwendeten Lipide und ihr Molekulargewicht sowie die Übergangstemperatur aufgelistet.

3.1.2 Perfluorocarbone

Perfluorocarbone, im Folgenden nur noch Fluorocarbone genannt, sind inerte, Öl-ähnliche Stoffe, die keine Leitfähigkeit aufweisen, weder hydrophobe noch hydrophile Eigenschaften besitzen, biokompatibel sind und ein hohes Sauerstoff-Lösevermögen besitzen. Diese Eigenschaft beruht auf der einfachen physikalischen Auflösung des Sauerstoffes in der Flüssigkeit ohne weitere spezifische Wechselwirkungen mit den Fluorocarbon-Molekülen [18]. Aufgrund aller genannten Charakteristiken sind sie für eine Anwendung in der Pharmazie und Medizin interessant [13,15,18,47]. In der vorliegenden Arbeit fand hauptsächlich das Fluorocarbon Perfluoroperhydrophenanthren (PFPH) als hydrophobe Phase für die Emulsionsherstellung Verwendung. Das zyklische Molekül besteht lediglich aus Kohlenstoff- und Fluoratomen ($C_{14}F_{24}$). Weitere untersuchte Fluorocarbone waren das Perfluoromethyldecalin ($C_{11}F_{20}$), Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan (C_8F_{16}) und Perfluoroheptan (C_7F_{16}). Alle Fluorocarbone sind von der Firma F2 Chemicals (Preston, UK) bezogen. Für spezifische Eigenschaften wie Dichte, Viskosität und Brechungsindex sei auf die Tabelle A 2.2 im Anhang A2 verwiesen.

3.1.3 Puffersystem

Verschiedene Puffersysteme dienen als Suspensionsmittel für die Liposomen während der Versuche. Das überwiegend verwendete Puffersystem war ein Phosphatpuffer aus Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) und Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4). Das NaH_2PO_4 diene als Säure-, das Na_2HPO_4 als Basenanteil. Aus beiden Chemikalien war eine 1 M Lösung in ddH₂O herzustellen und in einem Verhältnis von 1:4,2 zu mischen. Angestrebt war ein pH-Wert von 7,4, der unter Umständen über den Säure- und Basenanteil entsprechend einzustellen war. Die Überprüfung erfolgte mittels pH-Sonde (WTW 3110, Xylem). Der 1 M Phosphatpuffer wurde, sofern nicht anders angegeben, auf 15 mM verdünnt und im Kühlschrank bei 4 °C für 3 Monate gelagert. Zur Untersuchung verschiedener osmotischer Bedingungen variierte die Ionenkonzentration des Puffers. Die Konzentrationen sind an den entsprechenden Stellen vermerkt.

Im Fall der Bestimmung des Phosphatgehalts einer Probe, um die Menge an vorhandenen Phospholipiden zu quantifizieren, ist die Verwendung von Phosphatpuffer nicht möglich. Die Menge an Phosphatmolekülen durch den Puffer würde das Ergebnis erheblich verfälschen, sodass unter diesem Aspekt Reinstwasser als Suspensionmittel einzusetzen war (ddH₂O, Arium Pro Reinstwasseranlage, Sartorius).

3.2 Herstellungsmethoden

3.2.1 Vorbereitung von Lipid-Suspensionen

Normalerweise sind Phospholipide in dem Medium zu lösen, zu dem eine höhere Affinität besteht. Bei den verwendeten Phospholipiden wäre die Löslichkeit in einem hydrophoben Medium bevorzugt. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Phospholipiden in PFPH (jenseits der Nachweisgrenze: $< 10^{-6}$ mM oder niedriger) waren diese jedoch in der wässrigen Phase zu suspendieren und stellten damit die disperse Phase dar.

Da für die Tensiometrie besonders gleichmäßige Stammlösungen notwendig sind, erfolgte die Vorbereitung der Phospholipid-Suspensionen für diese Zwecke über die sogenannte Filmmethode (Abbildung 3.1). Bei der Filmmethode erfolgt die Suspendierung nicht direkt in der Dispersphase, sondern zuerst in Ethanol oder einem Gemisch aus Chloroform und Methanol. Hintergrund ist die gute Löslichkeit der Phospholipide in den organischen Lösungsmitteln, sodass eine gleichmäßige Verteilung der Lipide, besonders bei Gemischen, stattfindet. Das organische Lösungsmittel verdampft im Rotationsverdampfer und die Phospholipide lagern sich wie ein Film an der Glaswand an. Die Rehydrierung des Films erfolgt mit der gewünschten Flüssigphase, sodass die Phospholipide aufquellen, sich von der Glaswand lösen und zu MLVs zusammenlagern.

In der vorliegenden Arbeit waren die Phospholipide in 99% Ethanol gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer (Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) getrocknet [48]. Die Rehydrierung erfolgte mit doppelt-destilliertem Wasser (ddH₂O, Arium Pro, Sartorius Göttingen, Germany). Zur weiteren Suspendierung der Phospholipide in der Stammsuspension ist nach der Herstellung mittels der Filmmethode die Durchmischung mit Ultraschall (100%-Zyklus und 10% (40 W) Output Control der nominalen Konverteramplitude mit der Sonotrode Digital Sonifier

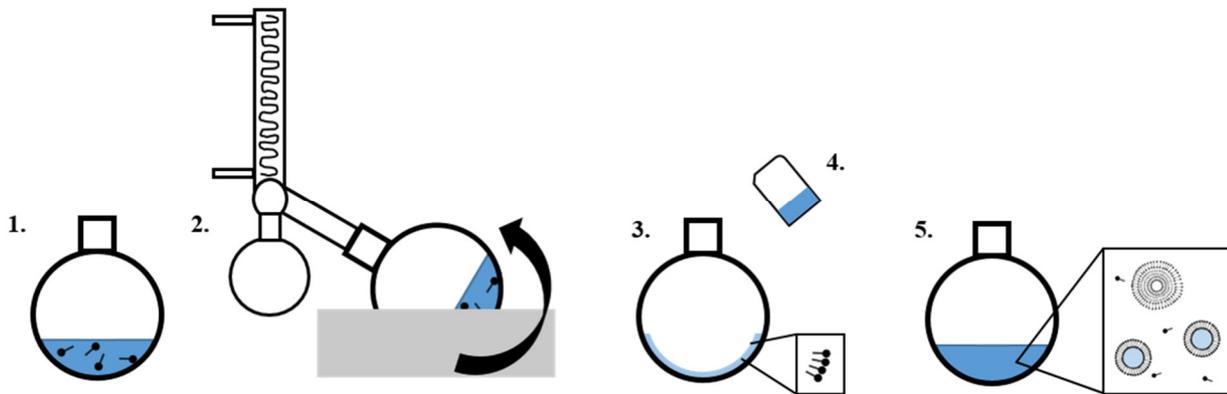


Abbildung 3.1: Schematische Zeichnung des Herstellungsvorgangs für die Phospholipid-Suspensionen mittels Film-methode. 1. Die Phospholipide sind in einem organischen, hydrophoben Lösungsmittel gelöst. 2. Über den Rotationsverdampfer verdunstet das Lösungsmittel. 3. Es bleibt ein dünner Film am Glasrand zurück, in dem die Phospholipide geordnet vorliegen. 4. Die Rehydrierung des Films erfolgt mit der hydrophilen Phase. 5. Die Phospholipid-Suspension enthält multilamellare Vesikel und Liposomen, welche über Ultraschall eine weitere Größenreduzierung und Homogenisierung erfahren, und anschließend als disperse Phase einsatzbereit sind. Nach [48].

450, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA, Gesamtnennleistung von 400 W) für 10 s notwendig, gefolgt von einem 50%-Beschallungszyklus und 10% Output Control für 10 min. Die Sonotrodenspitze weist einen Durchmesser von 3 mm auf. Ein Eisbad während der Beschallung kompensiert den Wärmeeintrag und hielt die Temperatur während der Vorbereitung bei 30°C. Die Denaturierung der Phospholipide ist aufgrund der Temperaturkontrolle und des geringen Energieeintrags zu vernachlässigen. Wie von Juliano et al. [49] in deren Experimenten beschrieben, liegt die Menge an Lipid-Radikalen während der Beschallung bei einer Beschallungsfrequenz von 20 kHz und voller Leistungseinstellung für 6 min unter 2 μ M. Da hier lediglich ein Zyklus von 50% und 10% der Nennleistung zugrunde liegt, ist eine Denaturierung auszuschließen.

Für eine besonders lange Stabilität und gleichmäßige Größenverteilung der Phospholipide kam außerdem der Extruder (LipexTM Extuder, Transferra Nanoscience, Burnbary, CA) mit 400 und 200 nm Ionen-geschossenen Treck-Etch Membranen (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) zum Einsatz (Abbildung 3.2). Die Suspension passierte die Membranen jeweils 20 Mal. Im Fall der temperaturabhängigen Tensiometrie betrug die Temperatur während der Extrusion jeweils 46°C (DPPC) bzw. 60°C (DSCP). Die finale Phospholipid-Konzentration nach Sonotrieren und Extrudieren war kolorimetrisch über den Nachweis des Phosphats nach Fiske zu bestimmen [50]. Für eine detaillierte Beschreibung sei an dieser Stelle auf den Abschnitt 3.3.4 sowie Anhang A4 verwiesen.

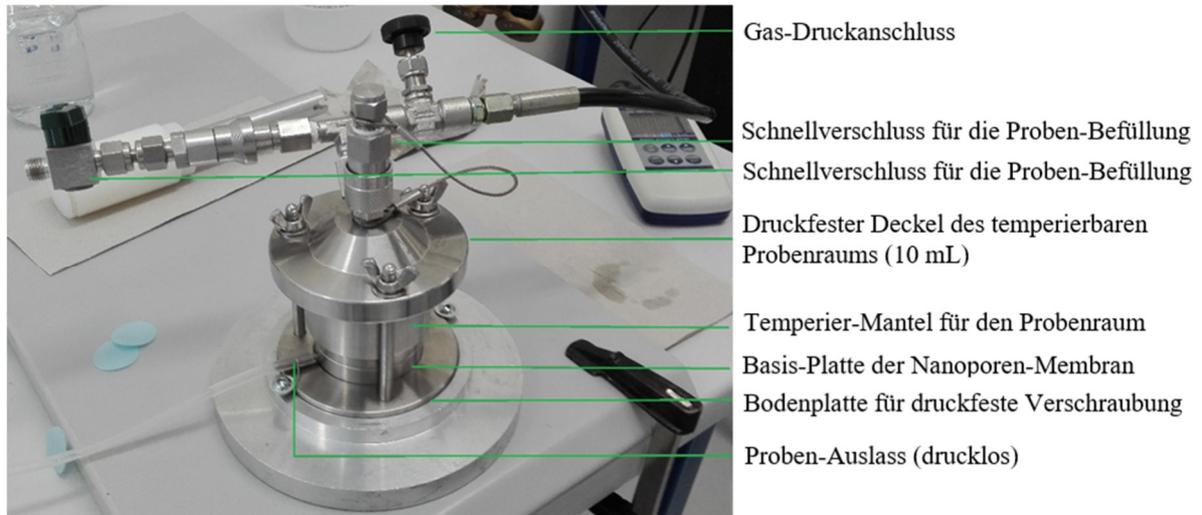


Abbildung 3.2: Aufbau des Extruders zur gleichmäßigen Herstellung kleiner Lipid-Vesikel bzw. homogen verteilte Stammsuspension für die Tensiometrie-Versuche.

Die Lagerung der Lipid-Suspensionen zwischen den Versuchen erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Vor Verwendung wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht. Der gemessene Brechungsindex der Phospholipid-Suspensionen beträgt 1,39.

Für die Emulsions- und Liposomen-Experimente wich die Herstellung der Lipid-Suspensionen von dem bereits beschriebenen Prozedere für die tensiometrischen Versuche ab. Sofern nicht anders angegeben, handelte es sich bei der Dispersphase um Phosphatpuffer (vgl. Abschnitt 3.1.3) statt des reinem ddH₂O mit einer Konzentration von 15 mM und einem eingestellten pH-Wert von 7,4. Die Konzentration der verwendeten Phospholipide in der Stammsuspension variierte je nach Versuchsaufbau von 20 bis 300 mM. Die benötigte Menge an Phospholipid war in ein 2 mL-Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) einzuwiegen und statt der aufwendigen Vorbereitung mittels Filmmethode direkt in 1 mL des entsprechenden Phosphatpuffers zu lösen. Auch die Extrusion fiel weg. Die gleiche Vorgehensweise war für die Experimente der Einkapselung durchzuführen. Hier ist zusätzlich der Farbstoff Fluoreszein-Natrium (FN) der Stammlösung in einer Konzentration von 10 g/L sowie Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“, BSA) mit 100 g/L und Fluoreszein-Isothiocyanat Dextran (FITC-D) mit 50 g/L hinzuzufügen, um die Einkapselungseffizienz der hergestellten Liposomen zu bestimmen.

3.2.2 Herstellung von Nanoemulsionen

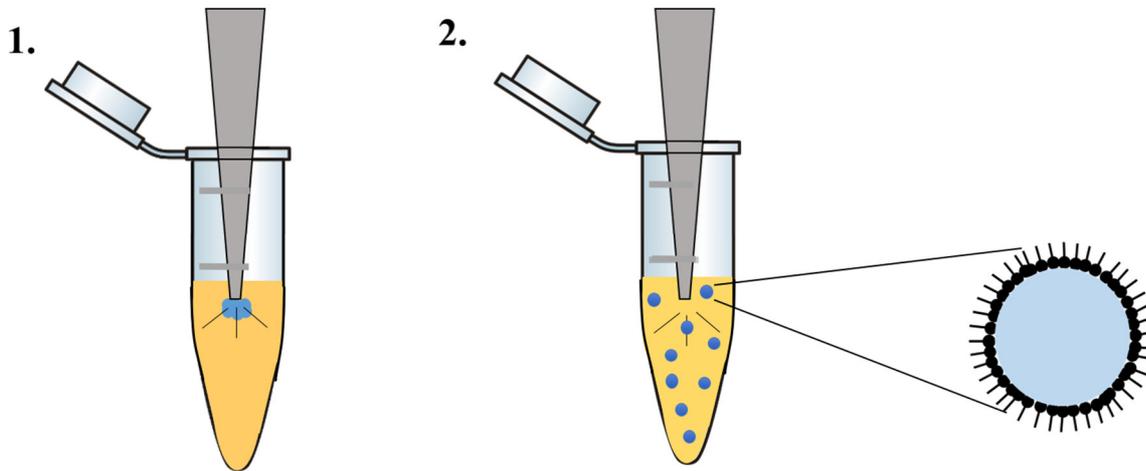


Abbildung 3.3: Schematische Zeichnung zur Herstellung von Nanoemulsionen mittels Ultraschall-Sonotrode. 1. Ein Tropfen der dispersen (wässrigen) Stammsuspension, welche die Phospholipide enthält, ist in der Mitte des 1 mL-Reaktionsgefäßes zu platzieren und 2. mit der Sonotrodenspitze zu emulgieren. Es entstehen inverse Mizellen.

Da Homogenisatoren in einem hohen Druckbereich und mit schnellen Massenströmen arbeiten, können die Phospholipide wegen der kurzen Verweilzeit nicht an der Grenzfläche zwischen der wässrigen Phase und dem Fluorkohlenstoff adsorbieren [51,52]. Aufgrunddessen ist die Ultraschall-Emulgierung wegen des kurzen Energieeintrags bei langer Verweilzeit zur Herstellung der Nanoemulsionen zu verwenden. Die W/FC Nanoemulsionen enthielten alle 1 vol.-% der dispersen wässrigen Phase. Aufgrund des niedrigen Dispersphasenanteils ändert sich auch die Viskosität der Nanoemulsion nur geringfügig. Mittels der Einsteins³ Gleichung [53] lässt sich die Viskositätsänderung bei geringen Volumenanteilen disperser Phasen nach

$$\eta_1 = (1 + 2,5 \cdot C) \cdot \eta_0 \quad (3.1)$$

berechnen. Im Fall der W/FC Nanoemulsion ergibt sich eine neue Viskosität η_1 von 29,1 mPa s statt der ursprünglichen Viskosität des reinen PFPH η_0 von 28,4 mPa s. Der Volumenanteil der

³ Albert Einstein (* 14 März 1879; † 18. April 1955), deutscher Physiker auf dem Gebiet der theoretischen Physik. Begründer der Relativitätstheorie.

dispersen Phase geht über die Variable $C = 0,01$ mit ein. Aufgrund der geringfügigen Änderung ist keine Änderung im rheologischen Verhalten zu erwarten.

Das Gesamtvolumen der Emulsion betrug insgesamt 1 mL mit PFPH als kontinuierliche Phase, die Herstellung ist schematisch in Abbildung 3.3 gezeigt. Ultraschall (Digital Sonifier 450, Branson) emulgierte die dispergierte Phase mit dem PFPH, die Herstellung erfolgte analog der Einstellungen zur Vorbereitung der Lipid-Suspensionen. Die Mindestkonzentration der Phospholipide, die zur Stabilisierung der Wassertröpfchen und zur Bildung einer Doppelschicht aus Phospholipiden im Überschuss notwendig sind, ist aus dem experimentellen Teil über die Tensiometrie bestimmt und im Anhang A3 beispielhaft berechnet. Die tatsächlich verwendeten Konzentrationen an Phospholipiden in der Stammsuspension sind in den jeweiligen Abschnitten adressiert.

3.3 Analytische Messmethoden

3.3.1 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS; Zetasizer nano ZSP, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) dient der Bestimmung der Tröpfchengröße der Nanoemulsionen und Liposomen. Der Messaufbau ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Das Messprinzip beruht auf der Bewegung der Tropfen oder Partikeln durch die Brownsche⁴ Molekularbewegung. Ein Laserstrahl trifft dazu auf die Messzelle. Je nach Intensität des gestreuten Lichts schwächt der Attenuator den Laserstrahl ab. Zwei unterschiedlich zur Probe angeordnete Detektoren messen die Bewegung des gestreuten Laserstrahls in Abhängigkeit der Intensitätsfluktuation und leiten das Signal zur digitalen Prozessierung weiter. Die Intensitätsfluktuation ist je nach Größe der gemessenen Teilchen unterschiedlich – je größer ein Teilchen, desto langsamer bewegt es sich. Kleine Partikeln fluktuieren dagegen sehr stark. Die aufgenommene Fluktuation der Intensität über einen gewissen Zeitraum ist in der Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ zusammengefasst [54] und in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt:

⁴ Robert Brown (* 21. Dezember 1773; † 10. Juni 1858), schottischer Arzt und Botaniker.

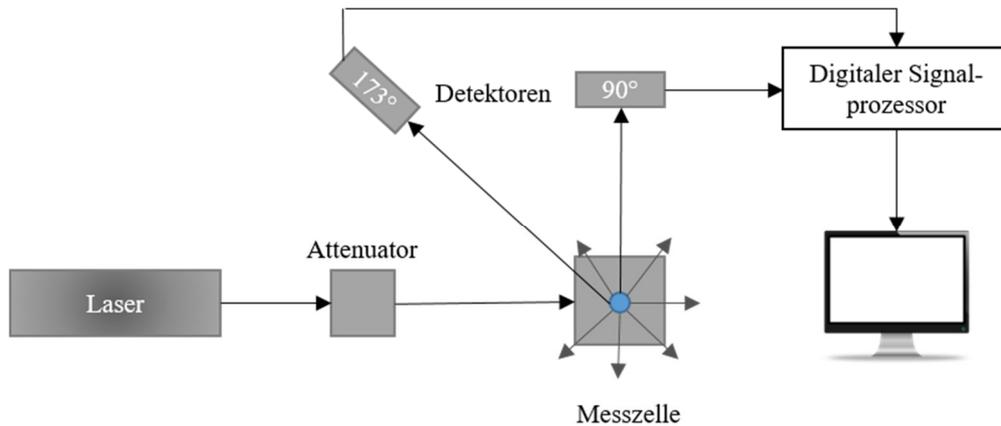


Abbildung 3.4: Messprinzip der dynamischen Lichtstreuung. Der Laserstrahl trifft auf den Attenuator und wird je nach Streuverhalten der Probe abgeschwächt, bevor er auf die Messzelle trifft. Das gestreute Licht wird von zwei verschiedenen Detektoren aufgenommen, das Signal digital prozessiert und an den Computer weitergegeben. Nach [55].

$$g(\tau) = A + \sum B e^{-2q^2 D \tau}, \quad (3.2)$$

wobei τ die Probenzeit des Korrelators darstellt, A die Basislinie und B die Amplitude der Autokorrelationsfunktion sind, q ist der Streuvektor und D der Diffusionskoeffizient. In die Formel des Streuvektors geht außerdem der Brechungsindex mit ein.

Die Autokorrelationsfunktion lässt verschiedene Auswertungsmethoden zu, um letztlich eine Partikelgröße zu erhalten. Die einfachste ist eine Kumulantenanalyse nach ISO13321. Dazu erfolgt an der Korrelationsfunktion ein Fit mit einem Polynom dritter Ordnung:

$$\ln(G) = a + b\tau + c\tau^2 + d\tau^3, \quad (3.3)$$

wobei $b\tau$ die erste, $c\tau^2$ die zweite und $d\tau^3$ die dritte Kumulante darstellen. Aus der Steigung b berechnet sich der Diffusionskoeffizient für den z-Average, welcher in den mittleren Tropfendurchmesser umgerechnet wird und üblicherweise als Vergleichswert angegeben ist. Dies ist besonders für monodisperse Proben der Fall. Die Abweichung des Fits zur Korrelationsfunktion wird als Polydispersitätsindex (PDI) bezeichnet. Ein PDI von 1 weist auf eine besonders polydisperse Probe hin, während ein $\text{PDI} < 0,3$ eine homogene Tropfengrößenverteilung beschreibt. Die Kumulantenanalyse ergibt lediglich einen einzelnen mittleren Tropfendurchmesser und ist ein intensitätsbasierter Mittelwert, da er aus dem Intensitätssignal resultiert. Der hydrodynamische Durchmesser r_h berechnet sich nach

$$r_h = \frac{k_b T}{6 \pi \eta D}, \quad (3.4)$$

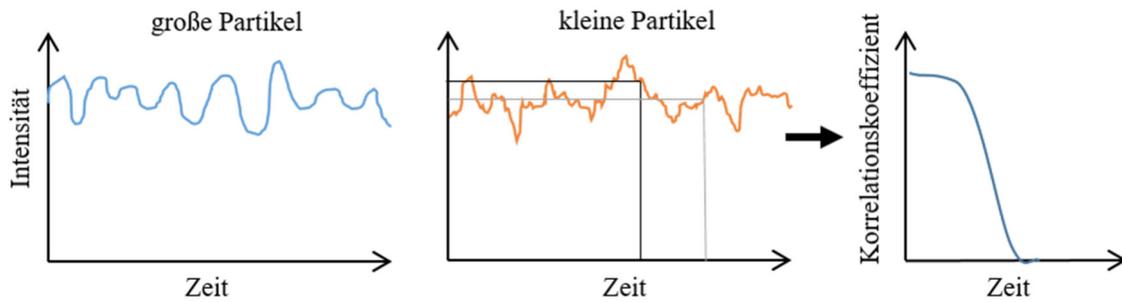


Abbildung 3.5: Intensitätsfluktuation großer und kleiner Partikel, aufgenommen über die Zeit. Daraus berechnet sich die Autokorrelationsfunktion zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nach [55].

mit der Boltzmann-Konstante⁵ k_b , der Temperatur T sowie der Viskosität des Solvents η . Aus den Gleichungen (3.2) und (3.4) ist ersichtlich, dass sowohl die Temperatur, Viskosität aber auch der Brechungsindex für die Bewertung der Proben eine Rolle spielen.

Für multimodale Verteilungen ist die Kumulantenanalyse nicht mehr geeignet, stattdessen wird ein Multiexponentialansatz angewendet, um die Tropfengröße zu berechnen. In erster Linie ergibt sich auch hier ein intensitätsbasierter Mittelwert. Dieser kann jedoch über die Mie-Theorie in einen volumen- und anzahlgewichteten Durchmesser umgerechnet werden. Für die Umrechnung ist der Brechungsindex der Probe relevant. Bei einer Probe mit zwei unterschiedlichen Größenpopulationen unterscheidet sich das Verhältnis der Verteilung je nach herangezogenen Parameter. Dies in Abbildung 3.6 veranschaulicht. Die Unterschiede von anzahl- zu volumengewichteten Durchmesser begründen sich in dem Volumen einer Kugel mit d^3 , der intensitätsgewichtete Durchmesser geht aus der Rayleigh-Approximation mit d^6 in die Berechnung ein [55].

Für die Versuchsdurchführung wurde jede Probe viermal mit elf Durchläufen innerhalb jeder Messung bei Raumtemperatur (20,0°C) gemessen. Es kamen Polymethylmethacrylat (PMMA) Einwegküvetten mit einem Probenvolumen von 450 μL zum Einsatz, die Menge der Stichproben betrug $n = 3$. Die Ergebnisse der DLS-Messung sind als z-Average, als anzahl- und intensitätsgewichteter mittlerer Durchmesser, als Polydispersitätsindex (PDI) und in Form der abgeleiteten Zählrate („Derived Count Rate“, DCR) dargestellt. Die DCR ist die Streuintensität, kompensiert mit der Signalabschwächung während der Messungen, angegeben in Photonen-Kilocounts pro Sekunde (kcps).

⁵ Ludwig Eduard Boltzmann (* 20. Februar 1844 in Wien; † 5. September 1906), österreichischer Physiker und Philosoph.

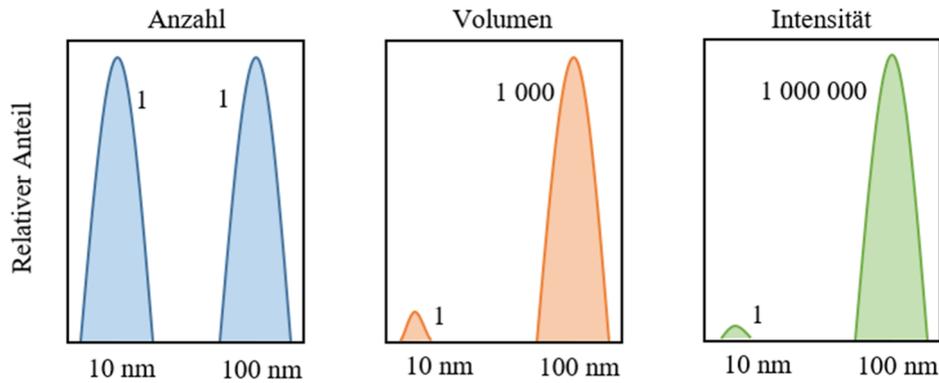


Abbildung 3.6: Unterschied der Anzahl-, Volumen- und Intensitätsverteilung einer bimodalen Probe mit gleichem Anteil an kleinen und großen Partikeln. Nach [55].

3.3.2 Röntgenkleinwinkelstreuung

Zusätzlich zur DLS kam bei ausgewählten Proben die Röntgenkleinwinkelstreuung („small angle X-ray scattering“, SAXS; Xenocs Xeuss 2.0, Sassenage, Frankreich) zum Einsatz. Mit der SAXS lassen sich sowohl Teilchengrößen bzw. deren Polydispersität bestimmen als auch Oberflächenstrukturen aufklären und eine Unterteilung in Primärpartikeln und Aggregate vornehmen. Das Prinzip der Messung beruht auf der Absorption der Röntgenstrahlung am Objekt. Dazu trifft ein gebündelter, monochromatischer Röntgenstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge auf eine Probe. Ein sogenannter „beam stop“ am Detektor blockiert das direkt transmittierte Licht. Der andere Teil des Lichts streut dagegen in einem bestimmten Streuwinkel im angelegten Vakuum und trifft dann mit dem Streuvektor q auf den Detektor [56]. Die gemessene Intensität $I(q)$ ist dabei eine Funktion des Streuvektors q mit

$$q = 4\pi/\lambda \cdot \sin(\theta/2), \quad (3.5)$$

wobei θ der Streuwinkel und λ die Wellenlänge des Cu-K $_{\alpha}$ Röntgenstrahls ($\lambda = 0,154$ nm) ist. Die Intensität ist ebenfalls eine Funktion des Partikelvolumens V_p^2 und der Partikelanzahlkonzentration NV^{-1} , wobei die Voraussetzung für eine erfolgreiche Messung die Elektronendichtedifferenz $\Delta\rho_e^2$ der beiden untersuchten Phasen innerhalb des Systems ist:

$$I(q) \propto NV^{-1} \cdot V_p^2 \cdot \Delta\rho_e^2. \quad (3.6)$$

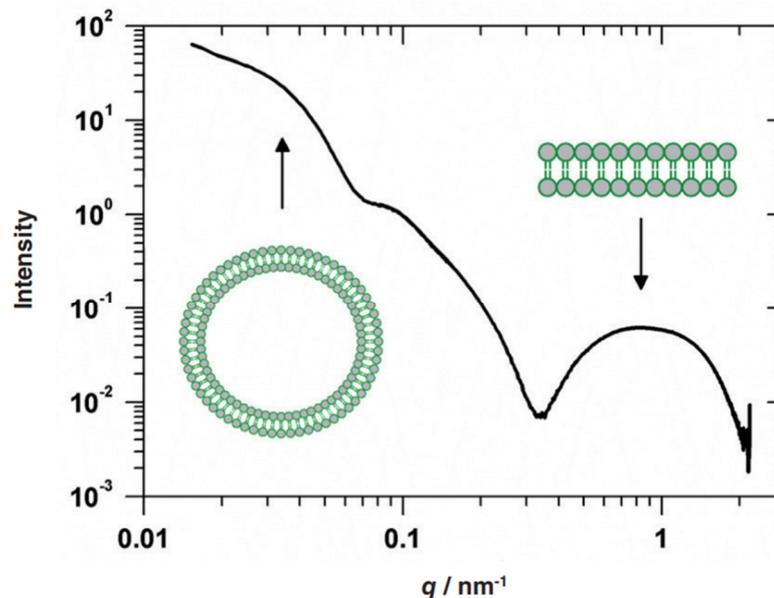


Abbildung 3.7: Beispielhafte Streukurve für ein Liposom mit einer Größe von 100 nm (kleine Streuvektoren) und einer Doppelschichtdicke von 4 nm (große Streuvektoren). Aus [57].

Für Liposomen und deren Doppelmembran ist eine beispielhafte Streuintensität in Abbildung 3.7 dargestellt. Bei kleinen Streuvektoren ist ein Rückschluss auf die Größe der Vesikel möglich (hier etwa 100 nm), große Streuvektoren geben Auskunft über die Dicke der Doppelschicht (4 nm).

Als Probenhalter diente ein Gel-Halter mit einem Proben-Detektor-Abstand von 1750 mm. Die Erfassung der Streudaten mit dem 300 K-S-Detektor betrug 1800 s. Das Modellierungstool für die Datenauswertung von polydispersen, harten Kugeln war die Software IgorPRO (Version 8.04). Die Datenauswertung umfasste die Analyse des Guinier-Regimes, um Informationen über die Partikelgröße zu erhalten, sowie des Porod-Regimes zur Beschreibung der äußeren Partikelstruktur. Weitere Informationen über die Probenvorbereitung, den Messtechniken und der Datenauswertung sind bei Meier⁶ et al. und Beaucage et al. zu finden [58–60].

3.3.3 UV-Vis Spektroskopie

Die UV-Vis Spektroskopie (DH-2000, Ocean Optics, Largo, Florida, USA) diente der Bestimmung der Einkapselungseffizienz der hergestellten Liposomen über Fluorescein-Natrium, fluoreszenz-markiertem Dextran und Rinderserumalbumin. Das zugrunde liegende Messprinzip

⁶ Die Probenvorbereitung zur Messung mittels SAXS, die Einstellung der Messtechnik sowie die Datenauswertung wurden dankenswerterweise von Herrn Dr.-Ing. Manuel Meier übernommen.

macht von der Absorption bestimmter Molekülgruppen im UV- (200-400 nm) oder sichtbaren (400-800 nm) Bereich Gebrauch und beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz [61]:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon dc} . \quad (3.7)$$

Die gemessene Intensität I berechnet sich aus der Ursprungsintensität I_0 , dem molaren Extinktionskoeffizienten ε , der Dicke der Küvette $d = 1$ cm und der Konzentration c . Die gemessene Strahlungsintensität am Detektor variiert dabei zur Ursprungsintensität, sodass die Extinktion im gemessenen Bereich zu berechnen ist. Kalibriergeraden sind für die Umrechnung der Probenextinktion in die Konzentration notwendig. Gleichzeitig ermöglicht die Kalibriergerade das Abziehen der Extinktion anderer Stoffe und Materialien, wie der kontinuierlichen Pufferphase oder der Küvettenwand, von der eigentlichen Änderung der Intensität des untersuchten Stoffes.

3.3.4 Phosphat-Assay nach Fiske

Um die Menge an Phospholipiden in Suspensionen, Überständen oder Rückständen zu bestimmen, kam das Phosphat-Assay nach Fiske, modifiziert nach Rouser zum Einsatz [50,62]. Die Methode beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis anorganischen Phosphats. Da ein Phospholipid jeweils ein Phosphat-Molekül enthält, kann mithilfe einer Kalibriergeraden die Quantifizierung erfolgen. Für den Nachweis erfolgt die Trocknung der Probe, anschließend ist Perchlorsäure sowie Hitze nötig, um die Molekülstrukturen der Phospholipide aufzubrechen, sodass das reine Phosphat als Reaktionspartner zur Verfügung steht. Ammoniummolybdat reagiert mit dem reduzierten Phosphat ein, es entsteht Phosphomolybdänsäure. Der Farbumschlag geschieht durch die Reduzierung der hinzugefügten Ascorbinsäure im Wasserbad. Die entstehende blaue Lösung ist im UV-Vis Spektrometer bei 797 nm zu vermessen und über die dazugehörige Kalibriergerade, welche aus einer reinen Phosphatstammlösung besteht und simultan zu behandeln ist, zu quantifizieren. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung inklusive aller verwendeten Lösungen und ihre Konzentrationen ist dem Anhang A4 zu entnehmen.

Kapitel 4

Tensiometrie zwischen Phospholipid-Suspensionen und Fluorocarbon-Phase⁷

4.1 Stand der Technik und Zielsetzung

Das Verständnis der Adsorptionskinetik von Phospholipiden hilft bei der Verbesserung der Herstellung von Nanoemulsionen. Aus dem thermodynamischen Verhalten von Grenzflächenschichten ist die optimale Fläche pro Lipidmolekül abzuleiten, welche herangezogen werden kann, um die Phospholipid-Konzentration für den Emulgierprozess zu bestimmen sowie Informationen über die Emulsionsstabilität zu erhalten [12]. Daher sind Untersuchungen der Grenzflächenspannungen zwischen Phospholipiden und einer Öl- oder organischen Phase von großem Interesse.

Der Du Noüy-Ring⁸ ist, neben der Wilhelmy-Platte, die erste etablierte Methode, welche Grenzflächenmessungen erlaubt [64]. Der Du Noüy-Ring und die Wilhelmy-Platte sind nicht-optische Verfahren, die insbesondere für schnelle Messungen von reinen Oberflächenspannungen von Flüssigkeiten vorteilhaft sind [65]. Die Fähigkeit, schnell Messdaten eines unbekanntes Systems zu erhalten, ist jedoch mit dem Nachteil verbunden, dass bei der Ringmethode Messartefakte auftreten können [66].

⁷ Inhalte dieses Kapitels wurden in *Colloid and Polymer Science* veröffentlicht und für diese Dissertation übersetzt bzw. angepasst. [63] K. Ullmann, L. Poggemann, H. Nirschl, G. Lenewit, „Adsorption process for phospholipids of different chain lengths at a fluorocarbon/water interface“, *Colloid and Polymer Science* (298) 2020

⁸ Pierre Lecomte du Noüy (*20. Dezember 1883; † 22. September 1947), französischer Biophysiker und Philosoph.

Mit fortschreitender Forschung fanden weitere Methoden Einzug in die Wissenschaft wie die auf Gravitation basierende Pendant Drop- oder die Sessile Drop und Spinning Drop-Methode. Hierbei handelt es sich um optische Messmethoden. Die Bestimmung der sich ausbildenden Grenzflächenspannungen bei diesen Methoden erfolgt üblicherweise automatisch mit einem Kamerasystem. Die Spinning Drop-Methode kommt hauptsächlich für die Messung sehr kleiner Grenzflächenspannungen bis zu 10^{-4} mN/m zum Einsatz und beruht auf der Rotation eines Tropfens in einer Flüssigkeit, dessen Umfang mit einer Kamera erfasst wird. Bei der Sessile Drop-Methode liegt ein Tropfen auf einer Festkörperoberfläche auf, die Bestimmung der Grenzflächenspannung erfolgt optisch über die Messung des Kontaktwinkels beider Phasen [67]. Die Pendant Drop-Methode, auch Profilanalyse-Tensiometrie (PAT) genannt, ist eine der gängigsten Methoden zur Bestimmung des Adsorptionsprozesses von Tensiden und gilt als nicht invasiv [68–70]. Unterhalb oder oberhalb einer Nadel, je nach Dichte der beiden untersuchten Phasen, bildet sich ein Tropfen aus, dessen Profil über ein Kamerasystem gemessen wird. Der Durchmesser und die Form des Tropfens sind neben dem Dichteunterschied zwischen den beiden Phasen entscheidend für die gemessene Grenzflächenspannung [67].

Die Grenzflächeneigenschaften zwischen organischer Phase und Wasser oder Wasser und Luft sowie das Adsorptionsverhalten von Phospholipiden, analysiert mit den oben genannten Methoden, sind in einer Vielzahl von wissenschaftlichen Publikationen beschrieben [71–73]. Methoden wie die PAT nutzen dabei die Vorteile der Online-Messung, bei der die Grenzflächenspannungen und damit der Adsorptionsprozess ständig aufgezeichnet werden. Es sind bisher jedoch nicht viele experimentelle Daten über Grenzflächenspannungen zwischen zwei Phasen veröffentlicht, von denen die hydrophobe Phase ein Fluorocarbon ist [74]. Hier ergibt sich die Herausforderung, diese Systeme messtechnisch zu erfassen. Standardmessverfahren wie die PAT wurden getestet, erwiesen sich aber als ungeeignet für das vorliegende System, da der große Dichteunterschied zwischen beiden Phasen zu einer schnellen Tropfenablösung führt (zwischen 10 und 30 Minuten) und die Bildung der für die PAT benötigten langzeitstabilen Tropfen behindert. Daher ist statt einer unendlichen Messung eine Extrapolation in Richtung des Gleichgewichts notwendig, welche fehlerbehaftet ist. Darüber hinaus kann die Kamera den Tropfen nicht automatisch erkennen, da die Differenz der Brechungsindizes Δn von PFPH und Phosphatpuffer verschwindend gering ist ($\Delta n = 0,0004$). Die automatische Bilderkennung ist jedoch für die Technik zur Bestimmung des Adsorptionsprozesses von entscheidender Bedeutung. Um den Brechungsindex der wässrigen

Phase zu beeinflussen und die automatische Bilddetektion mit PAT zu ermöglichen, fanden in der Arbeitsgruppe von Prof. Nirschl Untersuchungen einer Saccharose- und Natriumchloridlösung als wässrige Phase statt. Mit den dispergierten Phospholipiden in der wässrigen Phase erfolgten Messungen über einen Zeitraum von 2000 s. Diese Messdauer stellt einen Standard für die PAT-Analyse dar. Innerhalb dieser Zeitspanne war jedoch keine Gleichgewichts-Grenzflächenspannung zu erreichen. Darüber hinaus zeigten die durchgeführten Experimente hohe Standardabweichungen und keine Veränderung der Grenzflächenspannungen in Abhängigkeit von der Konzentration der Phospholipide [75].

Daraus war zu schließen, dass Standardmessverfahren nicht geeignet sind, um Grenzflächenspannungen zwischen PFPH und einer Phospholipid-Suspension zu erfassen. Aus diesem Grund rückte die Du Noüy-Ringmethode in den Fokus der Arbeit, da sie es erlaubt, nicht mischbare Phasen mit hohen Dichteunterschieden unabhängig von deren Brechungsindex und der Trübung einer wässrigen Lipid-Suspension zu messen. Der Du Noüy-Ring ermöglicht zwar keine Online-Messungen, allerdings ist der Vorteil dieser Methode, dass die langfristigen Grenzflächenspannungen leicht zu erfassen sind. Das Adsorptionsverhalten ist ebenfalls über den gleichen Zeitraum zu beobachten. Da die Du Noüy-Ringmethode allgemein als fehleranfällig gilt, ist eine Verifizierung mittels einer zweiten Messtechnik notwendig und sinnvoll.

Die zweite ausgewählte Methode in dieser Arbeit ist die Spinning Drop Methode. Die Spinning Drop Tensiometrie dient dem Vergleich insbesondere deshalb, weil sie im Bereich der unteren Grenzflächenspannungen genaue Daten liefert und auf einem anderem physikalischen Prinzip beruht [76]. Dieses Prinzip hat zur Folge, dass die Durchführung der Experimente mit dem Spinning Drop Tensiometer für das vorliegende Stoffsystem wesentlich länger dauern könnten als für typische Materialien wie Hexanol und Wasser. Dies liegt daran, dass der Gleichgewichtszustand für konzentrationsabhängige Grenzflächenspannungen mit Phospholipiden unter Rotation zu erreichen ist und nicht in einer bewegungsfreien Umgebung. Zudem findet das Spinning Drop Tensiometer üblicherweise für Systeme mit sehr kleinen Grenzflächenspannungen Anwendung, die für die vorliegenden Stoffkompartimente nicht in Gänze gelten. Im Gegensatz dazu erlaubt die Du Noüy-Ringmethode mehrere Messungen gleichzeitig, welches aufgrund des parallelen Proben-Equilibrierens die Untersuchung einer größeren Anzahl unterschiedlicher Konzentrationen und Phospholipide in kürzerer Zeit ermöglicht. Daher ist zu erwarten, dass die Vorteile der Du

Noüy-Ringmethode für dieses Stoffsystem die genannten Nachteile überwiegen. Trotz der genannten Nachteile haben bereits Kovach et al. [77] Janus-Emulsionen aus Silikonöl, Olivenöl, Wasser, Phospholipiden und anderen Emulgatoren mittels der Du Noüy-Ringmethode erfolgreich untersucht. Studien von Phospholipiden als natürliche Tenside und ihrer Adsorptionskinetik an einer Wasser-Öl-Grenzfläche, gemessen mit dem Du Noüy-Ring, gibt es bisher allerdings wenig und es besteht hier der Bedarf weiterer Untersuchungen [78]. Darüber hinaus fehlt ein direkter Vergleich zwischen der Du Noüy- und der Spinning Drop Methode.

In dieser Arbeit finden beide Methoden Anwendung, um die verschiedenen Grenzflächenspannungen von Lipid-Suspensionen mit Phospholipiden verschiedener Kettenlängen zu messen. Erstmals dient das Fluorocarbon PFPH als hydrophobe Phase. Die verwendeten Phospholipide haben die gleiche Phosphatidylcholin-Kopfgruppe, variieren jedoch in ihrer Kettenlänge von 14 bis 18 Kohlenstoffatomen. Darüber hinaus ist der mögliche Einfluss der Temperatur auf die Grenzflächenspannung untersucht. Auch hier lag der Fokus auf Phospholipiden mit verschiedenen Kettenlängen, sodass Aussagen zur Übergangstemperatur der verschiedenen Lipide und deren mögliche Wirkung möglich sind.

Aus dem beschriebenen Stand der Technik ergeben sich folgende Ziele für dieses Kapitel: Es gilt, das Potential des Du Noüy-Rings im Vergleich zu den heute gängigen Messmethoden wie dem Spinning Drop Tensiometer herauszuarbeiten. Aufgrund des Umfangs und einer genauen ergebnisbasierten Analyse beider Methoden ist der theoretische Hintergrund des Du Noüy-Rings und des Spinning Drop Tensimeters sowie die Versuchsdurchführung im Folgenden erläutert. Beide Methoden sind miteinander verglichen, um eine geeignete Messmethodik für die Bestimmung von Grenzflächenspannungen zwischen Phospholipid-Suspensionen und der Fluorocarbonphase auszuwählen.

4.2 Angewandte Methoden zur Messung von Grenzflächenspannungen

4.2.1 Ring-Tensiometrie nach Du Noüy

Die Du Noüy-Ringmethode beruht auf der Kräftebestimmung zwischen zwei Grenzflächen (Ab-

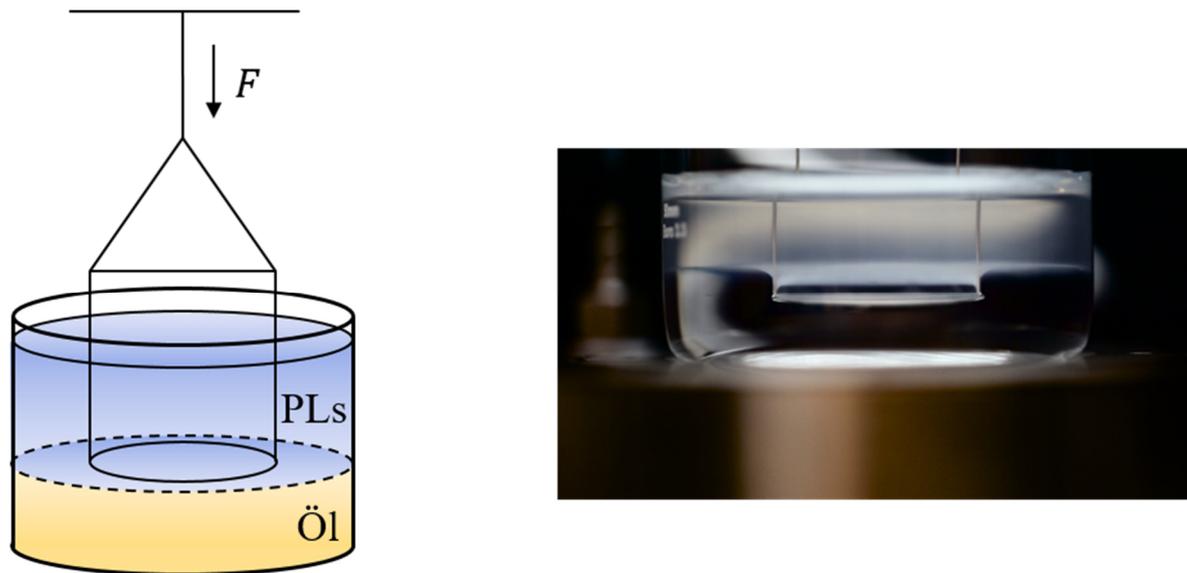


Abbildung 4.1: Schematische und fotografische Darstellung des experimentellen Aufbaus der angewandten Du Noüy-Ringmethode. Links: Schematische Darstellung. Aufgrund der schwereren hydrophoben Phase ist die wässrige Phase (Phospholipid-Stammesuspension, PLs) oben, sodass sich die Grenzfläche durch Herunterdrücken des Ringes in Richtung Ölphase verformt. Die gemessene Widerstandskraft F ist für die Berechnung der Grenzflächenspannung γ heranzuziehen. Rechts: Fotografische Darstellung der Grenzfläche zwischen dem Fluorocarbon PFPH (unten, klar) und der Phospholipid-Stammesuspension (0,7 mM DPPC+Cholesterin, oben, trüb). Der Du Noüy-Ring taucht in die obere Phase ein und verformt unter Kraftaufwendung die Grenzfläche. Ein konkaver Meniskus bildet sich aus.

bildung 4.1). Der Ring taucht in die obere Flüssigkeit ein und wird an die Grenzfläche der beiden Flüssigkeiten bewegt. Aufgrund der Kapillarkraft zieht bzw. drückt der Ring die obere Flüssigkeit nach oben oder unten, je nach Dichte und Oberflächenspannung der beiden untersuchten Flüssigkeiten. Um den Ring und den sich daran formenden Meniskus nach oben zu ziehen, ist eine Kraft F notwendig, welche mit der Grenzflächenspannung γ über die Summe des Innen- und Außenumfangs des Ringes L und dem Benetzungswinkel θ in Verbindung steht. Eine Mikrowaage misst die Kraft F . Der Umfang des Ringes ist herstellerseitig geometrisch definiert und aus Platin-Iridium, sodass für die meisten Flüssigkeiten eine ideale Benetzung und somit ein Benetzungswinkel von $\theta = 0$ anzunehmen ist. In diesem Fall wird der Kosinus-Term zu eins [67]:

$$\gamma = \frac{F}{L \cos \theta} = \frac{F}{L}. \quad (4.1)$$

Für die Versuche kam das Du Noüy-Ring-Tensiometer DCAT EC11 (Dataphysics, Filderstadt, Deutschland) zum Einsatz. Eine schematische und fotografische Darstellung des Messsystems zeigt Abbildung 4.1. Durch das Betreiben des Gerätes in einem temperierten Raum (20°C) und der unter Verwendung eines Wasserbades ist eine durchgängige Temperatur von $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sichergestellt. Die Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser (72 mN/m [79]) diente zur

Bestimmung der Messgenauigkeit des verwendeten Platin-Iridium-Ringes. Zusätzlich ist eine sogenannte Anfangsgrenzflächenspannung für alle Messungen nötig, repräsentiert durch die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und PFPH (52,4 mN/m) ohne Zusatz von Phospholipiden. Der Messwert dient dem Vergleich der Grenzflächenspannung beeinflusst durch die zugegebenen Phospholipide. Die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Grenzflächenspannung bzw. dynamischen Adsorption erfolgte für drei verschiedene Phospholipide: DMPC, DPPC und DSPC. Diese unterscheiden sich in ihrer Kettenlänge (Fettsäurekettenlänge zu Doppelbindung-Verhältnis; 14:0, 16:0, 18:0). Ein Volumen von 15 mL der hydrophoben Phase war in das Glasgefäß zu überführen. Vorheriges Reinigen mit Isopropanol und Trocknen in einer Wärmekammer erhöhen die Messgenauigkeit. Um eine Vermischung der Öl- und Wasserphase zu vermeiden, ist es notwendig, die wässrige Phase mit den Phospholipiden vorsichtig entlang der Glaswand auf die Ölphase zu pipettieren.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Grenzflächenspannung der verschiedenen Phospholipide ist realisiert durch eine Änderung in der Konzentration der wässrigen Phase. Die Erhöhung der Konzentration erfolgte schrittweise durch die Zugabe der Lipid-Stammsuspension zur wässrigen Phase desselben Glasgefäßes. Sowohl direkt nach der Konzentrationserhöhung als auch nach Erreichen des Quasi-Gleichgewichtszustandes wurde die Messung zur Bestimmung der Grenzflächenspannung durchgeführt. Auf diese Weise ist die Bestimmung der Equilibrierungszeit für jedes Phospholipid und für verschiedene Konzentrationen vor Beginn der Versuchsreihen möglich und für alle weiteren Experimente zu verwenden. Jedes Experiment ist als Triplikat dargestellt. Das Abflammen des Ringes nach jeder Messung reinigte diesen von Rückständen.

Da die schrittweise Erhöhung der Konzentration als Versuchsreihe im Gegensatz zu einer jeweiligen Einzelmessung der Konzentration in Bezug auf die Grenzflächenspannung abweichen und somit auch die Equilibrierungsdauer verfälschen könnte, fand eine Verifizierung dessen statt. Es zeigte sich, dass die schrittweise Konzentrationserhöhung zur gleichen End-Grenzflächenspannung führt. Gleichzeitig verkürzt sich die Equilibrierungsdauer bei dieser Vorgehensweise im Vergleich zur Einzelmessung der Enkonzentration, sodass die schrittweise Verfahrensweise beibehalten werden kann. Die Verifizierung ist im Anhang aufgeführt (Anhang A5, Abbildung A 5.1).

4.2.1.1 Equilibrierung von DPPC

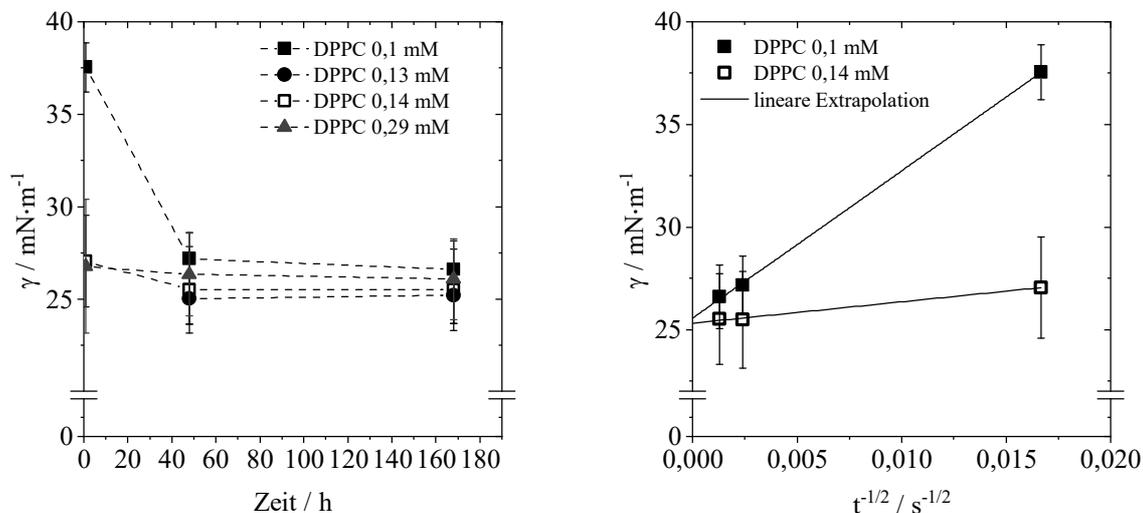


Abbildung 4.2: Equilibrierung für das Phospholipid DPPC bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts bei Messung der Grenzflächenspannung γ mit dem Du Noüy-Ring. Links: Grenzflächenspannung γ aufgetragen über die Zeit t . Rechts: ausgewählte Daten aus der linken Darstellung, aufgetragen als γ über $1/t^{1/2}$. Die Standardabweichung berechnet sich aus $n = 3$ Experimenten.

Für die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts ist eine gewisse Zeit notwendig, da die Adsorption der Phospholipide ein diffusionskontrollierter Prozess ist. Initial war es somit notwendig, eine Studie mit dem Du Noüy-Ring zur Bestimmung der Equilibrierung von DPPC durchzuführen, welches als Phospholipid für die Validierungsexperimente gewählt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 links dargestellt. Aufgetragen ist die Grenzflächenspannung in Abhängigkeit von der Messdauer für vier unterschiedliche DPPC-Konzentrationen (0,1 mM, 0,13 mM, 0,14 mM und 0,29 mM). Während die Grenzflächenspannung anfänglich bis zu einer Messdauer von 48 h abnimmt, ist bei einer längeren Messdauer keine weitere signifikante Veränderung der Grenzflächenspannung zu erkennen. Dies bedeutet, dass das thermodynamische Gleichgewicht zwischen der wässrigen DPPS-Suspension und dem PFPH nach 48 h erreicht ist.

Die in Abbildung 4.2 rechts dargestellte zeitlich inverse Auftragung dient der Extrapolation der Gleichgewichts-Grenzflächenspannung bei $1/t^{1/2} = 0$ und einer theoretisch unendlichen Messdauer. Die daraus resultierenden Werte sind in Tabelle 4.1 dargestellt und mit den experimentell ermittelten Ergebnissen nach 48 h Messdauer verglichen. Auch wenn sich eine leichte Konzentrationsabhängigkeit zeigt, bestätigt das Konfidenzintervall von 95% der Standardabweichung

Tabelle 4.1: Vergleich der extrapolierten Gleichgewichts-Grenzflächenspannung $\gamma (t \rightarrow \infty)$ mit der gemessenen Grenzflächenspannung nach 48 h sowie die Standardabweichung \bar{s}_{PL} für das Phospholipid DPPC bei zwei verschiedenen Konzentrationen, gemessen mit dem Du Noüy-Ring.

Konzentration / mM	$\gamma (t \rightarrow \infty) \pm \bar{s}_{PL} / \text{mN m}^{-1}$	$\gamma (48 \text{ h}) \pm \bar{s}_{PL} / \text{mN m}^{-1}$
0,1	25,56 \pm 1,64	27,18 \pm 1,42
0,14	25,32 \pm 0,91	25,50 \pm 2,36

eine gute Übereinstimmung zwischen den extrapolierten und den nach 48 h gemessenen Grenzflächenspannungen. Unabhängig von der Konzentration ist für alle weiteren Experimente mit DPPC somit die Messdauer von 48 h ausreichend.

4.2.1.2 Einfluss des Ringes auf die Grenzflächenspannung

Neben der Bestimmung der Equilibriumszeit der ungestörten Grenzfläche wurden Untersuchungen zu einem möglichen physikalischen Einfluss des Ringes auf die Grenzfläche durchgeführt. Bei der Verwendung des Du Noüy-Rings stört der physikalische Eintritt des Ringes in die Grenzfläche die Monolage der Phospholipide und kann somit die Spannung zwischen den beiden Flüssigkeiten bei Mehrfachmessungen verfälschen. Ziel war es, die Equilibriumszeit nach Kontakt des Rings mit der Grenzflächenmonolage und dadurch mögliche entstehende Artefakte nach zu schneller Wiederholung auszuschließen. Damit ist außerdem zu untersuchen, ob eine Mehrfachbestimmung der Grenzflächenspannung einer einzigen Probe sinnvoll ist und ob die Phospholipide nach der Messung erneut an die Grenzfläche adsorbieren. Dazu wurde die Grenzflächenspannung in Dreifachbestimmung nach Erreichen des Equilibriums nach 48 h sowie 120 h später gemessen. Zwischen jeder Messung erfolgte die Reinigung des Ringes. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 links dargestellt. Weiße Balken stellen die bei der Messung nach 48 h ermittelte Grenzflächenspannung dar, wobei jeder Balken den einzelnen Messwert der Dreifachbestimmung zeigt. Innerhalb einer Probe steigt die Grenzflächenspannung mit jeder aufeinanderfolgenden Messung, nummeriert mit 1, 2 und 3, von 25,7 mN/m auf 30,3 mN/m an. Durch wiederholtes Eintauchen und Herausziehen des Rings an der Grenzfläche werden die adsorbierten Phospholipide entfernt und gehen in die wässrige Phase über, sodass daraus bei der zweiten und dritten Messung eine höhere Grenzflächenspannung resultiert. Die grauen Balken stellen die Messwerte der Dreifachbestimmung 120 h später nach der ersten Messreihe dar. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte das System erneut ein thermodynamisches Gleichgewicht an der Grenzfläche herstellen. Dies zeigt die gemessene Grenzflächenspannung von 26,1 mN/m, welche somit trotz des physikalischen Eintauchens des Ringes innerhalb der ersten Messreihe nach 48 h auf den glei-

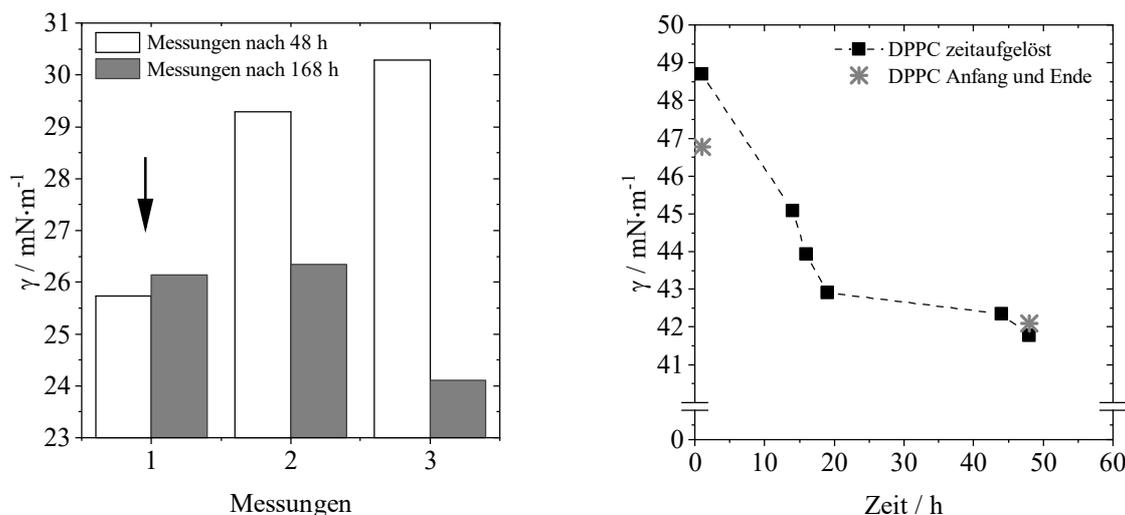


Abbildung 4.3 Links: Bestimmung der Equilibrierung bis das System regeneriert ist und sich der Gleichgewichtszustand nach physischem Kontakt mit dem Du Noüy-Ring erneut eingestellt hat. Beispielhaft dargestellt ist der Anstieg der Grenzflächenspannung zwischen drei Messungen der gleichen Probe von 0,14 mM DPPC. Weiße Balken zeigen die Messung nach 48 h, drei Mal hintereinander durchgeführt (Messung 1, 2, 3, wobei jede Messung etwa 3 min dauert, 10 min im Gesamten). Graue Balken zeigen dieselbe Probe nach 168 h gemessen und in Dreifachbestimmung. Der Pfeil weist darauf hin, dass die erste Messung für die konzentrationsabhängige Kurve zu verwenden ist. Rechts: Nachweis mittels zwei unabhängiger Proben von 0,072 mM DPPC, dass ein wiederholter Kontakt mit dem Du Noüy-Ring die finale Gleichgewichts-Grenzflächenspannung nicht beeinflusst. Dargestellt ist die zeitaufgelöste Entwicklung der Grenzflächenspannung sowie eine Messung jeweils zu Anfang und am Ende.

chen Wert absinkt, wie zuvor nach 48 h gemessen. Dieser Wert ist dann innerhalb der Wiederholungsmessung für die erste und zweite Bestimmung stabil und zeigt erst bei der dritten Messung eine verzerrte Grenzfläche. Dies führt ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass im Adsorptionsregime der Phospholipide der erste gemessene Wert für die Grenzflächenspannung aufgrund der invasiven Verzerrung der Grenzflächenschicht der einzig genaue ist und Mehrfachmessungen derselben Probe keinen Mehrwert bieten (Abbildung 4.3, schwarzer Pfeil).

Zusätzlich erfolgte die Bewertung eines möglichen Einfluss des Rings während des Adsorptionsprozesses mit zwei weiteren unabhängigen Messprinzipien am Beispiel der Konzentration von 0,072 mM DPPC, dargestellt in Abbildung 4.3 rechts. Das erste Messprinzip bestand aus zeitaufgelösten Messungen, wobei sowohl Messungen zu Beginn des Experiments als auch zwischen durch zur Beobachtung des Adsorptionsprozesses und damit dem Absinken der Grenzflächenspannung durchgeführt wurden. Für das zweite Messprinzip fand die Messung nur zu Beginn und am Ende des Experiments statt. Die zeitaufgelösten Messungen der ermittelten Grenzflächenspannung zeigen eine Abnahme der Spannung mit der Zeit von 48,7 mN/m auf

41,8 mN/m. Die Einzelmessung am Anfang und am Ende stimmt mit diesen Ergebnissen überein und zeigt einen ähnlichen Wert der Grenzflächenspannung bei 0,072 mM DPPC von 46,8 mN/m zu Beginn und von 42 mN/m nach 48 Stunden. Die Diskrepanz in der Grenzflächenspannung der ersten Messung jeder Probe ist auf Nicht-Gleichgewichtsbedingungen zurückzuführen. Die begrenzte Genauigkeit bei der Bestimmung der Adsorptionskinetik ist auf die Nicht-Gleichgewichtsbedingungen der Monoschicht selbst zurückzuführen, aber wie in Abbildung 4.3 rechts gezeigt, ist die Gleichgewichts-Grenzflächenspannung nach 48 h mit hoher Genauigkeit messbar. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass selbst bei wiederholtem physischen Kontakt zwischen dem Ring und der Grenzfläche der Adsorptionsprozess von Phospholipiden über einen längeren Zeitraum nur reversibel gestört wird.

4.2.2 Spinning Drop Tensiometer

Als zweite Messmethode kam neben der Du Noüy-Ringmethode das Spinning Drop Video-Tensiometer (SVT20, Dataphysics, Filderstadt, Deutschland) zum Einsatz. Eine schematische und fotografische Darstellung des Messprinzips zeigt Abbildung 4.4. Die Flüssigkeit mit der höheren Dichte wird in einer gläsernen Kapillare vorgelegt, horizontal in das Tensiometer eingespannt und zum Rotieren gebracht. Unter Rotation erfolgt die Zugabe eines Tropfens der Flüssigkeit mit geringerer Dichte über eine Spritzenkanüle. Die Auslenkung des Tropfens ändert sich je nach eingestellter Winkelgeschwindigkeit aufgrund der wirkenden Zentrifugalkräfte und kann über ein unterstützendes Kamerasystem vermessen werden. Die Berechnung der Grenzflächenspannung erfolgt nach Vonnegut et al. [76], welche diese aus dem minimalen Energiezustand ableiten. Die Gesamtenergie E des Systems besteht aus der Energie durch die Rotation E_R und der Energie durch die Grenzflächenspannung E_γ :

$$E = E_R + E_\gamma = \frac{1}{4} \Delta \rho V r^2 \omega^2 + \gamma (2\pi r L + 4\pi r^2) . \quad (4.2)$$

Die Energie durch die Rotation des Tropfens setzt sich aus dem Volumen V des Tropfens, der Dichtedifferenz der beiden Phasen $\Delta\rho$ und der Winkelgeschwindigkeit ω zusammen, während die Energie durch die Grenzflächenspannung von der Zylinderform des Tropfens abhängt und somit auch von der Länge L des Zylinders. Mit zunehmender Winkelgeschwindigkeit erreicht der Tropfen eine zylindrische Form, welcher zur Berechnung des Radius r durch Vermessen des Umfangs dient. Voraussetzung ist, dass die Länge L viermal so lang ist wie der Radius r .

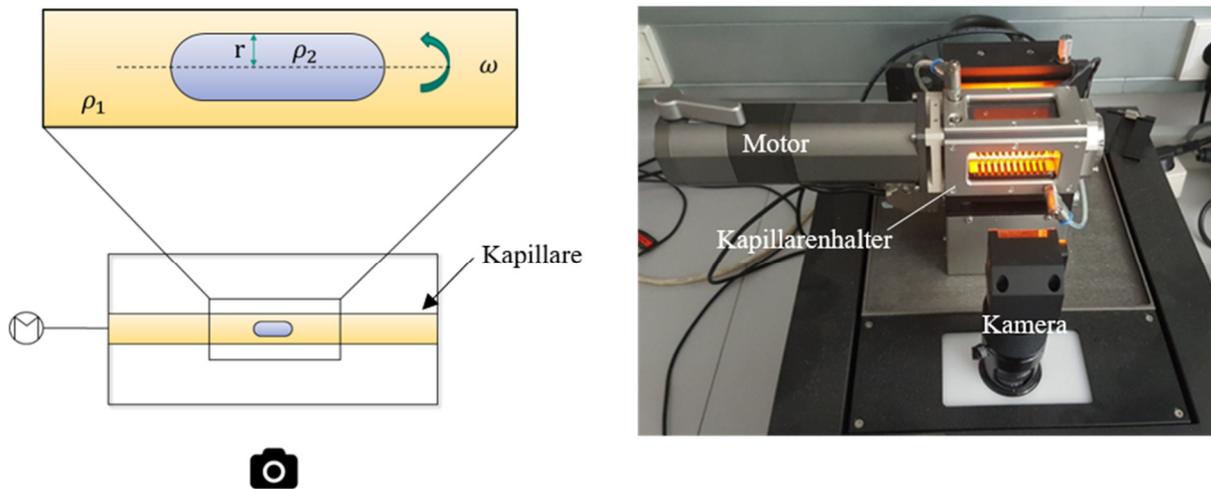


Abbildung 4.4 Rechts: Schematische Darstellung des Spinning Drop Tensiometers. Eine Kapillare rotiert horizontal mit einer Winkelgeschwindigkeit ω . Die wässrige Phase mit der geringeren Dichte ρ_2 bildet einen Tropfen innerhalb der Ölphase mit der höheren Dichte ρ_1 aus. Die Bestimmung des Radius r erfolgt durch Messen des Umfangs. Eine Kamera nimmt den Tropfen auf. Links: Fotografische Darstellung des Spinning Drop Tensiometers. Die gläserne Kapillare wird horizontal im Kapillarenhalter fixiert.

Da der minimale Energiezustand

$$\frac{\partial E}{\partial r} = 0 \quad (4.3)$$

zielgebend ist, ergibt sich aus der Gleichung (4.2) die Gleichung (4.4) zur Bestimmung der Grenzflächenspannung γ :

$$\gamma = \frac{1}{4} \Delta \rho r^3 \omega^2 . \quad (4.4)$$

Die Messungen mittels Spinning Drop Tensiometer erfolgten ebenfalls für das Phospholipid DPPC. Beide Phasen, hydrophobe und hydrophile Phase, waren zu jeder Zeit bei $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ temperiert. Die zuerst eingefüllte Ölphase in der Kapillare sollte gänzlich frei von Gasblasen sein.

Die wässrige Phase mit DPPC ist in Abhängigkeit von der untersuchten Konzentration verdünnt und mit einer Spritze dazu zugegeben, die durch das Septum gestochen wurde. Die Kapillare rotierte währenddessen mit einer Winkelgeschwindigkeit von $\omega = 500$ U/min, um ein Anhaften des Tropfens an der Glaswand zu vermeiden. Wiederholungen der Messung der Grenzflächenspannung wurden durch mindestens fünfmalige Änderung der Winkelgeschwindigkeit in 200 U/min-Schritten generiert.

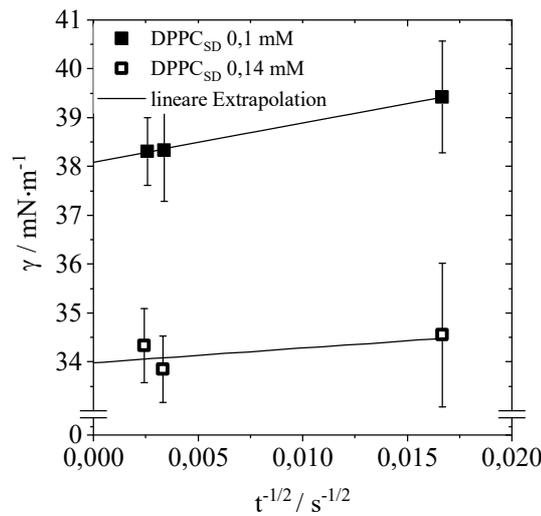


Abbildung 4.5: Grenzflächenspannung γ als Funktion der reziproken Zeit $1/t^{1/2}$ für zwei verschiedene Konzentrationen von DPPC gemessen mit dem Spinning Drop Tensiometer. Die Standardabweichung berechnet sich aus $n = 3$ Experimenten.

Ebenso wie bei der Du Noüy-Ringmethode war die Bestimmung der Equilibrierung für die abschließenden Messungen notwendig. Dazu zirkulierte der Tropfen anfangs so lange, bis keine Änderung der Grenzflächenspannung festzustellen war. Neben der zeitabhängigen Messung wurden die Daten gegen Unendlich extrapoliert. Die extrapolierte Grenzflächenspannung als Funktion der Zeit für zwei mit dem Spinning Drop gemessene DPPC-Konzentrationen in Abbildung 4.5 dargestellt. Die extrapolierten Gleichgewichts-Grenzflächenspannungen, die aus dem Diagramm γ über $t^{-1/2}$ zu bestimmen sind, zeigen, dass diese Werte nach 24 h innerhalb der Standardabweichung der gemessenen Grenzflächenspannung liegen. Der Ergebnisse der gemessenen und extrapolierten Gleichgewichts-Grenzflächenspannung für die Konzentration 0,1 mM und 0,14 mM sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die Werte beweisen, dass das Gleichgewicht nach einem Oberflächenalter von 24 h innerhalb einer Fehlerspanne erreicht wird, die kleiner ist als die Standardabweichung. Die Equilibrierung betrug damit 24 Stunden und wurde für alle weiteren Experimente, unabhängig von der Konzentration, verwendet.

Tabelle 4.2: Vergleich der extrapolierten Gleichgewichts-Grenzflächenspannung $\gamma (t \rightarrow \infty)$ mit der gemessenen Grenzflächenspannung nach 24 h sowie die Standardabweichung \bar{s}_{PL} für das Phospholipid DPPC bei zwei verschiedenen Konzentrationen, gemessen mit dem Spinning Drop Tensiometer.

Konzentration / mM	$\gamma (t \rightarrow \infty) \pm \bar{s}_{PL} / mN m^{-1}$	$\gamma (24 h) \pm \bar{s}_{PL} / mN m^{-1}$
0,1	$38,09 \pm 0,25$	$38,34 \pm 1,10$
0,14	$33,98 \pm 0,35$	$33,85 \pm 0,68$

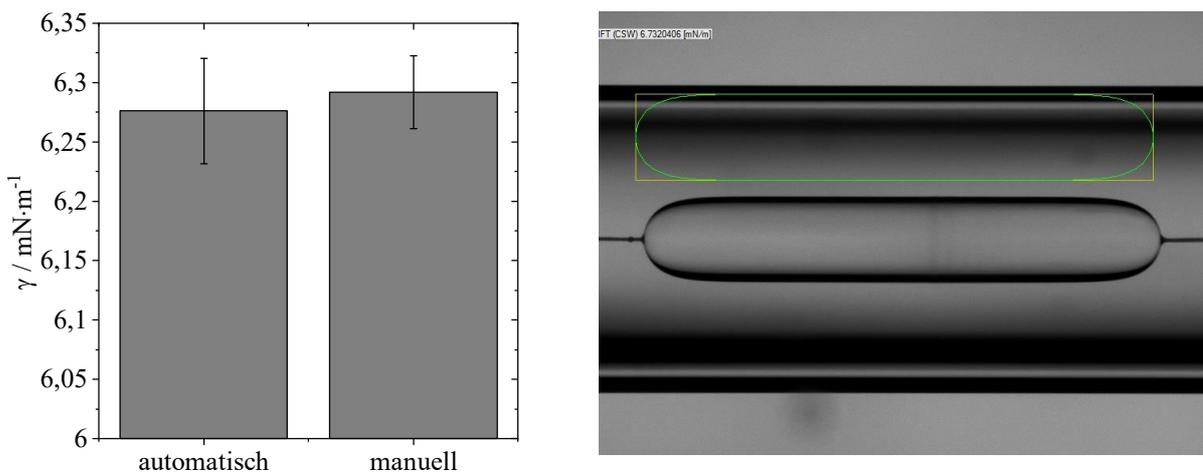


Abbildung 4.6 Links: Validierung der automatischen Tropfendetektion und die damit verbundene Bestimmung der Grenzflächenspannung über das gängige Kamerasystem im Vergleich zum manuell aufgetragenen Umfang am System Wasser und Hexanol. Rechts: Fotografische Darstellung eines Hexanoltropfens in Wasser in der Kanüle des Spinning Drop Tensiometers, langgezogen durch die wirkende Zentrifugalkraft. Der grüne Zylinder ist exemplarisch (versetzt zur besseren Sichtbarkeit des Tropfens) dargestellt, um zu illustrieren, wie die Bildanalyse die Form des Tropfens erfasst, um die Grenzflächenspannung zu bestimmen.

Die Schwierigkeit der Anwendung des Messsystems auf das zu untersuchende Stoffsystem aus Phospholipid-Suspensionen und Fluorocarbon ist der ähnliche Brechungsindex der beiden Phasen („refractive index“, RI; Phospholipid-Suspension RI = 1,331, RI_{PFPH} = 1,335). Normalerweise ist eine automatische und genaue Erfassung des Tropfenumfangs über das Kamerasystem möglich. Die ähnlichen Brechungsindizes der vorliegenden Phasen erlauben jedoch keine automatische Bestimmung des Umfangs über die Kamera, sondern erfordern eine manuelle Messung. Validierungsexperimente mit Wasser und Hexanol dienen dazu, eine ebenso korrekte Messung ohne automatische Bildaufnahme zu gewährleisten. Abbildung 4.6 rechts zeigt die fotografische Darstellung eines Hexanoltropfens in Wasser, welcher mittels des grünen Zylinders zu vermessen ist. Der Unterschied zwischen manueller und automatischer Bildauswertung des Tropfens zeigt Abbildung 4.6 links. Der Abweichung der Messungen beträgt dabei lediglich 0,25%, sodass die manuelle Bestimmung des Umfangs für weitere Experimente hinreichend genau ist.

4.2.3 Vergleich beider Methoden

Basierend auf der ermittelten Equilibrierung von DPPC fand die Du Noüy-Ringmethode zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Grenzflächenspannung Anwendung. Einige der zuvor

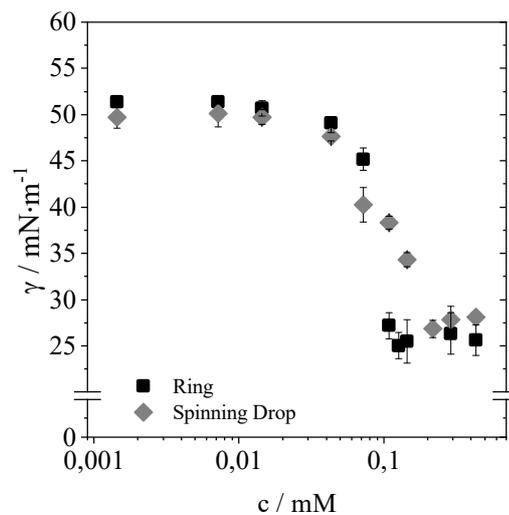


Abbildung 4.7 Links: Vergleich der Genauigkeit der Du Noüy-Ringmethode und des Spinning Drop Tensiometers zur Bestimmung der Grenzflächenspannung γ für verschiedene DPPC-Konzentrationen c . Rechts:

genannten vermuteten Schwierigkeiten, wie z. B. ein potenziell destruktiver Einfluss des Rings, konnten bereits widerlegt werden und zeigten keinen Einfluss auf die erste Messung in einer Zeitreihe von mehreren Tagen. Die Übereinstimmung von Einzelmessungen der Du Noüy-Methode im Vergleich zum Spinning Drop Tensiometer ist in Abbildung 4.7 gezeigt. In beiden Messreihen ist zu erkennen, dass die Grenzflächenspannung bei niedrigen Konzentrationen Werte im Bereich von 50 mN/m annehmen. Eine Konzentrationserhöhung über 0,03 mM führt zu einem signifikanten Abfall der Grenzflächenspannung. Der Bereich, in dem der Abfall der Grenzflächenspannung in ein ausgeprägtes Plateau bei höheren Konzentrationen übergeht, beschreibt die CMC. Beide Messmethoden erlauben die Darstellung dieses Verlaufs in sehr guter Übereinstimmung, wenngleich sowohl in der niedrigsten gemessenen Grenzflächenspannung als auch in der CMC Unterschiede bestehen. Aufgrund der zum einen statisch durchgeführten Untersuchung mit dem Du Noüy-Ring und der andererseits dynamischen Versuchsanordnung im Scherfeld des Spinning Drop sind Diskrepanzen in dieser Größenordnung erwartbar. Die niedrigste mit dem Du Noüy-Ring gemessene Grenzflächenspannung beträgt 25,03 mN/m, die Spinning Drop Methode lieferte 26,83 mN/m als niedrigste Grenzflächenspannung. Die CMC für das Spinning Drop beträgt 0,258 mM und 0,137 mM für den Du Noüy-Ring.

Beide Methoden stimmen insbesondere im unteren und oberen Konzentrationsbereich gut überein, wenn homogene Suspensionen und gesättigte Monolagen vorliegen. Der Unterschied der

Messwerte zwischen der Du Noüy-Methode und der Spinning Drop Methode im mittleren Konzentrationsbereich spiegelt genau die Phasenübergänge der DPPC-Monolage wider. Bei DPPC existiert für $\gamma \geq 40$ mN/m eine kontinuierliche flüssige Monolayerphase, für $40 \geq \gamma \geq 27$ mN/m existieren eine flüssige und eine feste Phase nebeneinander und für $\gamma < 27$ mN/m besteht eine feste homogene Phase. Diese Verläufe decken sich mit Untersuchungen von Vranceanu et al. [80]. Des Weiteren liefern Worthman et al. und Stottrup & Keller [81,82] mittels Fluoreszenzmikroskopie eine Visualisierung für die Koexistenz von fester und flüssiger Phase. Aus der genannten Literatur und den diskutierten Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen zum Phasenübergang von DPPC ziehen:

1. Die völlig statischen, diffusionskontrollierten Bedingungen der Fluorocarbon-Wasser-Grenzfläche in der Du Noüy-Methode begünstigen die Bildung der kontinuierlichen, aus Feststoffen bestehenden Phase und betten die flüssige Phase in die Zweiphasen-Koexistenz ein.
2. Im Gegensatz dazu führen die sehr dynamischen, konvektionskontrollierten Bedingungen der Spinning-Drop-Methode zu einer kontinuierlichen Phase, bestehend aus einer flüssigen DPPC-Monoschicht, die die DPPC-Feststoffe in die Koexistenz einbettet.

Um diese Schlussfolgerungen zu untermauern, fand eine weitere Untersuchung zum Vergleich der Du Noüy- und der Spinning Drop Methode mit einem weiteren Lipid statt, welches jedoch keine Phasenübergänge ausbildet (Abbildung 4.8 links). Die zu diesem Zweck gewählte natürliche Phospholipid-Mischung aus tierischen Ei-Lecithin enthält 80% Phosphatidylcholin, genannt E80, und eine Vielzahl gesättigter und ungesättigter Phospholipide mit unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen. Der Vorteil dieser natürlichen Mischung besteht darin, dass sie keine Phasenübergänge und Zwei-Phasen-Ko-Existenzregionen bildet. Die Ergebnisse zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung beider Methoden, insbesondere im mittleren Konzentrationsbereich. Der Abfall der Grenzflächenspannung ist moderater als bei dem reinen Phospholipid DPPC. Analog zu DPPC ist auch hier eine Abweichung zwischen den niedrigsten gemessenen Grenzflächenspannungen aufgrund der dynamischen und statischen Versuchsanordnung zu beobachten. Die Standardabweichung der Messwerte beider Methoden ist im Mittel ähnlich ($\bar{s}_{Ring} = 1,162$ mN/m, $\bar{s}_{SD} = 0,955$ mN/m), was zeigt, dass die Du Noüy-Ringmethode die Grenzflächenspannung mit vergleichbarer Genauigkeit misst. Die fotografische Darstellung des E80-

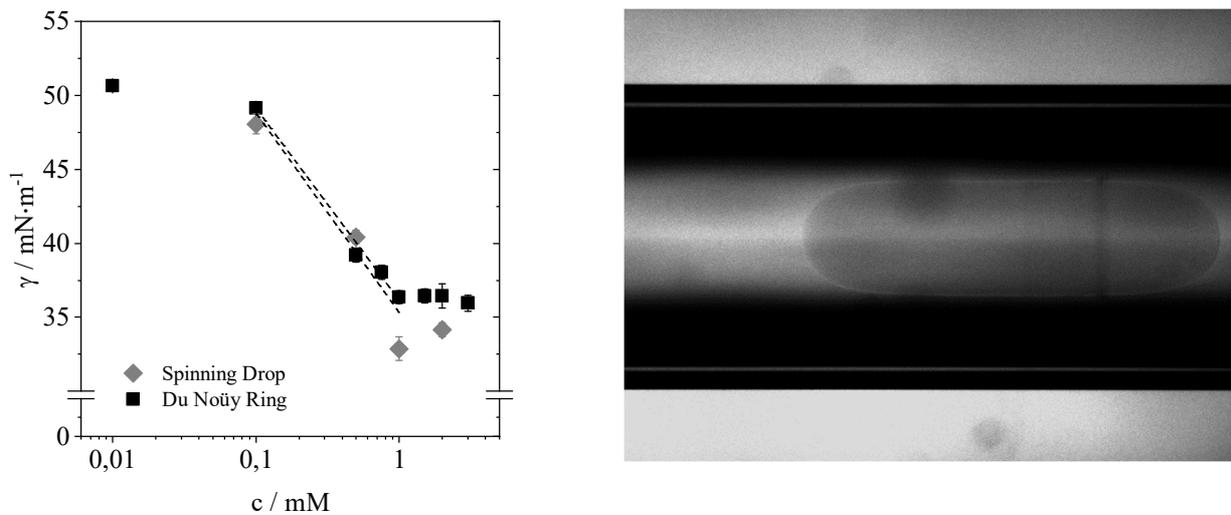


Abbildung 4.8 Links: Vergleich zwischen der Du Noüy-Ringmethode mit dem Spinning Drop Tensiometer für das Phospholipid E80, welches keine Phasenübergänge ausbildet. Rechts: Fotografische Darstellung eines Tropfens einer 5 mM E80 Stammsuspension in der Kanüle des Spinning Drop Tensiometers. Durch die wirkenden Zentrifugalkräfte zieht sich dieser in die Länge.

Tropfens in Abbildung 4.8 rechts verdeutlicht noch einmal die Schwierigkeit der automatischen Tropfenvermessung mit der Kamera. Mit hohen Kontrasteinstellungen ist der Tropfen dennoch visuell zu erkennen und manuell ausmessbar.

Beide Versuchsreihen von DPPC und E80 zeigen die gleichen Vor- und Nachteile in Bezug auf die jeweilige Messmethode. Obwohl die Spinning Drop Methode ebenfalls zuverlässige Daten ausgibt, liegt die Schwachstelle der Messmethode in der Dauer der Datenerhebung. Für die Bestimmung eines einzelnen Datenpunktes, bestehend aus drei unabhängigen Proben, sind drei 24 h dauernde Messungen notwendig. Die Vermessung des Tropfens nimmt zudem weitere Zeit in Anspruch. Unter Berücksichtigung der Reinigung der Kapillare ergibt sich somit eine Gesamtdauer für einen einzigen Messpunkt von >108 h. Darüber hinaus ist die Bestimmung des Umfangs, welcher zur Berechnung der Grenzflächenspannung nötig ist, manuell durchzuführen. Aufgrund der ähnlichen Brechungsindizes der hydrophilen und hydrophoben Phase ist der Kontrast äußerst gering, sodass der Umfang zu groß oder zu klein gelegt sein kann und damit die Grenzflächenspannung verfälscht.

Im Gegensatz dazu ist für die Bestimmung der Kraft zur Verformung der Grenzfläche aufgrund des Ringes kein menschliches Eingreifen notwendig und die Messung von drei Proben mittels Du Noüy-Ring dauert lediglich etwa 3×10 min (inklusive Equilibrierung für DPPC 48 h 30 min pro

Messpunkt). Die Arbeitszeit für die vollständige konzentrationsabhängige Kurve des rotierenden Tropfens ist also mehr als doppelt so lang, während die drei Wiederholungsmessungen mit dem Du Noüy-Ring alle parallel durchgeführt werden können. Die Becher sind außerhalb des Messgerätes vorzubereiten, zu lagern sowie einfach auszutauschen, wobei der Temperatursausgleich innerhalb von einer Minute vonstattengeht.

Aufgrund der Übereinstimmung der Grenzflächenspannungen, seiner deutlich höheren Zeiteffizienz und der automatischen Bestimmung der Grenzflächenspannung unabhängig vom Stoffsystem, ist die Du Noüy-Ringmethode für weitere Messungen zu bevorzugen. Besonders für Proben, deren Grenzfläche nicht visuell zu bestimmen ist, gibt es momentan keine adäquate Alternative. Da der Vergleich darüber hinaus mit der Phospholipid-Mischung (E80) durchgeführt wurde und ähnliche Ergebnisse zeigte, deutet dies darauf hin, dass sowohl natürliche Mischungen als auch reine Lipide mit dem Du Noüy-Ring gleichermaßen zu messen sind.

4.3 Einfluss der Phospholipid-Kettenlänge

Neben dem Vergleich zwischen der Du Noüy-Ringmethode und der Spinning Drop Tensiometrie unter Verwendung des Lipids DPPC sind weitere Grenzflächenspannungen zweier reiner Phospholipide, DMPC und DSPC, untersucht worden. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 erwähnt, ist die Equilibrierung für die Experimente entscheidend und vor den konzentrationsabhängigen Messungen zu evaluieren. Abbildung 4.9 zeigt links, dass sich die Equilibrierung in Abhängigkeit von der Fettsäurekettenlänge der Phospholipide ändert. Während beim DSPC die längsten Fettsäureketten vorliegen, weist DMPC die kürzesten auf. Für $c = 0,1 \text{ mM}$ zeigt DMPC bereits zwischen 24 und 48 h nur eine geringe Veränderung, wohingegen bei DPPC fast keine Änderung der Grenzflächenspannung zwischen 48 und 168 h vorliegt. DSPC benötigt eine Messdauer von 168 h, bis der Adsorptionsprozess abgeschlossen ist. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Kettenlängen der Fettsäuren den Adsorptionsprozess beeinflussen. Nach diesen Ergebnissen benötigen längere Kettenlängen (18:0 bei DSPC) mehr Zeit (168 h) zur Adsorption an die Grenzfläche, während kürzere Kettenlängen (14:0 bei DMPC) den Gleichgewichtszustand wesentlich schneller erreichen. Erwähnenswert ist die höhere Standardabweichung von DSPC ($\bar{s}_{DSPC} = 3,68 \text{ mN/m}$), die auf einen inhomogeneren Adsorptionsprozess hinweist. Dies bestätigen auch Israelachvili et al.

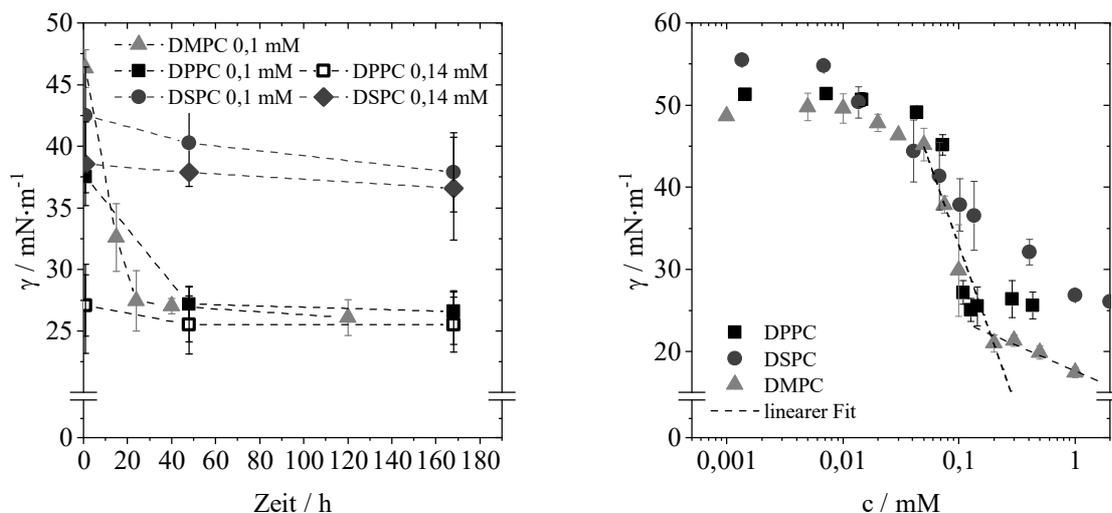


Abbildung 4.9 Links: Änderung der Grenzflächenspannung $\gamma(t)$ mit der Zeit für die Phospholipide DMPC, DPPC und DSPC, um die Equilibrierung zu bestimmen. Die Standardabweichung berechnet sich von $n = 3$ Experimenten. Rechts: Grenzflächenspannung γ für die Phospholipide DMPC, DPPC und DSPC abhängig von der Konzentration c und gemessen nach der entsprechenden Equilibrierung (24 h für DMPC, 48 h für DPPC, 168 h für DSPC). Die gestrichelte Linie impliziert die Steigung für die Bestimmung der Gibbschen Isotherme Γ , hier exemplarisch gezeigt für DMPC. Die Schnittstelle beider gestrichelten Linien, berechnet über lineare Regression, ist definiert als die CMC.

[83], welche ein Modell zur Packung von Phospholipiden in Bilayern beschreiben. Da Phosphatidylcholine zu den kegelförmigen Phospholipiden gehören, ist schnell ein Verhaken der Fettsäureketten bei lamellaren Bilayern möglich und somit auch ein inhomogener Adsorptionsprozess.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Kabalnov et al. [74], die ebenfalls ein Fluorocarbon verwendeten. In diesem Fall maßen sie die Oberflächen- und Grenzflächenspannungen zwischen der wässrigen Suspension und Perfluorooctylbromid bei 22°C . Sie schätzten, dass Kettenlängen mit mehr als 12 C-Atomen länger als einen Tag benötigen, um ein Quasigleichgewicht zu erreichen. Analog zu den hier gezeigten Ergebnissen betonen sie den Einfluss der Diffusion auf die Grenzflächenspannung. Equilibrierungen von mehr als 24 h wurden jedoch nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde von Kabalnov et al. vor der Bestimmung der Grenzflächenspannung eine Beschallung durchgeführt, die die Equilibrierung an der Grenzfläche beschleunigte. Möglicherweise entsprechen hierdurch die gemessenen Gleichgewichtsgrenzflächenspannungen nicht denen der hier untersuchten Phospholipide.

Mit der bekannten Equilibriumszeit fand die Bestimmung der Grenzflächenspannung und des Adsorptionsverhalten der untersuchten Phospholipide DMPC, DPPC und DSPC bei verschiedenen Konzentrationen statt. In Abbildung 4.9 rechts entstammt jeder Datenpunkt der spezifischen Equilibriumszeit und einem stufenweisen Anstieg der Konzentration. Die bereits diskutierten Ergebnisse von DPPC sind zum Vergleich nochmal dargestellt.

Alle Lipide zeigen konstante Grenzflächenspannungen von 49 bis 55 mN/m im Konzentrationsbereich von weniger als 0,01 mM. Diese Werte entsprechen der Grenzflächenspannung zwischen PFPH und reinem Wasser (52 mN/m). Das bedeutet, dass die Phospholipide die Grenzflächenspannung in diesem Regime nicht nennenswert beeinflussen. Je nach Phospholipid-Spezies unterscheiden sich die Grenzflächenspannungen jedoch im niedrigen Konzentrationsbereich. Mit steigender Konzentration liegen die Grenzflächenspannungen der einzelnen Phospholipide um $c \approx 0,01$ mM zunehmend aufeinander. Die Streuung der Daten zwischen drei unabhängigen Messungen korreliert im mittleren Konzentrationsbereich mit dem bereits beschriebenen zweiphasigen Ko-Existenzbereich zwischen ca. 40 und 27 mN/m. Außerhalb der Ko-Existenz einer flüssigen und einer festen Phase bildet sich nur eine Phase (flüssig für > 40 mN/m und fest für < 27 mN/m) aus. Im Diagramm weißt dieser Bereich sehr kleine Fehlerbalken auf. Daraus ist zu schließen, dass die Streuung der Daten zwischen unabhängigen Messungen nicht auf die Messtechnik zurückzuführen ist, sondern auf die mangelnde Reproduzierbarkeit der Probenpräparation im Zweiphasenbereich. Die Variation der Mikrostruktur der flüssigen und festen Phase im Zweiphasenbereich verursacht hier die Abweichungen.

Sprunghaft tritt bei DMPC und DPPC die Abnahme der Grenzflächenspannung mit zunehmender Konzentration c auf, begründet mit dem bereits diskutierten Ko-Existenzbereich. Dies kann zu einer möglichen Ungenauigkeit der berechneten CMC führen (vgl. Tabelle 4.3). Die Berechnung der CMC basiert auf der Schnittstelle der Steigungslinie aus dem Abfall der Grenzflächenspannung und der linearen Regression der Datenpunkte des Plateaus. Ein besonders steiler Abfall resultiert in einem Schnittpunkt, der bei deutlich niedrigeren Konzentrationen liegt und daher kritisch zu betrachten ist. Im Gegensatz dazu ist der Abfall der Grenzflächenspannung durch DSPC weniger stark ausgeprägt, bedingt durch die sterische Hinderung der Fettsäureketten während des Adsorptionsprozesses. Dies führt zu einer deutlich höheren CMC von 0,998 mM.

Tabelle 4.3: Kritische Mizellkonzentration (CMC) und geringste Grenzflächenspannung $\gamma_{\min} \pm s$ mit $n = 3$ Experimenten der untersuchten Phospholipide, gemessen mit der Du Noüy-Ringmethode. Die Grenzflächenkonzentration Γ und die minimale Fläche pro Phospholipidmolekül A_{\min} , berechnen sich aus der Steigung.

Phospholipid	CMC / mM	$\gamma_{\min} \pm s /$ mN m ⁻¹	$\Gamma / \text{mol m}^{-2}$	$A_{\min} / \text{Å}^2$
DMPC	0,185	17,42 ± 0.62	$7,24 \cdot 10^{-6}$	22,94
DPPC	0,136	25,03 ± 1.40	$8,27 \cdot 10^{-6}$	20,08
DSPC	0,998	26,03 ± 0.01	$2,50 \cdot 10^{-6}$	67,51

Die niedrigste gemessene Grenzflächenspannung für DPPC beträgt 25,03 mN/m bei einer Konzentration von 0,12 mM. Bei DMPC sinkt die Grenzflächenspannung noch weiter ab (17,42 mN/m bei einer Konzentration von 1 mM). Für DSPC ergibt sich die niedrigste ermittelte Grenzflächenspannung von 26,03 mN/m bei einer Konzentration von 2 mM. Sterische Abstoßung der Kohlenwasserstoffketten ist wahrscheinlich die Ursache für den Unterschied in der Grenzflächenspannung, wie es auch für die Equilibriumszeit der Phospholipide zu beobachten ist. Darüber hinaus führen längere Kettenlängen offensichtlich zu höheren Gleichgewichts-Grenzflächenspannungen, was wahrscheinlich auf eine abnehmende Grenzflächenpenetration zurückzuführen ist. Dies wiederum führt zu niedrigeren Grenzflächenkonzentrationen, wie auch von Kabalnov et al. beobachtet [74]. Die Autoren betonen, dass die Grenzflächenspannungen mit zunehmender Kettenlänge abnehme, gleichzeitig aber Kettenlängen, die länger als $(C_{13})_2PC$ sind, den Trend nicht fortsetzen. Gleichgewichtsexperimente für Fettsäureketten, die länger als $(C_{13})_2PC$ sind, führten bei Kabalnov et al. zu keinem erfolgreichen Ergebnis, sodass Gleichgewichts-Grenzflächenspannungen für lange Fettsäureketten bisher nicht zu bestimmen sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Grenzflächenspannungen auch bei längeren Fettsäurekettenlängen als C_{13} messbar sind und eine Gleichgewichtseinstellung möglich ist. Allerdings nehmen diese Messreihen (168 h = 7 Tage = $0,6 \times 10^6$ s) eine deutlich längere Zeitspanne in Anspruch als sie in den Versuchsaufbauten von Kabalnov et al. zu finden ist [74].

Neben der Bestimmung der CMC und der niedrigsten erreichbaren Grenzflächenspannung ermöglicht die Auftragung des Grenzflächenspannungs-Konzentrations-Diagramms die Bestimmung der Grenzflächenkonzentration Γ über die Gibbsche Adsorptionsisotherme:

$$\Gamma = -\frac{c_0}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial c_0} \right)_{p,T} = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln c_0} \right)_{p,T}. \quad (4.5)$$

Hier ist c_0 die Konzentration der Phospholipide, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Aus der Grenzflächenkonzentration lässt sich über die Avogadro-Konstante N_A die minimale Fläche pro Molekül A_{min} bestimmen:

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma N_A} . \quad (4.6)$$

Die Berechnung der Grenzflächenkonzentration Γ und der daraus resultierenden Fläche A_{min} pro Phospholipidmolekül nach den Gleichungen (4.5) und (4.6) ist aus der jeweiligen Veränderung der Grenzflächenspannung des γ über c_0 -Diagramms möglich und in Tabelle 4.3 aufgelistet. Abbildung 4.9 links weist die Schwierigkeiten der Berechnungsmethode auf: Aufgrund des bereits starken Abfalls der Grenzflächenspannung und der daraus resultierenden Steigung, welche der Flächenbestimmung zugrunde liegt, ergibt sich für die Phospholipide DMPC und DPPC eine verhältnismäßig kleine Fläche von 23 bzw. 20 Å². In der Literatur beschreiben Li et al. [68] die mittlere Fläche von DPPC mit 61 Å², Toimil et al. [84] mit 55,1 Å² und Hildebrandt et al. [69] mit 40 Å². Ähnliche Flächen sind für das Phospholipid DMPC in der Literatur hinterlegt (53,2 Å² [85] bzw. 61,2 Å² [86]). Für beide Lipide ist die mittlere Fläche somit mehr als doppelt so groß wie die hier bestimmten Größen. Die gemessene Fläche für DSPC in dieser Arbeit stimmt mit der Literatur weitgehend überein (Chou und Chu [87], 60 Å²). Dies liegt an dem flachen Abfall der Grenzflächenspannung im mittleren Konzentrationsbereich statt der sprunghaften Änderung, wie sie bei DMPC und DPPC auftritt. Grundsätzlich ist die Bestimmung mittels γ vs. c_0 Diagramm und der Du Noüy-Ring Tensiometrie also möglich, jedoch aufgrund der sprunghaften Änderung der Grenzflächenspannung, insbesondere für DMPC und DPPC, ungenau.

Die Temperatur stellt einen weiteren Faktor dar, der Einfluss auf die Grenzflächenspannung und somit den Adsorptionsprozess nehmen kann [88]. Die bis hier diskutierten Messungen fanden bei 20°C statt. Höhere Temperaturen, die auch oberhalb der Übergangstemperatur der jeweiligen Phospholipide liegen, sind nachfolgend diskutiert.

4.4 Temperatureinfluss auf die Grenzflächenspannung

Jedes Phospholipid besitzt eine so genannte Übergangstemperatur T_c , bei der sich ihr Zustand ändert. Unterhalb dieser Temperatur zeigen sich die Phospholipid-Mono- oder Bischichten in einem gelartigen und schlecht beweglichen Zustand, während sie oberhalb dieser Temperatur an Beweglichkeit gewinnen und eine flüssigere Konstitution erreichen. Durch die erhöhte Fluidität verändert sich auch der Anlagerungsprozess an die Grenzfläche. Grundsätzlich besitzen Phospholipide mit langen, gesättigten Fettsäureketten eine höhere Übergangstemperatur als kurzkettenige, ungesättigte Phospholipide. Jedoch fällt dieses Verhalten mit zunehmender Kettenlänge nicht gleichermaßen ins Gewicht [89]. Neben der Kettenlänge spielt vor allem auch der Sättigungsgrad der Fettsäuren, die Kopfgruppe sowie die Reinheit der Lipide eine Rolle. So ist gerade bei natürlichen Phospholipiden mit größeren Unreinheiten und unterschiedlichen Lipiden im Gemisch die Übergangstemperatur nicht exakt zu bestimmen, sondern zeigt sich stattdessen als Temperaturbereich [90,91].

Aufgrund des Temperatureinflusses auf die Konformität der Phospholipide ist eine Überprüfung des Einflusses auf die Grenzflächenspannung notwendig. Entsprechend der vorangegangenen Untersuchungen ist auch hier die zeitabhängige Messung zum Erreichen des Quasi-Gleichgewichtszustands durchzuführen, um folgend die Grenzflächenspannung konzentrationsabhängig zu bestimmen. Tabelle 4.4 zeigt die vom Hersteller angegebenen Übergangstemperaturen der drei Phospholipide. Anhand der Übergangstemperatur lässt sich bereits erahnen, dass die unterschiedlichen Kettenlängen eine Temperaturabhängigkeit der Grenzflächenspannung zur Folge haben. Aufgrund seiner Übergangstemperatur bei 24°C und damit der Nähe zur Raumtemperatur, kam das Lipid DMPC für die Untersuchungen in Abbildung 4.10 nicht zum Einsatz.

Tabelle 4.4: Übergangstemperatur T_c der jeweiligen Phospholipide sowie die untersuchten Temperaturen T unterhalb ($T < T_c$) und oberhalb ($T > T_c$) der Übergangstemperatur für die Phospholipide DPPC und DSPC.

Phospholipid	$T_c / ^\circ\text{C}$	$T < T_c / ^\circ\text{C}$	$T > T_c / ^\circ\text{C}$
DMPC	24	-	-
DPPC	41	36	48
DSPC	55	48	60

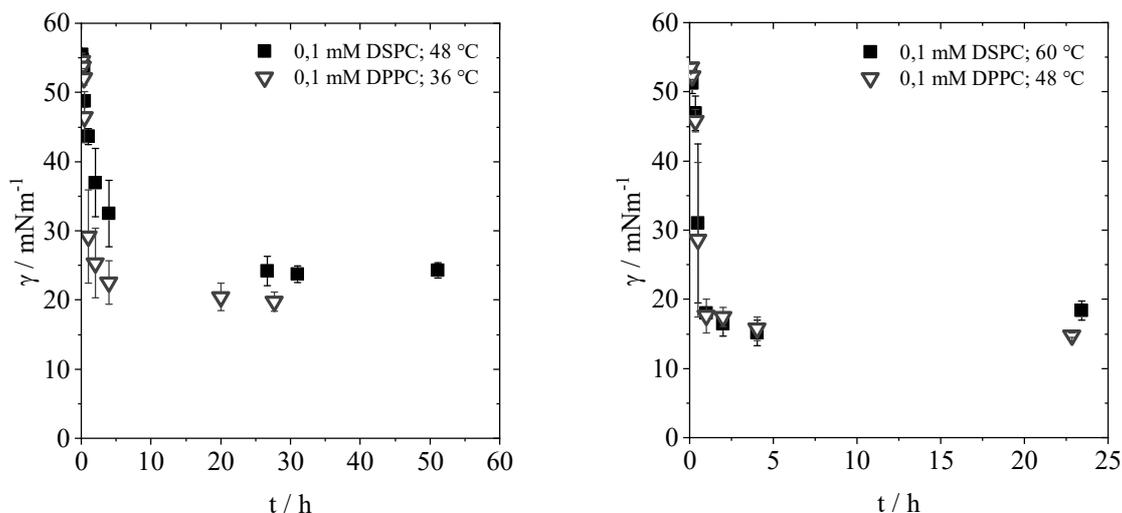


Abbildung 4.10: Grenzflächenspannung γ als Funktion der Zeit t in Abhängigkeit von der Temperatur für die Phospholipide DPPC und DPSC bei einer Konzentration von 0,1 mM. Links: Einstellung des Quasi-Gleichgewichts **unterhalb** der jeweiligen Übergangstemperatur T_c . Rechts: Einstellung des Quasi-Gleichgewichts **oberhalb** der jeweiligen Übergangstemperatur T_c . Es sei auf die unterschiedliche Zeitspanne der x-Achse hingewiesen.

Um den Temperatureinfluss effektiv messtechnisch zu erfassen, wurden für die untersuchten Phospholipide eine Temperaturdifferenz von 5 °C unterhalb der T_c von DPPC und 5 °C oberhalb der T_c von DSPC festgelegt. Zudem erfolgte ein direkter Vergleich beider Phospholipide bei 48 °C. Somit liegen Messreihen für beide Lipide unterhalb (Abbildung 4.10 links) und oberhalb (Abbildung 4.10 rechts) der Übergangstemperatur vor.

Für beide Lipide liegt die Grenzflächenspannung zu Beginn bei 55 mN/m, entsprechend der Grenzflächenspannung zwischen dem Fluorocarbon und reinem Wasser. Diese Beobachtung ist unabhängig von der vorherrschenden Temperatur. Innerhalb der ersten 10 Stunden sinkt die Grenzflächenspannung beider Phospholipide ab. Im Vergleich erreicht DPPC schlussendlich einen niedrigeren Endwert von 19,5 mN/m als DSPC mit 24,2 mN/m (Abbildung 4.10 links). Analog zu den bereits beschriebenen Ergebnisse in Kapitel 4.3 geht die ausgeprägte Absenkung der Grenzflächenspannung durch DPPC mit der geringen sterischen Hinderung einher. Anfänglich, wenn kleine Messdauern einen großen Einfluss auf die Änderung der Grenzflächenspannung haben, sind größere Fehlerbalken zu erkennen als im Endzustand. Die Phospholipide sind unterhalb der Übergangstemperatur nach wie vor in einem gelartigen und schlecht beweglichen Zustand, sodass der Anlagerungsprozess inhomogen verläuft. Daraus resultieren größere Unterschiede in der gemessenen Grenzflächenspannung und höhere Standardabweichungen. Dennoch zeigen die

Ergebnisse im Vergleich zu 20°C, dass bereits eine leichte Temperaturerhöhung zu einem schnelleren Anlagerungsprozess führt.

Mit Erhöhen der Temperatur oberhalb der jeweiligen T_c (Abbildung 4.10 rechts) beschleunigt sich der Adsorptionsprozess erneut. Die Grenzflächenspannung beider Phospholipide verringert sich innerhalb von weniger als einer Stunde auf unter 20 mN/m und erreicht einen Minimalwert von $14,8 \pm 0,33$ mN/m (DPPC) bzw. $18,4 \pm 1,4$ mN/m (DSPC). Bereits nach einer Stunde weisen die gemessenen Werte eine geringe Standardabweichung auf. Dies weist auf einen abgeschlossenen Adsorptionsprozess hin. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass unabhängig von der Kettenlänge bei Temperaturen oberhalb der T_c die Messergebnisse beider Phospholipide aufeinanderliegen. Im Zustand hoher Beweglichkeit hat demnach die Kettenlänge keinen Einfluss auf die Grenzflächenspannung. Durch die erhöhte Fluidität der Phospholipide findet eine schnellere Adsorption an die Grenzfläche statt. Gleichzeitig erhöht sich durch die höhere Temperatur die Diffusionsgeschwindigkeit und beschleunigt somit den Anlagerungsprozess. Die sterische Hinderung durch die Fettsäureketten ist nicht mehr zu erkennen, da die hohe Beweglichkeit der vorherrschende Mechanismus ist.

Demzufolge sind niedrigere Equilibriumszeiten bei höheren Temperaturen möglich. Ein direkter Vergleich der Equilibriumszeiten bei den untersuchten Temperaturen in Abbildung 4.11 veranschaulicht die Verkürzung des Anlagerungsprozesses. Für das Lipid DPPC sind bei 20°C 48 h notwendig, bis das Gleichgewicht erreicht ist. DSPC benötigt bei 20°C jedoch 168 h. Oberhalb der T_c kann die Equilibriumszeit bei beiden Lipiden auf 24 h reduziert werden. Dies ist in der flüssigeren Konstitution begründet.

Für die Durchführung der konzentrationsabhängigen Messungen bei höheren Temperaturen sorgte die kürzere Equilibrierung für eine Beschleunigung der Versuchsdurchführung. Auch bei höheren Temperaturen ist die anfängliche Grenzflächenspannung bei sehr niedrigen Konzentrationen $c < 0,01$ mM im Wertebereich von reinem Wasser und PFPH. Mit erhöhter Lipid-Menge sinkt die Grenzflächenspannung erwartungsgemäß ab. Abbildung 4.12 verdeutlicht links, dass DPPC unterhalb von T_c einen Minimalwert von 19,3 mN/m ($c = 0,1$ mM) erreicht, während der Minimalwert für DSPC bei 24,2 mM liegt ($c = 0,7$ mM). Diese Ergebnisse stimmen mit den Versuchen bei 20°C aus Kapitel 4.3 überein. Das bedeutet, dass zwar die Dynamik der Anlagerung durch die Temperatur beeinflusst wird, nicht aber die Gleichgewichts-Grenzflächenspannung, so-

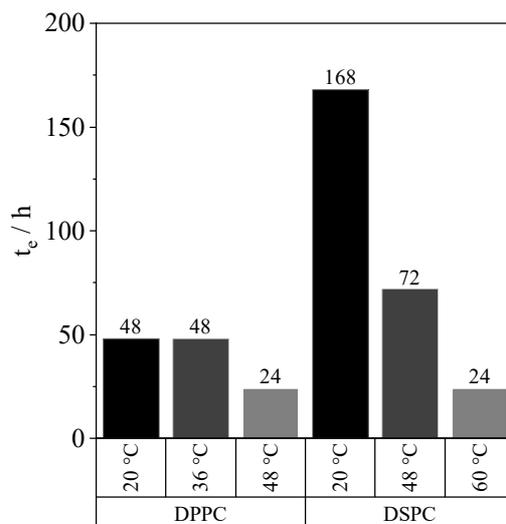


Abbildung 4.11: Vergleich der erforderlichen Zeit für die Equilibrierung t_e der Phospholipide DPPC und DSPC bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Equilibrierzeit ist jeweils oberhalb des Balkens als Zahl dargestellt.

fern die Phospholipid-Monoschichten ihren gelartigen Zustand unterhalb der T_c nicht verlassen. Oberhalb von T_c , wie in Abbildung 4.12 rechts gezeigt, stellen sich deutlich niedrigere Gleichgewichts-Grenzflächenspannungen ein. Der Verlauf beider Phospholipide überlappt oberhalb der jeweiligen T_c und zeigt einen starken Abfall der Grenzflächenspannung für beide Phospholipide auf 13,7 mN/m für DPPC ($c = 0,5$ mM) bzw. auf 14,3 mN/m für DSPC ($c = 0,075$ mM). Die Kettenlänge und die sterische Hinderung haben oberhalb der T_c keinen Einfluss mehr, da die erhöhte Fluidität ein engeres Zusammenlagern der Lipide erlaubt. Somit sorgt die höhere Phospholipidbeweglichkeit nicht nur für die Beschleunigung des Anlagerungsprozesses, sondern auch für ein Herabsetzen der minimalen Grenzflächenspannung.

Die an der Grenzfläche erhöhte Phospholipid-Interaktion zeigt sich vor allem auch in der berechneten hohen Gibbschen Adsorptionsisothermen und somit in der sehr kleinen Fläche pro Molekül. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 aufgelistet. Die aus der Steigung nach den Gleichungen (4.5) und (4.6) berechnete Fläche pro Molekül sinkt für beide Phospholipide oberhalb der T_c auf etwa 5 \AA^2 ab. Berechnungen von Li et al. [68], welche die Fläche pro Molekül von DPPC an Chloroform berechneten, zeigen für DPPC eine Fläche von 61 \AA^2 . Auch Hildebrandt et al. [69] berichten von einer Fläche von 41 \AA^2 , ein Wert, der ebenfalls weit von den hier dargestellten Ergebnissen abweicht. Die Diskrepanz ist vermutlich der ungeeigneten Berechnungsmethode für diesen Fall zuzuschreiben. Der Abfall der Grenzflächenspannung geht sehr schnell vonstatten und ist zeitlich

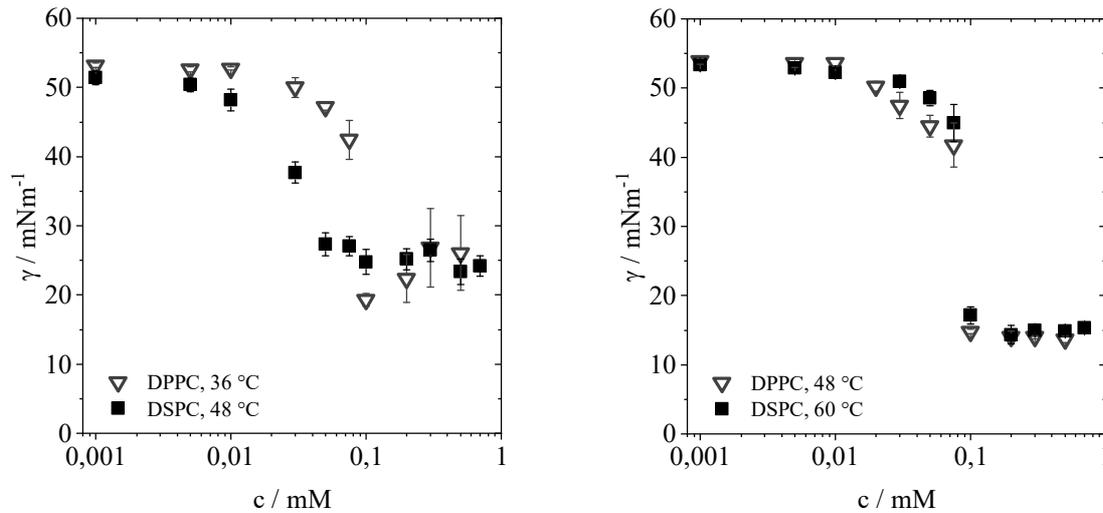


Abbildung 4.12: Änderung der Grenzflächenspannung γ über die Konzentration c der Phospholipide DPPC und DSPC bei verschiedenen Temperaturen. Links: Änderung der Grenzflächenspannung unterhalb der jeweiligen Übergangstemperatur T_c . Rechts: Änderung der Grenzflächenspannung oberhalb der jeweiligen T_c .

nicht entsprechend aufzulösen. Die resultierende Steigung führt daher zu einer kleinen Fläche pro Molekül. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Phospholipide in Doppel- oder Dreifachlipidschicht an der Grenzfläche vorliegen [92,93]. Eine Alternative Berechnungsmethode stellen Li, Miller und Möhwald [68] vor. Sie nutzen statt der konzentrationsabhängigen Berechnung der minimalen Fläche einen zeitabhängigen Ansatz aus dem Erreichen des Quasi-Gleichgewichts. Dazu ist die Gleichgewichtsgrenzflächenspannung gegen unendlich extrapoliert und für eine Konzentration aufgetragen. Im folgenden Kapitel findet eine Betrachtung dieser Berechnungsweise für die Bestimmung der Fläche pro Molekül und der Vergleich mit der konzentrationsabhängigen Berechnung statt.

Tabelle 4.5: Vergleich der CMC in mM und der Mindestfläche A_{min} pro Molekül in \AA^2 sowie die minimale gemessene Grenzflächenspannung γ_{min} für die untersuchten Phospholipide DPPC und DSPC jeweils unter- und oberhalb der Übergangstemperatur T_c .

Phospholipid (Temperatur)	CMC / mM	$A_{min} / \text{\AA}^2$	$\gamma_{min} \pm \bar{s} / \text{mN m}^{-1}$
DPPC (36°C)	0,100	5,3	$19,31 \pm 0,93$
DPPC (48°C)	0,101	4,7	$13,67 \pm 0,45$
DSPC (48°C)	0,101	41,6	$24,16 \pm 1,47$
DSPC (60°C)	0,103	4,7	$14,34 \pm 1,34$

4.5 Konzentrations- und zeitabhängige Berechnung der Fläche pro Molekül

Grundsätzlich erfolgt die Bestimmung der Fläche pro Molekül A_{min} aus der Grenzflächenkonzentration Γ (vgl. Gleichung (4.6)). Diese kann wiederum auf unterschiedliche Art und Weise berechnet werden. Im vorherigen Kapitel erfolgte die Berechnung der Grenzflächenkonzentration aus der Steigung eines Grenzflächenspannungs-Konzentrations-Diagramms mit Hilfe der Gleichung (4.5). Wie bereits diskutiert liegt die Problematik dieser konzentrationsabhängigen Berechnung bei hohen Temperaturen in der schwierigen Auflösung der anfänglichen Veränderung der Grenzflächenspannung. Die daraus resultierende Steigung führt zu besonders kleinen Flächen pro Molekül. Die Grenzflächenkonzentration ist alternativ auch über einen zeitabhängigen Ansatz zu bestimmen. Li, Miller und Möhwald [68] verfolgen diesen Ansatz bei der Berechnung der Fläche pro Molekül und extrapolieren die Gleichgewichtsgrenzflächenspannung. Dazu wird eine zeitabhängige Messung der Grenzflächenspannung bei einer bestimmten Konzentration c herangezogen. Als Ergebnis der zeitabhängigen Berechnungsweise ergibt sich der Diffusionskoeffizient D als charakteristische Größe für den Adsorptionsprozess der Phospholipide. Entsprechend der Darstellung in Abbildung 4.13 links findet hierzu eine Auftragung der gemessenen Grenzflächenspannung γ über \sqrt{t} statt. Für die Phospholipide DPPC und DSPC ist der Anlagerungsprozess oberhalb und unterhalb der jeweiligen Übergangstemperatur und bei einer Konzentration von 0,1 mM gezeigt. Der Diffusionskoeffizient berechnet sich aus der Steigung $d\gamma/d\sqrt{t}$, welche den anfänglichen Abfall der Grenzflächenspannung beschreibt. Mathematisch ergibt sich der diffusionskontrollierte Adsorptionsmechanismus nach Ward und Tordai [94] zu

$$\left[\frac{d\gamma}{d\sqrt{t}} \right] = -2RTc_0 \sqrt{\frac{D}{\pi}}, \quad (4.7)$$

mit R als universelle Gaskonstante, T als absolute Temperatur und c_0 als Tensid-Konzentration. Durch Umstellen der Gleichung ergibt sich der Diffusionskoeffizient für das jeweilige Phospholipid bei entsprechender Temperatur. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Für die Bestimmung der Grenzflächenkonzentration Γ mittels zeitabhängiger Methode ist das Erreichen des Gleichgewichtszustandes notwendig. Dazu erfolgt die Auftragung der Grenzflächenspannung γ über $1/\sqrt{t}$ (Abbildung 4.13 rechts) Die Darstellungsweise ist bereits aus Kapitel 4.3 bekannt, wurde dort allerdings lediglich für die Bestimmung der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung

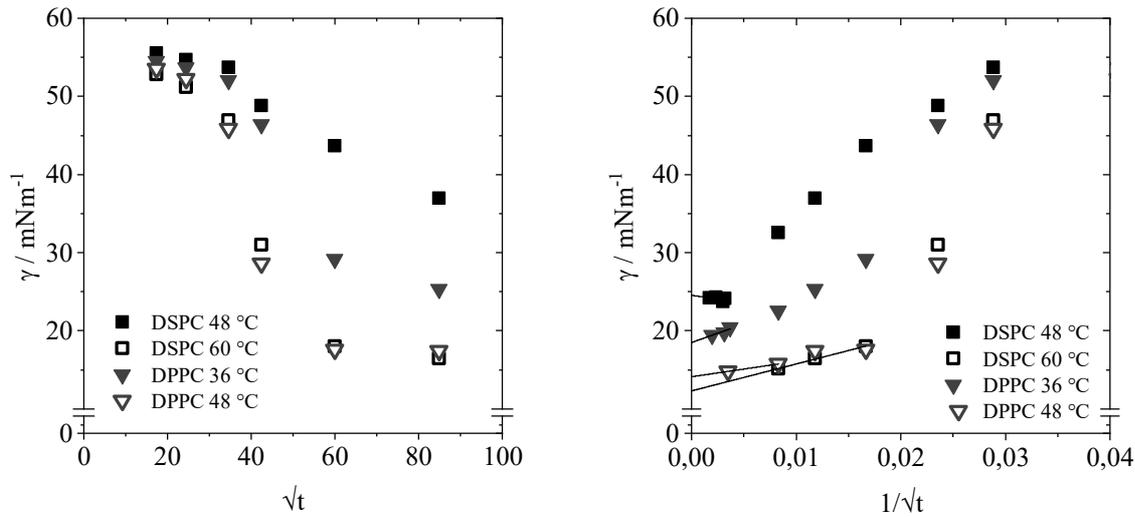


Abbildung 4.13: Links: Auftragung der Grenzflächenspannung $\gamma(t)$ gegen \sqrt{t} zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der Phospholipide DPPC und DSPC jeweils oberhalb und unterhalb der Übergangstemperatur bei einer Konzentration von 0,1 mM. Rechts: Auftragung der Grenzflächenspannung $\gamma(t)$ gegen $1/\sqrt{t}$ zur Bestimmung der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung durch Extrapolation für die Phospholipide DPPC und DSCP unter- und oberhalb der Übergangstemperatur bei einer Konzentration von jeweils 0,1 mM.

herangezogen. Die Hansen-Joos Gleichung beschreibt mathematisch die Extrapolation von $t \rightarrow \infty$ zur Bestimmung der Grenzflächenkonzentration

$$\left[\frac{d\gamma}{d(1/\sqrt{t})} \right]_{t \rightarrow \infty} = \frac{RT\Gamma^2}{c_0} \sqrt{\frac{\pi}{4D}} \quad (4.8)$$

und ist in Abbildung 4.13 rechts dargestellt. Die Gleichgewichtsgrenzflächenspannung ist für die Phospholipide DPPC und DSPC oberhalb und unterhalb der Übergangstemperatur und bei einer Konzentration von 0,1 mM bestimmt. Die Steigung $d\gamma/d(1/\sqrt{t})$ berechnet sich aus dem linearen Fit der niedrigsten gemessenen Grenzflächenspannungen, extrapoliert gegen unendlich. Aus Gleichung (4.8) lässt sich über die berechnete Grenzflächenkonzentration Γ und der Avogadro-Konstante N_A die minimale Fläche pro Molekül A_{min} nach Gleichung (4.6) bestimmen. Die Berechnung der Grenzflächenkonzentration über die zeitabhängige Methode hat den Vorteil, dass Schwankungen aufgrund des Adsorptionsprozesses auszuschließen sind. Da der Adsorptionsprozess zu Anfang stattfindet, ist dieser nicht ausreichend genau aufzulösen. Der Vergleich beider Methoden zeigt daher, dass über die konzentrationsabhängige Berechnungsweise eine deutlich unterschätzte Fläche pro Molekül berechnet wird, während die Extrapolation als Grundlage sowohl für DPPC als auch für DSPC Flächen ausgibt, die mit Literaturwerten zu vergleichen sind.

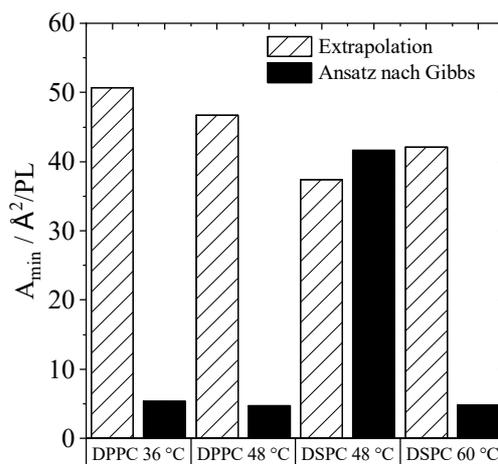


Abbildung 4.14: Vergleich der Fläche pro Molekül A_{min} für die Phospholipide DPPC und DSPC jeweils oberhalb und unterhalb der Übergangstemperatur. Dargestellt als gestrichelte Balken ist der Ansatz über die Extrapolation der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung $t \rightarrow \infty$ zur Bestimmung der Isothermen und die daraus berechnete Fläche nach Li, Miller und Möhwalde [68]. In schwarz aufgetragen ist die Berechnung der Isothermen über die Steigung bei konzentrationsabhängiger Auftragung der Grenzflächenspannung.

Die berechneten Flächen pro Molekül mittels zeit- und konzentrationsabhängiger Methode für die Phospholipide DPPC und DSPC sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Für jedes Phospholipid fand die Berechnung jeweils oberhalb und unterhalb der Übergangstemperatur statt. Gestrichelte Balken zeigen den Ansatz der Extrapolation. Die daraus berechnete Fläche pro DPPC Molekül beträgt 50,6 bzw. 46,7 Å² (bei 36 bzw. 48°C), für DSPC ergibt sich an einer Grenzfläche zwischen PFPH und einer Lipid-Suspension eine minimale Fläche von 37,3 bzw. 42,1 Å² (48 und 60°C). Diese Werte stimmen beispielsweise mit den experimentellen Daten von Hildebrandt et al. weitgehend überein (42 Å² für DPPC) [69]. Darüber hinaus ist ein Unterschied der berechneten Flächen trotz unterschiedlicher Temperaturen als Versuchsgrundlage mit < 5 Å² sehr gering, so dass die zeitabhängige Berechnungsweise deutlich bessere Ergebnisse liefert. Überraschend ist die Übereinstimmung beider Methoden für die berechnete Fläche von DSPC bei 48°C. Die Vermutung liegt nahe, dass die Temperaturerhöhung die sterische Hinderung durch die Fettsäureketten nicht gänzlich kompensiert. Der Adsorptionsprozess ist daher langsam genug, um diesen in der konzentrationsabhängigen Berechnungsweise messtechnisch aufzulösen und führt somit nicht zu einer Unterschätzung der berechneten Fläche.

Der Datenvergleich in Tabelle 4.6 zeigt darüber hinaus, dass im Rahmen der Standardabweichung die extrapolierte Gleichgewichtsgrenzflächenspannung als auch die minimale Grenzflächenspannung aus der konzentrationsabhängigen Auftragung übereinstimmen. Somit ist die Annahme der minimalen Fläche pro Molekül über den $\gamma - 1/\sqrt{t}$ - Graphen verlässlich. Für die Einordnung des Diffusionskoeffizienten, welcher anfangs mittels Gleichung (4.7) berechnet wurde, ist im Folgenden der translaterale Diffusionskoeffizient nach Stokes-Einstein zum Vergleich berechnet. Die Berechnung ist hier am Beispiel von DPPC gezeigt. Der zugrundeliegende hydrodynamische Durchmesser des DPPC- Moleküls von $R_h = 5,06 \text{ \AA}$ ist der Publikation von Walder et al. entnommen [95]. Der Diffusionskoeffizient berechnet sich nach

$$D^{SE} = \frac{k_b T}{6\pi \eta_{kont.} R_h}, \quad (4.9)$$

mit k_b als die Boltzmann-Konstante, T der jeweiligen Temperatur und $\eta_{kont.}$ der dynamischen Viskosität der kontinuierlichen Phase (Wasser). Damit ergeben sich folgende Diffusionskoeffizienten für DPPC bei verschiedenen Temperaturen: $D^{SE}_{36^\circ\text{C}} = 6,15 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, $D^{SE}_{48^\circ\text{C}} = 7,55 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ und $D^{SE}_{60^\circ\text{C}} = 1,03 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Die experimentell bestimmten Koeffizienten liegen im selben Größenbereich und sind erwartungsgemäß größer bei erhöhter Temperatur. Die Kettenlänge selbst führt zu einem größeren Diffusionskoeffizienten bei kürzerer Fettsäurekette, sodass trotz der deutlich geringeren sterischen Hinderung bei hoher Temperatur diese nicht gänzlich auszuschließen ist.

Tabelle 4.6: Tabellarischer Vergleich des Diffusionskoeffizienten D aus der Extrapolation sowie die berechnete minimale Fläche pro Molekül $A_{min,E}$ aus der Extrapolation und $A_{min,Gibbs}$ aus der konzentrationsabhängigen Berechnungsweise. Vergleich der Gleichgewichtsgrenzflächenspannung γ_e für $t \rightarrow \infty$ für die Phospholipide DPPC und DSPC bei einer Konzentration von 0,1 mM, jeweils unter- und oberhalb der Übergangstemperatur und der minimalen Grenzflächenspannung γ_{min} aus den experimentellen Daten.

Phospholipid (Temperatur)	$D / \text{m}^2 \text{ s}^{-1}$	$A_{min, E} / \text{\AA}^2$	$A_{min, Gibbs} / \text{\AA}^2$	$\gamma_e \pm \bar{s} / \text{mN m}^{-1}$	$\gamma_{min} \pm \bar{s} / \text{mN m}^{-1}$
DPPC (36°C)	$2,43 \times 10^{-13}$	50,6	5,3	$18,50 \pm 0,72$	$19,31 \pm 0,93$
DPPC (48°C)	$2,30 \times 10^{-12}$	46,7	4,7	$14,11 \pm 0,00$	$13,67 \pm 0,45$
DSPC (48°C)	$1,14 \times 10^{-13}$	37,4	41,6	$24,53 \pm 0,60$	$24,16 \pm 1,47$
DSPC (60°C)	$1,23 \times 10^{-12}$	42,1	4,7	$12,31 \pm 0,10$	$14,34 \pm 1,34$

Aufgrund der vorliegenden Daten ist für die Bestimmung der Fläche pro Molekül daher die Methode nach Li, Miller und Möhwald [68] zu bevorzugen. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Phospholipide Ko-Existenzen zwei verschiedener Zustände in dem Konzentrationsbereich aufweisen, welcher für die Bestimmung nach Gibbs heranzuziehen ist. Auch für zu schnelle Anlagerungsprozesse, welche nicht entsprechend genau aufzulösen sind, bietet der zeitabhängige Berechnungsansatz die bessere Alternative.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Untersuchung der Du Noüy-Ringmethode zur Messung von Grenzflächenspannungen zwischen einer wässrigen Phospholipid-Suspension und dem Fluorocarbon PFPH konzentrierte sich auf deren Validität und mögliche Schwierigkeiten der Messgenauigkeit. Messtechnische Artefakte können durch den physischen Kontakt des Du Noüy-Rings mit der Grenzfläche und seiner Störung der Phospholipid-Monoschicht sowie durch die Relaxationsphase entstehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das gemessene System eine gewisse Zeit braucht, um sich von der physikalischen Störung zu regenerieren. Der Ring hat allerdings nur eine kurzfristige, jedoch keine mittel- oder langfristige Wirkung auf die Grenzfläche und stört die Schicht der Phospholipide lediglich reversibel. Zusätzlich dienten Messungen mit dem Spinning Drop Tensiometer als nicht-invasives, aber zeitaufwändiges Verfahren zum Vergleich. Der Du Noüy-Ring ist, insbesondere im Zusammenhang mit unbekanntem Systemen, eine sehr leistungsfähige Methode. Durch parallele Probenpräparation und einem schnellen Messprozess sind auf einfache Weise größere Datensätze zu erhalten und weitere Parameter für die Charakterisierung des Systems abzuleiten. Dies gilt insbesondere für PFPH und Wasser und ähnliche Systeme, die aufgrund nahezu identischer Brechungsindizes mit Techniken wie PAT nicht messbar sind. Die Du Noüy-Ringmethode verbleibt momentan daher als einzige praktikable Alternative.

Die Du Noüy-Methode fand Anwendung zur Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen Fluorocarbon und Wasser mit Lipiden unterschiedlicher Kettenlängen bei gleichen Kopfgruppen (DMPC und DSPC). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass längere Fettsäureketten (C_{18} PC) mehr Zeit (168 h) benötigen, um an der Grenzfläche zu adsorbieren, was wahrscheinlich auf eine

zunehmende sterische Obstruktion und hydrophobe Wechselwirkungen mit zunehmender Kettenlänge zurückzuführen ist. Das Phospholipid DMPC mit der kürzesten Kettenlänge (C_{14} PC) führt zu der niedrigsten Grenzflächenspannung von 17,42 mN/m bei Raumtemperatur.

Die Temperatur beeinflusst ebenfalls die Grenzflächenspannung und zeigt, dass die sterische Obstruktion bei langen Fettsäureketten geringer ausgeprägt ist. Dies verdeutlicht auch die vorhandenen Unterschiede im Diffusionskoeffizienten. Temperaturen unterhalb der Übergangstemperatur führen zu einem schnelleren Anlagerungsprozess im Vergleich zur Raumtemperatur, die erreichte Gleichgewichtsgrenzflächenspannung ändert sich jedoch nicht. Mit einer Temperatur oberhalb der Übergangstemperatur der Phospholipide beschleunigt sich der Adsorptionsprozess erneut. Im Gegensatz zu Temperaturen unterhalb der Übergangstemperatur geht dies gleichzeitig mit der Reduktion der minimal zu erreichende Grenzflächenspannung einher. Die Phospholipide DPPC und DSPC zeigen keinen Unterschied in ihrem Anlagerungsprozess.

Der durchgeführte Berechnungsvergleich für die minimale Fläche pro Phospholipid-Molekül weist die Grenzen der Bestimmungsmöglichkeit über die konzentrationsabhängige Methode auf und beschreibt die zeitabhängige Methode als eine gute Alternative. Aufgrund des schnellen Abfalls der Grenzflächenspannung im mittleren Konzentrationsbereich ist eine messtechnische Auflösung nicht genau genug, um daraus mittels konzentrationsabhängiger Methode die Fläche pro Molekül zu bestimmen. Darüber hinaus erschwert die Ko-Existenz der Phospholipidzustände die Genauigkeit. Der zeitabhängige Ansatz ist unabhängig davon und führt zu Flächen, die auch in der Literatur bereits beschrieben sind.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse aus den erstmals gemessenen Grenzflächenspannungen zwischen einer Phospholipid-Suspension und dem Fluorocarbon PFPH sind notwendig, um diese auf pharmazeutische Emulsionen anzuwenden und deren Eigenschaften zu optimieren. Dies ist für den angestrebten Herstellungsprozess für Liposomen über Zentrifugation von Nanoemulsion relevant. Es stellt sich die Frage, inwieweit sich die Veränderung der Eigenschaften von Emulsionen durch die Stabilisierung mit Phospholipiden auf die Transformation von Emulsionen in Liposomen nach dem Phasentransfer auswirken. Diese Fragen gilt es in den Kapiteln 5 und 6 zu beantworten.

Kapitel 5

Charakterisierung von Fluorocarbon-Emulsionen⁹

5.1 Stand der Technik und Zielsetzung

Emulsionen sind ein Mehrphasensystem, welche in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens vorkommen. Dies können beispielsweise Lebensmittel wie Milch oder verschiedene Cremes wie z. B. Sonnencreme sein [19]. Sie alle haben gemeinsam, dass eine Entmischung beider Phasen unerwünscht ist und stattdessen eine lange Haltbarkeit gewährleistet sein sollte. Die Untersuchung von Emulsionsstabilitäten, insbesondere Langzeitstabilitäten ist daher wesentlicher Bestandteil der Forschung. Dazu bestehen verschiedene Möglichkeiten, welche im Folgenden beschrieben sind.

Die Langzeitstabilität von Emulsionen ist beispielsweise gut im Zentrifugalfeld zu analysieren. Die auftretenden Instabilitätsmechanismen gehen aufgrund der Zentrifugalkräfte schneller vonstatten und ist von verschiedenen Autoren [97–99] auf diese Weise untersucht worden. Die Methode erlaubt die Umrechnung der Stabilität im Zentrifugalfeld in die Echtzeit während die Entmischungsvorgänge simultan zu beobachten sind. Die optische Zentrifuge der LUM GmbH

⁹ Inhalte dieses Abschnitts wurden in *Advanced Materials Interfaces* veröffentlicht und für die Dissertation übersetzt und angepasst [96]. K. Ullmann, M. Meier, C. Benner, G. Leneweit, H. Nirschl, “Water-in-Fluorocarbon Nanoemulsions Stabilized by Phospholipids and Characterized for Pharmaceutical Applications“, *Advanced Materials Interfaces* (1) 2021.

ermöglicht darüber hinaus, neben der gemessenen Sedimentation oder Aufräumung der Tröpfchen, die visuelle Beobachtung über die Änderung der Transmission im Zentrifugalfeld [100].

Andere Möglichkeiten zur Analyse der Emulsionsstabilität sind außerdem die mikroskopische Betrachtung, jedoch ist diese Methode auf Tropfen größer $1\ \mu\text{m}$ beschränkt. Auch die Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten ist besonders für W/O Emulsionen interessant. Die Dielektrizitätskonstante beschreibt die Wechselwirkungen des Systems untereinander, die bei Anlegen eines elektrischen Feldes entstehen können. Ändert sich die Dielektrizitätskonstante im oberen und unteren Bereich der Messzelle, deutet dies auf die Stabilitätsänderung der Emulsion hin [101]. Auch das Zeta-Potential findet häufig Anwendung zur Beschreibung der Emulsionsgüte, beruhend auf dem Einfluss der diffusen Ionenschicht um die einzelnen Teilchen. Große Potentialunterschiede $|\gt 30\ \text{mV}|$ beschreiben stabile Emulsionen [102].

Es sei darüber hinaus auf das rheologische Verhalten von Emulsionen hingewiesen, denn bei einer deutlichen Veränderung der Viskosität ist auch auf eine Änderung der Emulsion zu schließen [103]. Da die Temperatur Einfluss auf die Viskosität hat, ist im Umkehrschluss auch auf die Stabilität der Emulsion ein Einfluss zu beobachten. Quack et al. [104] führten rheologische Stabilitätsprüfungen kosmetischer Emulsionen durch: Die Temperatur beeinflusst die Stabilität, da die Reaktionskinetik zunimmt. Gleichzeitig beeinflusst die Temperatur neben der Viskosität auch andere physikalischen Eigenschaften der Materialsysteme wie die Dichte, und damit auch unter Umständen die Teilchengröße.

All diese Methoden sind für das System aus Fluorocarbon und Wasser jedoch ungeeignet: Für die Zentrifugation in Scheibenzentrifugen, welche auf Messung der Tropfen über den Brechungsindex beruht, ist die Analyse nicht möglich, da die Brechungsindizes beider Phasen quasi identisch sind. Das gleiche Problem ergibt sich bei der Anwendung der optischen Analysezentrifuge. Auch eine mikroskopische Betrachtung kommt nicht in Frage, da die Emulsionstropfen deutlich unter der Mindestgröße liegen, welche aufgrund der Wellenlänge des Lichts gegeben ist. Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) Aufnahmen sind ebenfalls aufgrund des W/O Aufbaus unmöglich, da die kontinuierliche Phase das Öl darstellt und nicht trocken kann. Die isolatorischen Eigenschaften von Fluorocarbonen führen dazu, dass keine Leitfähigkeit zu messen ist und sowohl die Dielektrizitätskonstante als auch die Messung des Zeta-Potentials keine Ergebnisse für

den Aufbau Wasser-Öl liefert. Der geringe Dispersphasenanteil verringert darüber hinaus zu einem sehr geringen Anteil die Viskosität der Emulsion, sodass auch über diesen Parameter keine Stabilitätsprüfung zu ermöglichen ist.

Neben der Stabilität ist die Tropfengröße der Nanoemulsion ein entscheidender Faktor, da aus diesen in einem weiteren Schritt die Liposomen herzustellen sind. Die Tropfen müssen klein genug für die nachgeschaltete Liposomenherstellung sein und dennoch groß genug, um eine möglichst hohe Menge an Wirkstoff einzukapseln. Die Grenzen der Tropfengröße sind auch vom eingesetzten Emulgator und dessen Eigenschaften gegeben. So zeigten die bereits untersuchten Grenzflächeneigenschaften verschiedener Phospholipid-Suspensionen und PFPH niedrigere Grenzflächenspannungen von Phospholipiden mit kürzeren Kettenlängen und einer erhöhten Temperatur. Nach dem Gibbs-Ansatz ist eine Konzentration von 150 mM notwendig, um Nanoemulsionen mit einer Tropfengröße von 200 nm zu stabilisieren, die anschließend für die Herstellung der Liposomen eingesetzt werden (vgl. Anhang A3).

Es bleiben jedoch viele Fragen offen, da das Stoffsystem der Phospholipide und Fluorocarbone im Allgemeinen und im speziellen PFPH nicht im Detail analysiert ist. Darüber hinaus sind die bereits beschriebenen Probleme - die Tröpfchengröße und die Stabilität von W/O Emulsionen - für Fluorocarbone nicht ausreichend untersucht. Obwohl von W/FC als auch FC/W Emulsionen einige wenige Studien vorliegen, stellt die Kontrolle der Tröpfchengröße und Stabilität nach wie eine Herausforderung dar. Darüber hinaus gibt es bisher noch keine Veröffentlichungen über W/FC Emulsionen, die ausschließlich Phospholipide als Emulgatoren verwenden. FC/W Emulsionen zeigen, je nach verwendetem Fluorocarbon, stabile Tröpfchengrößen für einige Wochen [105,106] und Monate [107], während W/FC Emulsionen große Tröpfchen im Mikrometerbereich aufweisen [13,108]. Die Analyse von W/FC Emulsionen bietet daher nach wie vor großes Potential für ein besseres Verständnis.

Dieses Kapitel zeigt die Charakterisierung von W/FC Nanoemulsionen, die mit PFPH als hydrophobe Phase präpariert sind. Der Einfluss verschiedener Kettenlängen und verschiedener Konzentrationen von Phospholipiden, die bereits in den tensiometrischen Messungen Anwendung fanden, sind im Folgenden auf ihre Fähigkeit getestet, Wassertröpfchen in PFPH zu stabilisieren. Zusätzlich ist das Materialsystem hinsichtlich der Messtechnik und der Schwierigkeiten, die zwischen einer Fluorocarbon- und einer Wasserphase auftreten, untersucht.

Ziel dieses Kapitels ist es, die Frage zu beantworten, ob das Materialsystem von PFPH und Phospholipiden zusätzlich zu seiner grundsätzlichen tensiometrischen Eignung auch in praktischer Hinsicht für die Herstellung von W/FC Nanoemulsionen anwendbar ist. Dazu gehört die Untersuchung, ob gängige Messsysteme wie die dynamische Lichtstreuung zur Charakterisierung geeignet ist und welche Artefakte bei den Messungen zu finden sind. Darüber hinaus soll der Vergleich mit weiteren Perfluorocarbonen zeigen, ob diese die Qualitätsansprüche zur Herstellung von Nanoemulsionen erreichen und damit prinzipiell für den weiteren Herstellungsprozess zur Verfügung stehen.

5.2 Kurzzeitstabilität von Nanoemulsionen

Für ein besseres Verständnis der Fluorocarbon-Nanoemulsionen ist deren Stabilität zu bewerten. Das Fluorocarbon und die Phospholipid-Suspension sind dazu mittels Sonotrode zu emulgieren (vgl. Abschnitt 2.3.2). Ein Effekt, der direkt nach der Emulgierung und später über einen Zeitraum von mehreren Wochen auftreten kann, ist die Änderung der Tropfengröße. Für eine mit DPPC stabilisierte Nanoemulsion ist eine detaillierte Entwicklung der Tröpfchengröße direkt nach der Ultraschallbeschallung durch die DLS aufgenommen. Über die Intensitätsfluktuation, welche aufgrund der Tropfenbewegung auftritt, erlaubt die DLS die Bestimmung der Tropfengröße.

In Abbildung 5.1 links ist die gemessene Tropfengröße als Funktion der Zeit für eine DPPC-stabilisierte Emulsion dargestellt, welche sich aus 1 vol-% Dispersphasenanteil einer 150 mM Stammsuspension zusammensetzt. Bezogen auf den intensitätsgewichteten Durchmesser („intensity mean“) sind große Tröpfchen von bis zu 1300 nm wenige Minuten unmittelbar nach der Emulgierung festzustellen. Nach drei Stunden nimmt die Emulsion eine stabile mittlere Größe der Tröpfchen von 200 nm ein. Prinzipiell ist das Messergebnis des intensity mean ein überraschender und zunächst nicht erklärbares Phänomen. Der gemessene Verlauf suggeriert eine Verkleinerung der Tropfengröße ohne die Zufuhr von Energie. Eine Destabilisierung von Emulsionen geht üblicherweise durch Koaleszenz mit einer Vergrößerung der Tropfengröße einher. Der Effekt der Erhöhung der Tropfengröße von 100 auf 200 nm innerhalb der ersten Stunden ist im anzahlgewichteten Durchmesser („number mean“) zu erkennen. Das bedeutet, dass gleichzeitig die Gesamttropfenanzahl abnimmt. Dieser Befund wird durch den Verlauf der Zählrate („derived count rate“, DCR) unterstützt: Anfänglich sind mehr Streuzentren festzustellen. Nach drei Stun-

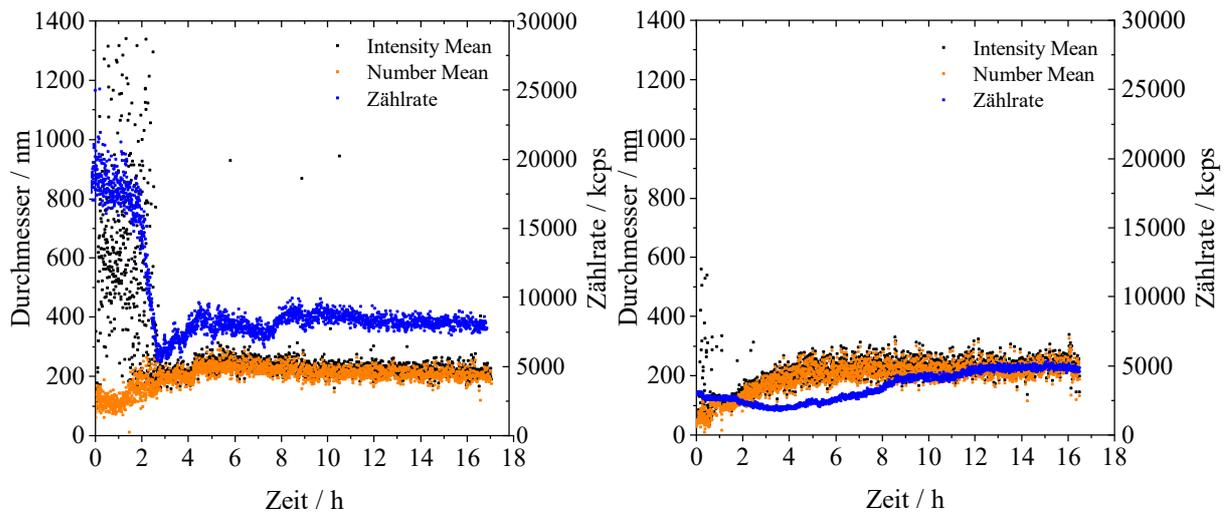


Abbildung 5.1: Aufnahme der Tropfengrößenänderung einer mit DPPC stabilisierten W/FC-Nanoemulsion über eine Zeitspanne von 17 h nach dem Emulgierprozess. Links: Stabilisierung mit einer Konzentration von 150 mM in der Stammsuspension. Rechts: Stabilisierung mit einer Konzentration von 300 mM in der Stammsuspension. Dargestellt sind der mittlere Durchmesser basierend auf Intensität (schwarz) und Anzahl (orange) sowie die Zählrate in Kilocounts pro Sekunde (kcps).

den sinkt die Zählrate auf einen stabilen Wert ab. Eine Erklärung für diese gegenläufigen Messsignale kann zu diesem Zeitpunkt nicht geliefert werden, führt aber zu der Frage, ob eine höhere Konzentration an Phospholipiden in der Suspension das gleiche Phänomen zu Beginn nach dem Emulgierprozess aufweist. In Abbildung 5.1 rechts zeigt eine 300 mM Stammsuspension von DPPC ein gegensätzliches Verhalten innerhalb der ersten Stunden mit nahezu keiner Streuung des intensitätsbasierten Durchmessers. Dieser beginnt bei einer Größe von 100 nm und steigt nach drei Stunden auf 200 nm an, was zum gleichen Verlauf führt, wie der für den anzahlgemittelten Durchmesser beobachtet. Im anzahlgewichteten Durchmesser und in der Zählrate ergeben sich für beide Stammsuspensionen sehr ähnliche Verläufe.

Diese Befunde lassen zwei Schlüsse zu: Einerseits, dass die Nanoemulsionen offenbar noch nicht direkt nach der Präparation für den Zentrifugationsprozess zu verwenden sind. Es scheint ein Zeitraum von mindestens drei Stunden zwischen Präparation und Zentrifugation der Tröpfchen notwendig zu sein. Andererseits zeigt sich eine von der Phospholipid-Konzentration abhängige messtechnische Herausforderung der dynamischen Lichtstreuung. Es ist bekannt, dass die DLS dann fehleranfällig ist, wenn beide Stoffsysteme einen sehr ähnlichen Brechungsindex („refrac-

tive index“, RI) aufweisen. Genau dies ist hier der Fall. Daher sind die Daten im folgenden Abschnitt unter dem Gesichtspunkt von Messfehlern und spezifischen Merkmalen des Fluorocarbon-Systems analysiert.

5.3 Messtechnische Herausforderung

Da Fluorocarbone einen hohen Anteil an Sauerstoff absorbieren [109], könnten auch Gasblasen die große Streuung nach der Ultraschallbeschallung beeinflussen und zu Messfehlern führen. Eine Probe mit reinem PFPH wies nach der Ultraschallbeschallung Tröpfchen von bis zu 800 nm auf, obwohl keinerlei andere Komponenten vorhanden waren. Es ist zu vermuten, dass der Ultraschall den gelösten Sauerstoff durch Kavitation freisetzt und zur Oberfläche aufsteigende Gasblasen die Streuung im Messsignal der DLS verursachen. Je nach Phospholipid-Konzentration ist dieser Effekt unterschiedlich stark zu beobachten. Bei einer höheren Konzentration stabilisieren die Phospholipide vermutlich nicht nur die Wassertröpfchen, sondern auch die Gasblasen, sodass weniger Streuung im Intensitätsmittel zu beobachten ist.

Um die Gasblasen aus dem System zu entfernen bzw. die Veränderungen des Streusignals durch die Blasen zu detektieren, wurde das reine Fluorocarbon für verschiedene Zeiträume in einen Vakuum-Exsikkator gegeben. Vorversuche haben ergeben, dass nach 30 Minuten keine signifikante Veränderung der DCR und Tropfengröße mehr festzustellen war, sodass zu diesem Zeitraum die Gasblasen vollständig aus dem reinem Fluorocarbon mittels Vakuum entfernt waren. Die Dauer von 30 min wurde anschließend auf die Entgasung der W/FC Nanoemulsionen angewendet und die Veränderungen der Messgrößen mittels DLS analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Es fanden Messungen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten statt – unmittelbar nach der Emulgierung mittels Ultraschallsonotrode, mit 24 h Wartezeit nach der Emulgierung und nach der Entgasung im Exsikkator für 30 min. Für jede Messung sind der z-Average, der intensitätsgewichtete Durchmesser und der PDI aufgetragen. Der z-Average bezieht die verschiedenen Messgrößen aus der DLS-Messung mit ein und wird üblicherweise als Vergleichswert angegeben, während der intensitätsbasierte Durchmesser die direkte Messgröße aus der Intensitätsfluktuation darstellt. Der PDI gibt die Polydispersität der Probe an und ist daher ebenfalls von Interesse. Nach der Emulgierung misst der intensitätsgewichtete Durchmesser der Tröpfchen 450 nm und 132 nm mit einer Standardabweichung von 98 nm für den z-Average.

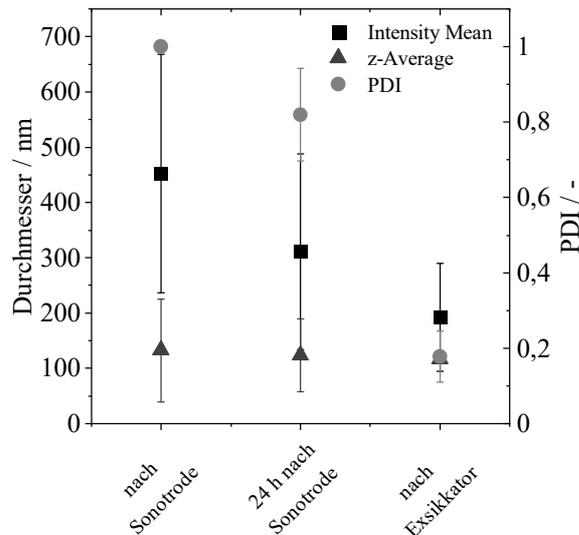


Abbildung 5.2: Darstellung von drei DLS-Messungen, unmittelbar nach der Emulgierung mittels Sonotrode, mit einer Wartezeit von 24 h nach der Emulgierung und einer Probe, die 30 min im Exsikkator entgast wurde. Abgebildet sind die mittels DLS bestimmten Größen des intensitätsgewichteten Durchmessers („intensity mean“), des z-Averages und des Polydispersitätsindex (PDI) einer 1% W/FC Nanoemulsion, stabilisiert mit einer Stammsuspension aus 150 mM DPPC.

Nach 24 h sinkt der intensitätsbasierte Durchmesser auf 300 nm, ebenso sinkt der z-Average (123 ± 66 nm). Der PDI liegt ohne die Entgasung zwischen 0,8 und 1, was auf eine besonders polydisperse Probe hinweist. Nach der Vakuumbehandlung nimmt die Größe auf weniger als 200 nm bzw. 117 nm ab, ebenso verringert sich der PDI auf 0,2. Die Veränderungen der Messgrößen beschreiben das Phänomen der starken Streuung durch vorhandene Gasblasen direkt nach der Beschallung sehr gut.

Die vorliegenden Ergebnisse implizieren, dass direkt nach der Präparation der Nanoemulsionen Gasblasen die DLS-Messung stören und daher zu Artefakten in den Daten führen. Während der ersten 24 h findet ein autonomer Entgasungseffekt statt und die Mittelwerte sowie der PDI sinken leicht. Im Vergleich zu der Nanoemulsion direkt nach der Emulgierung weist dieselbe Probe 24 h später ein homogeneres Tropfenkollektiv auf. Der Entgasungseffekt in diesem Zeitraum ist langsam und wird nur durch das Vakuum beschleunigt, sodass letztlich eine geringe Polydispersität und kleine Tropfengrößen zu verzeichnen sind. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der mittlere Durchmesser basierend auf der Intensität den Wert des z-Average beeinflusst und dadurch anfangs eine allgemeine Überschätzung der Tröpfchengröße stattfindet. Dies macht eine Auswertung direkt nach der Beschallung ungenau. Um einen möglichen Einfluss von Gasblasen auf die

Langzeitstabilität von Nanoemulsionen und die damit verbundenen erkannten Probleme mit den DLS-Daten zu untersuchen, sind Messungen über mehrere Tage notwendig.

5.4 Einfluss von Kettenlänge und Konzentration

Die bisherige Datenlage zeigt eine signifikante Erzeugung von Gasblasen durch die Beschallung. Da dieser Effekt zum jetzigen Kenntnisstand vornehmlich innerhalb der ersten Stunden auftritt, gilt es zu überprüfen, inwieweit hierdurch die Langzeitstabilität von W/FC Nanoemulsionen beeinflusst wird. Insbesondere ist der Frage nachzugehen, ob sich die Kettenlängen und Konzentrationen der bereits diskutierten Phospholipide in ihrer Interaktion mit den Gasblasen unterscheiden.

In Abbildung 5.3 dient der intensitätsbasierte Durchmesser zum Vergleich der Kurz- und Langzeitmessungen. Unter Kurzzeitmessungen sind wenige Stunden zu verstehen, während Langzeitmessungen mehrere Wochen dauern. Die hergestellten Tröpfchen der W/FC Nanoemulsion, stabilisiert zeigen alle eine Langzeitstabilität von bis zu vier Wochen mit einer durchschnittlichen Größe von 180 nm im intensitätsgewichteten Durchmesser. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten von Kabalnov et al., die zeigen, dass Nanoemulsionen mit hohem Molekulargewicht des Fluorocarbons stabiler sind als andere [106]. Unmittelbar nach dem Emulgiervorgang weisen die Wassertröpfchen eine Größe von 450 nm für DMPC und bis zu 700 nm für DPPC und DSPC auf, was eine inhomogene Nanoemulsion andeutet. Die bereits diskutierten durch Luftblasen dürften auch hier die Ursache sein. Eine homogene Größe ist für das Phospholipid mit der längsten Fettsäurekette, DSPC, erst nach 200 h zu messen, was darauf hindeutet, dass der autonome Entgasungseffekt deutlich länger benötigt, als bei Phospholipiden mit kürzerer Fettsäurekette.

Abbildung 5.3 links zeigt den Einfluss verschiedener Konzentrationen von DPPC in der Stammsuspension. Für alle Konzentrationen ist direkt nach der Emulgierung als auch über den gesamten Messzeitraum der gleiche Verlauf wie bei den Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Kettenlängen zu beobachten. Die mittlere Tropfengröße über die gesamte Messdauer unterscheidet sich jedoch. Geringe Konzentrationen von 25 mM in der Stammsuspension weisen eine Größe über 200 nm auf. Mit erhöhter Konzentration verringert sich der Durchmesser der Tropfen und

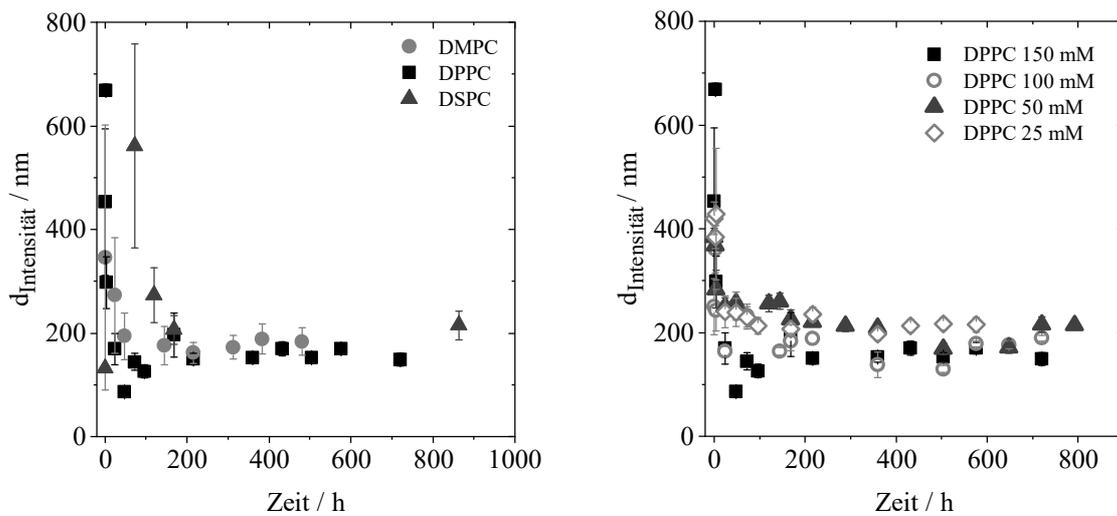


Abbildung 5.3: Langzeitstabilität von W/FC Nanoemulsionstropfen stabilisiert mit Phospholipiden verschiedener Kettenlängen und Konzentrationen. Jede Nanoemulsion besitzt einen Dispers-Phasenanteil von 1 vol.-%. Links: Stabilisierung mit den Phospholipiden DMPC, DPPC und DSPC als Vertreter unterschiedlicher Kettenlängen mit einer Konzentration von jeweils 150 mM Phospholipid in der wässrigen Phase (1,5 mM in der Emulsion). Rechts: Einfluss verschiedener DPPC Konzentrationen. Dargestellt ist der mittlere intensitätsgewichtete Durchmesser.

ist für eine 150 mM Stammsuspension mit 180 nm am niedrigsten. Höhere Konzentrationen sind daher zu favorisieren.

In Bezug auf die Stabilität dient das Zeta-Potential oft als Erklärung verschiedener Phänomene von Nanoemulsionen und deren Tropfenprofilen [103,110]. Abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen verhindern die Koaleszenz der Tröpfchen und stabilisieren die Nanoemulsionen. Pal et al. [111] beschreiben als weiteren Stabilitätsmechanismus das Phänomen der sterischen Hinderung, auch entropische Stabilisierung genannt, welche die Koaleszenz von O/W Nanoemulsionen reduziert und damit die Stabilität erhöht. Selbst bei abnehmenden Zeta-Potential und damit einhergehender Verringerung der elektrostatischen Abstoßung ist die sterische Hinderung der dominierende Effekt für die Langzeitstabilität in deren Untersuchungen.

Da Fluorocarbone nichtleitend sind, führen Zeta-Potential Messungen oft zu nicht eindeutigen Ergebnissen. Zwitterionische Moleküle (Phospholipide) weisen im Allgemeinen ein sehr schwaches Signal auf. Dies erhöht die Schwierigkeit, ein adäquates Zeta-Potential zu erhalten. In einer 150 mM DPPC FC/W Emulsionen ergab sich ein Zeta-Potential von $8,29 \pm 0,557$ mV. In umgekehrten W/FC Emulsionen sind die Zeta-Potenziale jedoch deutlich kleiner, da die Ladungen der

inneren wässrigen Phase durch die Monoschicht teilweise abgeschirmt sind. Es ist daher anzunehmen, dass die abstoßenden elektrostatischen Kräfte unbedeutend sind. Allerdings kann die entropische Stabilisierung ein Einflussfaktor sein.

Die Ostwald Reifung, ein anfänglicher Destabilisierungseffekt, der bei vielen Emulgierprozessen zu beobachten ist, ermöglicht hier keine vollständige Untersuchung, um die Zunahme der Tröpfchengröße zu Beginn zu erklären, da die Gasblasen die Messwerte stören (vgl. Abbildung 5.1). Ein signifikanter Einfluss der Ostwald-Reifung auf die Tröpfchengröße und Destabilisierung wird aufgrund der Eigenschaften des Stoffsystems jedoch nicht angenommen. Es ist bekannt, dass eingeschlossene unlösliche Spezies die Ostwald-Reifungsrate aufgrund der Erhöhung des osmotischen Drucks im Vergleich zu löslichen Kompartimenten senken [36]. Zusätzlich beobachteten Delmas et al. [112], dass die gleichen unlöslichen Kompartimente, wenn sie in Membranen vorhanden sind, das Verschwinden kleiner Tröpfchen verhindern. Da PFPH sowohl für lipophile als auch für hydrophile Kompartimente inert und unlöslich ist, ist hier die gleiche stabilisierende Wirkung zu erwarten: Die unlöslichen Lipide stören weder die Fluorocarbonphase noch die hydrophile Wasserphase und tragen somit zur langfristigen Stabilisierung der Nanoemulsion bei.

5.5 Untersuchung verschiedener Fluorocarbone

Nach dem Verständnissgewinn um die Problematik der Gasblasen stellt sich die Frage, ob andere Fluorocarbone ebenfalls dieselben Qualitäten wie PFPH hätten, um für den weiteren Transferprozess zur Verfügung zu stehen. Zur Klärung dieser Frage sind neben PFPH (in diesem Abschnitt als $C_{14}F_{24}$ bezeichnet) die Fluorocarbone Perfluoroheptan (C_7F_{16}), Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan (C_8F_{16}) sowie Perfluoromethyldecalin ($C_{11}F_{20}$) untersucht worden. 150 mM DPPC stabilisieren jedes Fluorocarbon in einer 1% (v/v) W/FC Nanoemulsion.

Abbildung 5.4 zeigt den intensitäts- und anzahlgewichtete Durchmesser sowie den z-Average. Es ist ersichtlich, dass die intensitäts- und anzahlbasierten Durchmesser bei den Fluorocarbonen C_7F_{16} und C_8F_{16} kleiner sind als der z-Average, was eine erhöhte Polydispersität innerhalb dieser Proben signalisiert. Dies ist auch an der großen Standardabweichung zu erkennen. Für beide Fluorocarbone verzeichnet der z-Average Tröpfchengrößen deutlich über 2000 nm. Aufgrund des

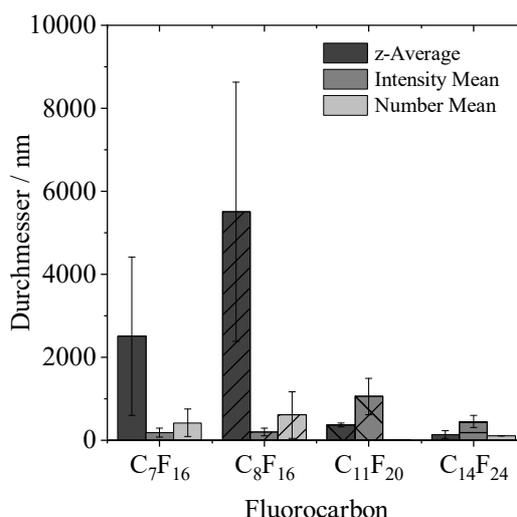


Abbildung 5.4: z-Average, intensitätsgewichteter und anzahlgewichteter Durchmesser für 1% (v/v) W/FC Nanoemulsionen, stabilisiert mit 150 mM DPPC in der Stammsuspension. Die eingesetzte hydrophobe Phase variiert: Perfluoroheptan (C₇F₁₆), Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan (C₈F₁₆) sowie Perfluoromethyldecalin (C₁₁F₂₀) und Perfluoroperhydrophenanthren (C₁₄F₂₄).

geringeren Molekulargewichts als auch einer niedrigeren Viskosität (vgl. Tabelle A 2.2 im Anhang) ist davon auszugehen, dass Gasblasen eine untergeordnete Rolle spielen und stattdessen eine sehr polydisperse Probe vorliegt. Da der z-Average die Polydispersität der Probe mit einbezieht, spiegelt diese Messgröße die Probenbeschaffenheit sehr gut wider. Die Vermutung eines geringen Gasblasenvorkommens für diese beiden Fluorocarbone wird vom intensitätsgewichteten Durchmesser unterstützt. Wie bereits in Abbildung 5.2 dargestellt, ist der Einfluss der Gasblasen besonders in dieser Messgröße zu beobachten. Der intensitätsgewichtete Durchmesser liegt hier jedoch im Bereich von 190 nm und entspricht damit dem gewünschten Größenkriterium für die weitere Verwendung. Der anzahlgewichtete Durchmesser liegt für beide Fluorocarbone bei 420 nm (C₇F₁₆) bzw. 600 nm (C₈F₁₆), sodass auch anhand dieser Daten von einer erhöhten Polydispersität innerhalb der Probe zu sprechen ist. Visuell ist zu beobachten, dass die Emulsionen direkt nach der Herstellung eine geringe Stabilität zeigen und ein Aufrahmen der Tröpfchen stattfindet.

Das Fluorocarbon C₁₁F₂₀ zeigt eine verringerte Polydispersität, ersichtlich aufgrund der geringen Standardabweichung. Das Verhalten dieses Fluorocarbons ähnelt dem des bereits untersuchten C₁₄F₂₄ am meisten – die DLS-Daten weisen auf einen erhöhten Gasblaseneintrag hin, da hier der intensitätsgewichtete Durchmesser mit 1050 nm im Vergleich zum z-Average (367 nm) deutlich

höher liegt. Da sowohl Viskosität als auch Dichte dieser beiden Fluorocarbone nah beieinander liegen, ist ein langsamerer Gasaustrag im Vergleich zu den Fluorocarbonen geringerer Dichte plausibel. Die Daten lassen den Schluss zu, dass $C_{11}F_{20}$ ähnlich gut für den nachfolgenden Transfer zur Liposomenherstellung geeignet wäre wie $C_{14}F_{24}$. Jedoch ist direkt nach der Emulsionsherstellung ein Aufrahmen der Tröpfchen visuell zu beobachten. Diese Instabilitäten sind mit der DLS zum Zeitpunkt der Messung möglicherweise nicht erfasst und könnten die Einkapselung des Modellwirkstoffes unter Umständen beeinflussen. Die Erkenntnisse decken sich mit den Arbeiten von Kabalnov et al. [106]: Die Stabilität der W/FC Emulsionen hängt dabei maßgeblich von den Stoffeigenschaften der hydrophoben Phase ab, unter anderem vom Molekulargewicht, und nicht von den eingesetzten Stabilisatoren.

5.6 Schlussfolgerungen

Das Materialsystem aus Phospholipiden und PFPH ist erfolgreich für die Herstellung von W/FC Nanoemulsionen anwendbar. Trotz der Analysesproblematiken des Materialsystems sind vielversprechende Möglichkeiten für die Anwendung von Fluorocarbonen vorhanden. Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente, dass eine Aussage über die Größe der mit der DLS direkt nach der Präparation gemessenen Tröpfchen schwierig ist, da die DLS unterschiedliche Messgrößen für den Durchmesser im Mehrkomponentensystem liefert. Für die Charakterisierung ergibt sich daher die Schwierigkeit einer differenzierten Betrachtung der individuellen Messgrößen. Gasblasen beeinflussen insbesondere den Intensitätsmittelwert, wodurch sich der z-Average verschlechtert und nur der anzahlbasierte Durchmesser die tatsächliche Tropfengröße der Emulsion direkt nach der Herstellung wiedergibt. Die anderen beiden Messgrößen weisen dagegen auf Messartefakte hin. Ein Tröpfchentransfer für die Liposomenherstellung ist aufgrund der vorliegenden Daten zu diesem Zeitpunkt bei frisch hergestellten Nanoemulsionen nicht günstig.

Die anfänglich detektierten Gasblasen haben keinen Einfluss auf die Langzeitstabilität der Emulsionen. Da die Gasblasen innerhalb der ersten Tage nicht mehr detektierbar sind, ist die Langzeitstabilität mit der Messgröße des intensitätsgewichteten Durchmessers dennoch zu analysieren und liefert stabile, reproduzierbare und kohärente Ergebnisse. Über einen Zeitraum von mehr als

4 Wochen liegt die mittlere Tropfengröße unter 200 nm. Die Stabilität ist aufgrund der entropischen Stabilisierung gegeben, welche auf der Unlöslichkeit der Lipide und der wässrigen Phase beruht, wobei die Ostwald-Reifung ausgeschlossen ist.

Ein Vergleich von unterschiedlichen Fluorocarbonen liefert weitere Erkenntnisse für die Eignung dieser als hydrophobe Phase. Je geringer die Dichte und Viskosität der eingesetzten hydrophoben Phase, desto weniger beeinflussen Gasblasen die Messgröße des intensitätsgewichteten Durchmessers. In Bezug auf die geplante Einkapselung könnten weniger Gasblasen von Vorteil sein, sodass die untersuchten Fluorocarbone für die Liposomenherstellung zum Einsatz kommen können. Abgesehen von PFPH lässt sich durch visuelle Beobachtung jedoch feststellen, dass eine Langzeitstabilität dieser W/FC Emulsionen nicht gegeben ist und der Zentrifugationsschritt für diese hydrophoben Phasen direkt an die Emulsionsherstellung anzuschließen wäre.

Zusammenfassend sind typische Stabilitätsanalysen, wie das Zeta-Potential oder das rheologische Verhalten, für das verwendete Materialsystem nicht aussagekräftig. Für die Betrachtung der Nanoemulsionen und einer ersten Analyse des W/FC-Systems ist die Größenbestimmung mittels DLS unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Messgrößen jedoch hinreichend genau.

Für den weiteren Schritt der Liposomenherstellung ist die genaue Größenbestimmung unabdingbar, da eine finale parentale Applikation der Liposomen das Ziel sein sollte. Die Liposomen sollten eine Größe von maximal 200 nm nicht überschreiten, um über längere Zeit in den Blutbahnen zu zirkulieren („long circulating liposomes“) und sich dadurch im Tumorgewebe anreichern zu können. Es ist anzunehmen, dass die messtechnischen Herausforderungen, die sich bei der Emulsionsanalyse gezeigt haben, auch bei der Analyse der Liposomen auftauchen. Darüber hinaus erschwert der gleiche Brechungsindex innerhalb und außerhalb des Liposoms eine Analyse mittels DLS. An dieser Stelle sei auf Vermutung hingewiesen, dass während der Zentrifugation ein Ölfilm mittransportiert werden könnte, sodass die einzelnen Messgrößen erneut kritisch betrachtet werden müssen. Auch der potentielle Einfluss der Gasblasen auf die Liposomenbildung ist zu untersuchen. Unter diesen Aspekten findet im Folgenden Kapitel 6 die Charakterisierung der Liposomen sowie deren Einkapselungseffizienz statt.

Kapitel 6

Liposomenherstellung mittels Zentrifugation und deren Einkapselungseffizienz¹⁰

6.1 Stand der Technik und Zielsetzung

Aufgrund ihrer amphiphilen und grenzflächenaktiven Eigenschaften sind Phospholipide als Wirkstoffträger in Form von Liposomen interessante Kandidaten [6,114]. Grundsätzlich ist der Einsatz von Lipiden in der pharmazeutischen Industrie nicht neu. Zu differenzieren sind hierbei die spezifischen Anwendungsfelder. Liposomale Formulierungen für Cremes in der dermalen Applikation unterscheiden sich beispielsweise von oralen Formulierungen, deren Verabreichung oft in Tablettenform erfolgt. Eine dritte Möglichkeit ist die parentale Applikation, bei denen flüssige Lipidformulierungen injiziert werden. Die Wirkung der Formulierung hängt dabei von der Größe der Liposomen ab. Um das Liposom erfolgreich durch die Blutbahn und das Gewebe transportieren zu können und an gewünschter Stelle zu akkumulieren, ist eine Größe von < 200 nm notwendig [115].

Doxorubicin ist bekannter Wirkstoff, welcher beispielsweise mittels Liposomen verabreichbar ist. Ist dieser Anti-Krebswirkstoff in einer Lipidhülle aus HSPC, Cholesterin und mPEG-DSPE eingekapselt, ist er unter dem kommerziellen Namen Doxil erhältlich. Es ist das erste von der

¹⁰ Teilmehnte dieses Abschnitts wurden in *Advanced Materials Interfaces* veröffentlicht und angepasst, siehe auch Fußnote 9, sowie in *Pharmaceutics* des MDPI-Verlags [113]: K. Ullmann, G. Lenewei, H. Nirschl, „How to achieve high encapsulation efficiencies for macromolecular and sensitive APIs in liposomes, Pharmaceutics“, *Pharmaceutics* (5) 2021.

U. S. Behörde für Lebens- und Arzneimittel („federal drug administration“, FDA) zugelassene Medikament auf Basis von Liposomen und Wegweiser für viele weitere Anwendungen [116,117].

Die Herstellungsmethoden von Liposomen sind sehr vielfältig. Einige sind im Folgenden genannt und kurz beschrieben. Für eine ausführliche Übersicht an Produktionsmöglichkeiten sei auf die Publikationen von Patil et al. [45] und Mozafari et al. [46] verwiesen.

Eine der herkömmlichsten und nach wie vor am häufigsten verwendeten Labormethoden ist die Filmmethode. Aufgrund ihrer guten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln sind die Phospholipide zuerst in Ethanol oder einem Gemisch aus Chloroform und Methanol zu lösen. In einem weiteren Schritt verdampft das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer, sodass sich die Lipide an der Kolbeninnenwand anordnen. Auch bei einem Gemisch aus verschiedenen Phospholipiden ist eine gleichmäßige Verteilung an der Kolbeninnenwand erreichbar. Die Lipide sind anschließend mit einem entsprechenden Lösungsmittel wieder von der Kolbenwand zu entfernen, sodass sich eine heterogene Suspension aus multilamellaren Vesikeln ausbildet. Das Lösungsmittel ist dabei je nach Beschaffenheit des einzukapselnden Wirkstoffes hydrophil oder hydrophob [7,118].

Weitere Methoden zur Herstellung von MLVs und LUVs, wie die umgekehrte Phasen-Verdunstung („reverse phase evaporation“), beruhen ebenfalls auf dem Einsatz von organischen Lösungsmitteln. Das Lösungsmittel verdampft jedoch nicht vor der Zugabe der wässrigen Phase, was die Entstehung einer W/O Emulsion zur Folge hat. Durch die Entfernung des Lösungsmittels bleibt die wässrige Phase sowie LUVs zurück [119].

Gängige Methoden finden sich auch in der Mikrofluidik. Die Vermischung einer wässrigen Phase und einer alkoholischen Phospholipidlösung findet in einem mikrostrukturierten Kanal statt. Durch die Reduktion der sich in Wasser lösenden Alkohole lagern sich die Phospholipide zu Doppelschichten an [120].

Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln im Herstellungsprozess von Liposomen erfordert eine umfassende Entfernung im Produktionsprozess, da Lösemittel sowohl eine toxische Wirkung auf Zellen als auch einen destabilisierenden Effekt auf Membranproteine oder Peptide haben [121]. Somit ist eine Änderung der chemischen Struktur des Wirkstoffes nicht auszuschließen. Die Verwendung von Lösemitteln würde den Herstellungsprozess um einen äußerst kostspieligen und zeitaufwendigen Entfernungsschritt erweitern, da behördliche Vorgaben in medizinischen Anwendungen Restgehalte im ppm- und gar ppb-Bereich erfordern [122]. Eine komplett lösungsmittelfreie Präparation wäre daher den herkömmlichen Methoden überlegen.

Um multilamellare Vesikel zu unilamellaren Liposomen zu reduzieren, sind ebenfalls verschiedene Verfahren möglich. Das Aufbringen von Druck mittels Extrusionsverfahren presst die Lipid-Suspension durch eine Membran und schert die äußere Membranschicht beim Durchtritt der Nanoporen ab, sodass unilamellare Vesikel entstehen. Die Größe der Poren steuert entsprechend die Größe der Liposomen [123]. Für größere Produktionsmengen kommt hingegen der Hochdruckhomogenisator zum Einsatz. Die Lipid-Suspension passiert mehrmals den Kanal, sodass sich die Vesikel mit jedem Durchlauf verkleinern. Eine minimale Liposomengröße von 20 nm ist mit diesem Prozess möglich [124,125].

Problematisch ist neben der Verwendung von organischen Lösungsmitteln zudem auch die Effizienz der Einkapselung. Die genannten Methoden neigen dazu, einen großen Teil des Wirkstoffs außerhalb der Vesikel ungenutzt zu lassen. Die in der Literatur gefundene Einkapselungseffizienz für Moleküle mit hohem Molekulargewicht variiert von 10 bis 50% [8,126]. Höhere Einkapselungseffizienzen sind bisher nicht etabliert, da eine simultane Beladung von Makromolekülen zum jetzigen Zeitpunkt nicht machbar ist. Eine „hohe“ Einkapselungseffizienz ist von Xu et al. [9] beschrieben, welche Gefrier-Auftau-Zyklen für das Einschließen von Proteinen verwenden. Allerdings übersteigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe noch nicht die 50%-Marke. De Matos et al. [127] machten Gebrauch vom Zentrifugationsprozess nach Pautot et al. [128] zur Herstellung von asymmetrischen Liposomen aus einer Nanoemulsion. Die ursprünglich auf Träuble und Grell [129] basierende Methode hat jedoch den Nachteil einer gelbildenden Schicht zwischen den Grenzphasen, sodass ein Transfer der Emulsionstropfen unmöglich ist. Gleichzeitig entstehen Vesikel zwischen 1 und 10 µm, welche für eine pharmazeutische Anwendung ungeeignet sind. Obwohl de Matos et al. kleine Liposomen erzeugen, liegt die Einkapselungseffizienz für das verwendete Plasmid bei lediglich 10-15%.

An dieser Stelle knüpft die Fragestellung für dieses Kapitel an. Es gilt, den verfahrenstechnischen Zentrifugationsprozess ohne die Nutzung von organischen Lösungsmitteln zu etablieren, sodass ein Transfer überhaupt möglich ist und die produzierten Liposomen den pharmazeutisch notwendigen Größen entsprechen. Es ist eine geeignete Analysemethode für die Größenbestimmung der Liposomen auszuarbeiten. Darüber hinaus ergibt sich die Frage, ob mit Hilfe der Zentrifugation von W/FC Nanoemulsionen eine ausreichend hohe Einkapselungseffizienz zu erreichen ist. Für die Quantifizierung der Einkapselungseffizienz ist die Erarbeitung einer Nachweismethode not-

wendig, welche für verschiedener Modellwirkstoffe anwendbar ist. Zum Einsatz kommen die bereits analysierten Fluorocarbon-Nanoemulsionen sowie die Modellwirkstoffe Fluoreszein-Natrium, BSA und fluoreszenz-markiertes Dextran.

6.2 Beschreibung des Herstellungsprozesses

Zur Herstellung von Liposomen kommt das Zentrifugationsverfahren von W/FC Nanoemulsionen zum Einsatz. Der Prozess ist schematisch in Abbildung 6.1 dargestellt. Innerhalb der W/FC Emulsion ist die wässrige Phase mit Phospholipiden stabilisiert. Die Mizellen der Emulsion transferieren mittels der aufgebrachten Zentrifugalkraft in eine zweite hydrophile Phase, wobei die Grenzfläche zwischen der Emulsion und der aufgeschichteten zweiten Phase mit weiteren Phospholipiden belegt ist. Die Phospholipide stammen aus dem Überschuss, welche in der W/FC Emulsion vorliegt. Mit Passieren der Mizellen aus der kontinuierlichen Emulsionsphase bildet sich eine Bilschicht aus, sodass nach der Zentrifugation Liposomen mit eingekapseltem Wirkstoff vorliegen. Die Grenzen dieses Prozesses haben bereits Sommerling et al. [130] für eine begrenzte Variation der hydrophoben Phase aufgezeigt. Unter Berücksichtigung der passenden hydrophoben Phase kann der Transfer dennoch erfolgreich sein. Da die PFPH-Nanoemulsionen stabil sind, die notwendige Größe von < 200 nm aufweisen und auch die weiteren untersuchten Fluorocarbon-Emulsionströpfchen dieser Größe ausweisen, erfüllen sie die Voraussetzungen zur Liposomenherstellung. Durch die Verwendung eines Fluorocarbons ergeben sich Vorteile hinsichtlich des Zentrifugationsprozesses:

- Die Behinderung durch die Grenzflächenspannung während des Phasentransfers kompensiert der hohe Dichteunterschied zwischen der hydrophoben und der wässrigen Phase ($\rho_{\text{Wasser}} = 0,998 \text{ g cm}^{-3}$, $\rho_{\text{PFPH}} = 2,03 \text{ g cm}^{-3}$). Dies ermöglicht den Transfer.
- Die Gel-Bildung ist nicht mehr nachweisbar.
- Aufgrund der schwereren hydrophoben Phase erfahren die wässrigen Tröpfchen während der Zentrifugation Auftrieb. Dementsprechend findet keine Sedimentation statt.
- Der Auftrieb ermöglicht eine praktikable Entnahme der liposomalen Suspension mittels Pipette von oben.

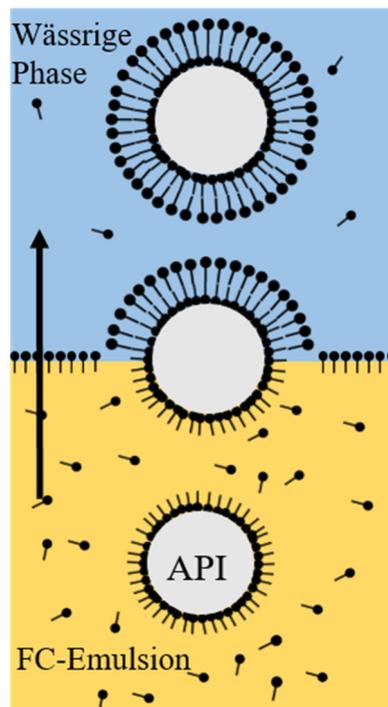


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von Liposomen aus einer W/FC Nanoemulsion. Das API („active pharmaceutical ingredient“) befindet sich in der hydrophilen Phase der Emulsion, umschlossen von Phospholipiden. Die Grenzfläche ist ebenfalls mit Phospholipiden belegt. Die Doppelschicht bildet sich beim Durchtritt zur wässrigen Phase, welche die geringere Dichte besitzt. Der Pfeil symbolisiert die Bewegungsrichtung der Tropfen.

Darüber hinaus besitzt das Verfahren theoretisch die Möglichkeit hohe Einkapselungseffizienzen zu erzielen, eine komplette Ummantelung der wässrigen Phase und somit des Wirkstoffes mit Phospholipiden ist vorstellbar. Nicht auszuschließen ist, dass ein Teil des Öls während des Transfers mit in die obere Phase wandert. Während des Durchtritts könnte sich ein dünner Film um die mit Phospholipiden stabilisierte Mizelle legen, bevor eine weitere Schicht Phospholipide diese umschließt und die Doppelmembran bildet. Dies ist bei der Auswahl des Messsystems zur Charakterisierung zu berücksichtigen.

Das Volumenverhältnis von Emulsion und wässriger Phase betrug 1:1, die Zentrifugation erfolgte in einer Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) bei 0°C und 4000 g für 30 min. Aufgrund der höheren Dichte der FC-Emulsion findet ein Auftrieb der Mizellen in die obere wässrige Phase statt. Da der Dichteunterschied zwischen den Phasen ungefähr $\Delta\rho \approx 1 \text{ g cm}^{-3}$ beträgt, ist eine Rückkehr der Liposomen in die Emulsionsphase äußerst unwahrscheinlich. Die Aufrahmschwindigkeit der Tröpfchen im Zentrifugalfeld ist in Anhang A6 berechnet.

6.3 Charakterisierung der Liposomen

Üblicherweise ist die DLS eine der gängigsten Methoden, um Liposomen zu analysieren [131–133]. Die herkömmliche Herstellung der Lipidvesikel beruht allerdings auf der Nutzung organischer Lösungsmittel, welche in einem weiteren Schritt verdampft werden. Die erhaltenen Liposomen zeigen daher weder Gasblasen noch Schwierigkeiten aufgrund ähnlicher Brechungsindizes auf. Das Ziel dieser Arbeit – einen Herstellungsprozess ohne Einsatz von organischen Lösungsmitteln zu etablieren – geht mit der Vorbereitung der W/FC Nanoemulsionen einher. Demzufolge können sich die Schwierigkeiten bei der Charakterisierung der Nanoemulsionen in Bezug auf die Gasblasen und den Brechungsindex auch bei der Analyse der Liposomen zeigen. Zusätzlich besteht die Vermutung, dass der Transfer von Öl aus der unteren in die obere Phase nicht gänzlich auszuschließen ist. In diesem Fall erschwert der entstehende Dichtegradient zwischen der wässrigen und Öl-Phase die DLS-Messung. Die erhöhte Dichte verändert auch die Partikelbeweglichkeit. Da die DLS auf der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten beruht und dieser aufgrund der erhöhten Dichte nicht die tatsächliche Bewegung der Liposomentropfen widerspiegelt, wäre eine Korrelation zwischen Diffusionskoeffizient und Partikelgröße nicht mehr gewährleistet. Eine ergänzende Methode zur DLS ist daher notwendig. Voraussetzung ist, dass diese Methoden flüssig-flüssig-Systeme im Nanometer-Bereich auflösen können.

Eine Möglichkeit wären TEM-Aufnahmen. Die Probenpräparation ist jedoch aufwendig, zeit- und kostenintensiv, da für jeden Versuch mehrere Proben vorzubereiten wären, um eine aussagekräftige und statistisch sichere Größenverteilung zu erhalten. Problematisch ist auch, dass eine Trocknung der Proben notwendig ist, welche die tatsächliche Liposomengröße verfälscht. Da mit Blick auf die geplante Einkapselung von Modellwirkstoffen ausfallende Salze die Bildgebung beeinflussen, findet diese Methode zur Größenbestimmung keine Anwendung.

Auch der Einsatz einer optischen Zentrifuge, wie sie häufig zur Analyse von Partikelgrößenverteilungen herangezogen wird, ist nicht möglich. Der optische Aspekt der Auswertung setzt einen ausreichend großen Unterschied im Brechungsindex voraus, welcher wie bereits diskutiert nicht vorhanden ist. Darüber hinaus bewegen sich die Größen der Liposomen am nicht-messbaren Bereich. Ebenfalls problematisch gestaltet sich auch hier wieder der mögliche Öl-Film innerhalb der ausgebildeten Doppelmembran.

Die Röntgenkleinwinkelstreuung stellt ein Messsystem dar, das unabhängig von Gasblasen und Brechungsindex ist. Die SAXS ermöglicht Messungen im gewünschten Nanometer-Bereich und

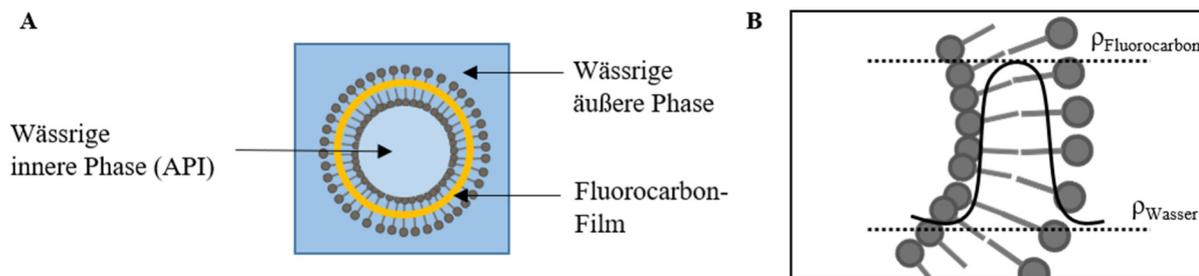


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Liposoms in der wässrigen Phase nach dem Transfer durch Zentrifugation. Beim Durchtritt der Mizelle aus der Fluorocarbon-Phase in die wässrige Phase bildet sich vermutlich innerhalb der Doppelschicht ein dünner Fluorocarbon-Film (A). Der Film bildet die Voraussetzung zur Größenanalyse mittels SAXS, da der notwendige Elektronendichteunterschied gewährleistet ist (B).

ist für flüssig-flüssig-Systeme geeignet. Der vermutete Fluorocarbonfilm lässt sich mit der SAXS besonders effizient detektieren. Aufgrund des Films zwischen den Schichten wäre der Elektronendichteunterschied hoch genug für ein signifikantes Streusignal, was wiederum eine Größenanalyse der Liposomen möglich macht. Eine schematische Darstellung des vermuteten Öl-Films innerhalb der Doppelmembran zeigt Abbildung 6.2. Zwischen der inneren und äußeren Phase entsteht ein Dichtegradient mit Höhepunkt innerhalb der Doppelschicht. Erfolgreiche SAXS-Messungen würden die Vermutung des Öl-Films bestätigen. Da Gasblasen den intensitätsgewichteten Durchmesser der Nanoemulsionen und damit auch den z-Average in der DLS-Messung beeinflussen, sollen die SAXS-Messungen die Analyse der Liposomen unterstützen. Sie ermöglichen darüber hinaus die Evaluation des anzahlbasierten Durchmessers als alternative Auswertungsgröße zum intensitätsgewichteten Durchmesser. Sowohl Konzentration des Phospholipids DPPC als auch die verschiedenen Kettenlängen von DMPC, DPPC und DSPC wurden auf ihren Einfluss auf die Liposomenbildung und -größe untersucht und mittels SAXS charakterisiert.

6.3.1 Einfluss der Konzentration

Da die Konzentration der Phospholipide in Kapitel 5.4 einen Effekt auf die Stabilität der Nanoemulsionen zeigt, werden ebenfalls drei verschiedene Konzentrationen im Rahmen der Liposomenproduktion analysiert. Die Charakterisierung fand dabei sowohl mittels DLS als auch mit der SAXS statt. Abbildung 6.3 zeigt die Ergebnisse der SAXS-Messungen und rechts eine TEM-Aufnahme von DPPC-Liposomen. Die TEM-Aufnahme dokumentiert die erfolgreiche Herstellung von Liposomen aus den W/FC Emulsionen, während links Streuintensitätskurven zu beobachten sind. Höhere Konzentrationen an Phospholipiden zeigen eine erhöhte Streuintensität

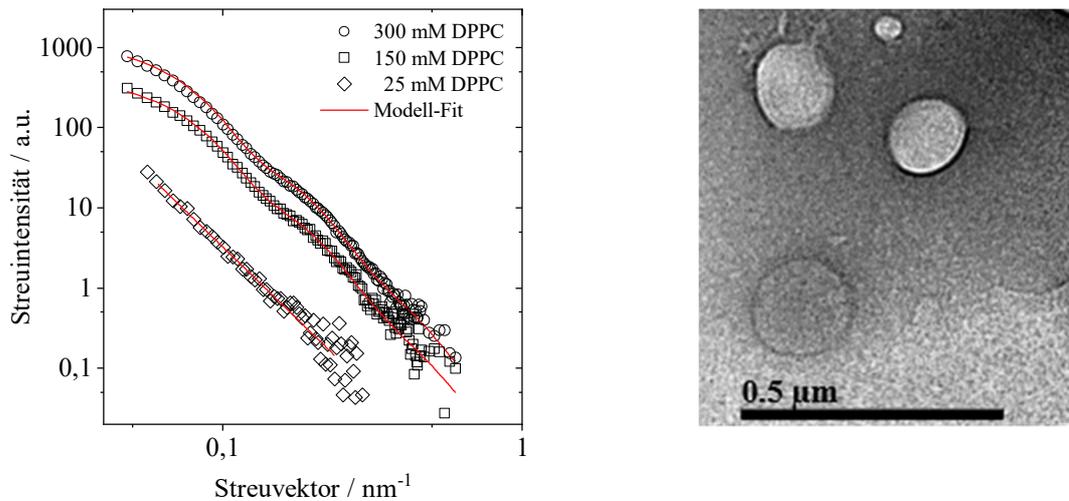


Abbildung 6.3 Links: Streuintensität aufgetragen über den Streuvektor für Liposomen, hergestellt mit verschiedenen Konzentrationen an DPPC in der Stammsuspension. Für die messbaren Konzentrationen von 150 und 300 mM wurde ein Modellierungsansatz für polydisperse, feste Kugeln angewandt, um die Größe der Liposomen zu bestimmen. Für die niedrigste Konzentration von 25 mM fand der Porod-Fit Anwendung.¹¹ Rechts: TEM-Aufnahme von DPPC-Liposomen aus einer 150 mM Stammsuspension. Die Negativ-Färbung der wässrigen Phase, die die Liposomen umgibt, wurde mit Ammonium-Molybdat durchgeführt.¹²

über den Streuvektor. Dies bestätigt die Vermutung, dass während des Transfers ein Öl-Film in die Membran eingelagert wird. Die SAXS ist somit für die Analyse der Liposomen geeignet und findet im Folgenden Anwendung.

Eine Konzentrationsänderung der Phospholipide zeigt, dass eine 25 mM-Stammsuspension zu Liposomen führt, die größer als 130 nm sein müssen. Da die Nachweisgrenze der SAXS bei 130 nm liegt, sind größere Liposomen nicht zu detektieren. Die Menge an Phospholipid reicht demnach nicht aus, um auch kleinere Tröpfchen zu stabilisieren. Die fraktale Dimension der Oberfläche D_{sf} beschreibt außerdem eine raue Oberfläche mit größeren Strukturen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der dünne und glatte Fluorocarbonfilm hier nicht vorhanden ist.

Bei einer Konzentration von 150 mM DPPC ergeben sich Liposomen von 61 nm, während die zweifache Menge an Phospholipid in der Stammlösung in 64 nm Liposomen im Durchmesser resultiert. Das bedeutet, dass bei 300 mM ein Überschuss an Phospholipiden vorliegt, dies aber nicht zu kleineren Liposomen beiträgt. Darüber hinaus ist die Streuintensität bei Liposomen ab 300 mM größer als bei den niedrigeren Konzentrationen.

¹¹ Die Messungen und Datenauswertung wurden dankenswerterweise von Herrn Dr.-Ing. Manuel Meier durchgeführt.

¹² Das TEM-Bild wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Barbara Miranda aufgenommen.

Tabelle 6.1: Daten der DLS-Messung sowie SAXS für Liposomen, hergestellt aus einer DPPC-Stamm suspension für die Nanoemulsionen mit verschiedenen Konzentrationen. Aufgelistet ist der z-Average sowie der anzahl- und intensitätsgewichtete Mittelwert für die produzierten Liposomen. Die letzte Spalte listet den mittleren Durchmesser basierend auf den SAXS-Messungen auf.

Phospholipid-Konzentration	$d_{z-Average} / \text{nm}$	d_{Anzahl} / nm	$d_{Intensität} / \text{nm}$	d_{SAXS} / nm
25 mM	407,0 ± 18,3	59,6 ± 4,8	1599,6 ± 144,9	-
150 mM	132,9 ± 0,3	64,2 ± 10,7	260,5 ± 74,9	60,9 ± 15,8
300 mM	201,7 ± 4,9	65,5 ± 4,1	1345,0 ± 195,2	64,1 ± 16,1

In der Gleichung zur Größenbestimmung der Liposomen (vgl. Gleichung (3.6)) ist die Streuintensität proportional zu den übrigen Parametern. Unter der Voraussetzung, dass sich der Unterschied in der Elektronendichte nicht ändert und auch das Partikelvolumen nur geringfügig variiert, bleibt als Variable zur Erhöhung der Streuintensität die Partikelanzahlkonzentration. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass sich mit 300 mM DPPC als Stamm suspension während des Transfers mehr Liposomen bilden, wobei die Größe prozessspezifisch ist. Dennoch ist es möglich, dass sich bei 300 mM nicht nur eine Bilschicht ausbildet, sondern die Membran des Liposoms um eine weitere Schicht (2 nm) ergänzt ist.

Die DLS-Daten weisen große Unterschiede innerhalb der möglichen Bezugsparameter des Partikeldurchmessers auf. Ein Vergleich der Messgrößen ist in Tabelle 6.1 gezeigt. Dies ist auf den vorhandenen Fluorocarbon-Film zurückzuführen, welcher eine Messung mittels DLS besonders in Bezug auf den intensitätsgewichteten Durchmesser erschwert. Der ähnliche Brechungsindex beider Phasen sowie die erhöhte Dichte verfälschen die Brownsche Molekularbewegung, damit den Diffusionskoeffizienten und letztlich die tatsächliche Größe. Der Durchmesser ist entsprechend groß (über 1 μm) und fließt in dieser Form auch in die Berechnung des Gesamtmittelwertes (z-Average) mit ein. Auffällig ist dagegen die Übereinstimmung von anzahlbezogenen und mittels SAXS bestimmten Mittelwerten. Beide weisen die bereits diskutierten Größen von etwa 60 nm auf.

Der Vergleich mit der Stabilität der Nanoemulsionen zeigt, dass analog dazu eine gewisse Konzentration an Phospholipiden nötig ist, um ausreichend kleine Tropfen zu bilden. Dies gilt nicht nur für die Nanoemulsion, sondern auch für den darauffolgenden Transfer zur Bildung der Liposomen. Diese Erkenntnis stützt auch die Berechnung zur benötigten Menge an Phospholipiden zur Stabilisierung der Nanoemulsionen. Entgegen der ersten Annahme, die frisch hergestellten

Nanoemulsionen seien möglicherweise nicht für die Liposomenbildung aufgrund der Gasblasen geeignet, zeigen die SAXS-Messungen außerdem, dass der Transfer erfolgreich ist. Eine direkte Verwendung der Nanoemulsionen für die Liposomenproduktion ist somit ohne Einschränkungen möglich.

6.3.2 Einfluss der Kettenlänge

Die tensiometrischen Untersuchungen aus Kapitel 4.3 haben gezeigt, dass die Kettenlänge der Phospholipide einen Einfluss auf die Grenzflächenspannung zwischen der Fluorocarbon- und Phospholipidphase haben. Eine geringere Grenzflächenspannung ist grundsätzlich zu bevorzugen, da an der Phasengrenze niedrigere Kräfte während des Transfers der Nanoemulsionströpfchen zu überwinden sind. Der Einfluss der Kettenlänge in Bezug auf die Größe der Liposomen ist daher auch Gegenstand der Untersuchungen in diesem Kapitel, wobei die Konzentration aller Phospholipid-Suspensionen (DMPC, DPPC, DSPC) jeweils 150 mM beträgt. Da die Partikelanzahlkonzentration und der Elektronendichteunterschied für alle Proben ungefähr gleich sind, gilt die Vermutung, dass die Tropfengröße auch bei längerer Kettenlänge zunimmt. Eine Zunahme des Tropfenvolumens zeigt sich in der SAXS durch die proportional steigende Streuintensität.

Die Ergebnisse der SAXS-Messungen in Abbildung 6.4 zeigen ein ähnliches Verhalten in ihrer Intensitätsänderung mit zunehmender Kettenlänge wie mit der Änderung der Phospholipid-Konzentration. Die erhöhte Streuintensität deutet eine Vergrößerung der produzierten Liposomen an. Die Modellierung der Streukurven erfolgt durch einen unified-Fit. Über den Modellierungsansatz für polydisperse, feste Kugeln ergeben sich Liposomengrößen von 48 nm für DMPC, über 59 nm für DSPC bis 61 nm bei DPPC. Dies bedeutet, dass ein Einfluss der Kettenlänge auf die Größe der Liposomen besonders im Bereich der kurzkettigen Phospholipide zu erkennen ist.

Neben der Größe ergibt sich aus dem Porod-Fit auch die Information zur Oberflächenstruktur in Form der fraktalen Dimension D_{sf} . Für alle drei Phospholipide liegt dieser unterhalb von zwei, was auf eine schwache, diffuse Grenzfläche hinweist. Die unterschiedlichen Kettenlängen scheinen hierauf keinen signifikanten Einfluss zu haben.

Die nach dem Phasentransfer hergestellten Liposomen sind neben der Röntgenkleinwinkelstreuung auch mit dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung vermessen. Ein Vergleich der vier Messgrößen ist in Tabelle 6.2 dargestellt. Wie bereits im Kapitel zur Charakterisierung der Na-

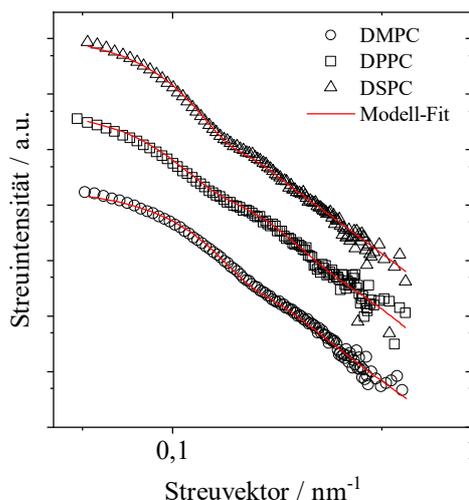


Abbildung 6.4: Streuintensität aufgetragen über den Streuvektor aus SAXS-Messungen von Liposomen, hergestellt mit Phospholipiden unterschiedlicher Kettenlänge. Die Konzentration der Stammsuspension beträgt für alle Phospholipide 150 mM. Die Streukurven sind mit einem Offset zur besseren Übersichtlichkeit dargestellt. Zur Größenbestimmung der Liposomen wurde ein Modellierungsansatz für polydisperse, feste Kugeln angewandt.¹³

noemulsionen diskutiert, führen der z-Average und der intensitätsbezogene Durchmesser zu deutlich höheren Tropfengrößen als der anzahlgewichtete Durchmesser. Da der z-Average einen gesamten Mittelwert für monodisperse Proben angibt, ist davon auszugehen, dass vereinzelt große Partikeln die Messung verfälschen und dieser Parameter für die Charakterisierung nicht geeignet ist. Dies zeigt sich auch im intensitätsbezogenen Durchmesser, welcher deutlich größere Tropfendurchmesser angibt. Die DLS bezieht den Brechungsindex mit ein, um von dem Signal der Intensitätsfluktuation in die einzelnen Parameter umzurechnen. Bei der Umrechnung ist jedoch darauf zu achten, dass das Verhältnis der Verteilung beim intensitätsbezogenen Durchmesser mit d^6 eingeht, sodass ein einzelner großer Tropfen das Ergebnis massiv verfälschen kann.

Die SAXS ist unabhängig vom Brechungsindex der Proben und beruht stattdessen auf der Elektronendichtedifferenz zwischen Probe und Umgebung, an der die Röntgenstrahlen gestreut werden. Bei einer deutlich höheren Anzahl an großen Tropfen würde die Streuung dieser die Streuung der kleinen Tropfen überwiegen, sodass kein eindeutiges Signal ausgewertet werden kann. Da dies hier nicht der Fall ist, ist davon auszugehen, dass das Tropfenkollektiv mehrheitlich aus Größen um die 60 nm besteht. Dies stimmt ebenfalls mit dem anzahlgewichteten Durchmesser überein.

¹³ Die Messungen und Datenauswertung wurden dankenswerterweise von Herrn Dr.-Ing. Manuel Meier durchgeführt.

Tabelle 6.2: Daten der DLS-Messung sowie SAXS für Liposomen, hergestellt aus Phospholipid-Suspensionen für die Nanoemulsionen mit verschiedenen Kettenlängen. Die Konzentration betrug jeweils 150 mM. Aufgelistet ist der z-Average sowie der anzahl- und intensitätsgewichtete Mittelwert für die produzierten Liposomen. Die letzte Spalte listet den mittleren Durchmesser basierend auf den SAXS-Messungen auf.

Phospholipid, 150 mM	$d_{z\text{-Average}} / \text{nm}$	$d_{\text{Anzahl}} / \text{nm}$	$d_{\text{Intensität}} / \text{nm}$	$d_{\text{SAXS}} / \text{nm}$
DMPC	$158,3 \pm 1,5$	$62,7 \pm 11,3$	$392,8 \pm 53,2$	$47,8 \pm 10,9$
DPPC	$132,9 \pm 0,3$	$64,2 \pm 10,7$	$260,5 \pm 74,9$	$60,9 \pm 15,8$
DSPC	$538,8 \pm 60,2$	$55,6 \pm 10,2$	$2342 \pm 385,4$	$57,8 \pm 11,9$

Die Versuche zeigen, dass der Transfer trotz der zuvor festgestellten Gasblasen in den Nanoemulsionen erfolgreich ist und die Liposomen einen Größenbereich aufweisen, der für eine zukünftige parentale Anwendung notwendig wäre. Für die Anwendung ist neben der Größe auch eine lange Stabilität der Liposomen wünschenswert, welche im Folgenden betrachtet wird.

6.3.3 Langzeitstabilität von DPPC-stabilisierten Liposomen

Die erfolgreich produzierten Liposomen sollten für eine spätere Anwendung nicht nur kurzzeitig stabil sein, sondern über einen längeren Zeitraum eine gleichbleibende Größe aufweisen. Hierzu fanden am Beispiel des Phospholipids DPPC Langzeituntersuchungen in einer weiteren Versuchsreihe statt. Die Stammsuspensions-Konzentrationen betragen 150 und 300 mM. Für die Langzeitstabilität wurde eine Lagertemperatur von 4°C gewählt. SAXS-Messungen empfehlen sich aufgrund der hohen Röntgenstrahlung nicht für eine Langzeitmessung. Bei einer zu langen Aussetzung von Röntgenstrahlen könnte das Messprinzip selbst die Instabilität der Liposomen fördern und hierdurch eine schlechtere Brauchbarkeit suggerieren, obwohl die tatsächliche Stabilität höher ist. Daher wurde der anzahlgewichtete Durchmesser aus der DLS für die Bewertung der Langzeitstabilität herangezogen.

Abbildung 6.5 zeigt die Langzeitstabilität von Liposomen über einen Zeitraum von acht Wochen. Da das Vermessen einer neuen Probe jeweils die Herstellung der Nanoemulsionen sowie den Phasentransfer mittels Zentrifugation erfordert, sind sowohl in der Reproduzierbarkeit als auch im direkten Vergleich beider Messmethoden minimale Abweichungen zu erwarten. Die Liposomen aus einer 150 mM DPPC-Suspension zeigen in den ersten 140 h eine Größe von 90 nm bei einer leicht erhöhten Standardabweichung von ≈ 17 nm auf. Dies weist auf eine breitere Größenverteilung zu Beginn hin. Der Durchmesser verringert sich über den gemessenen Zeitraum auf

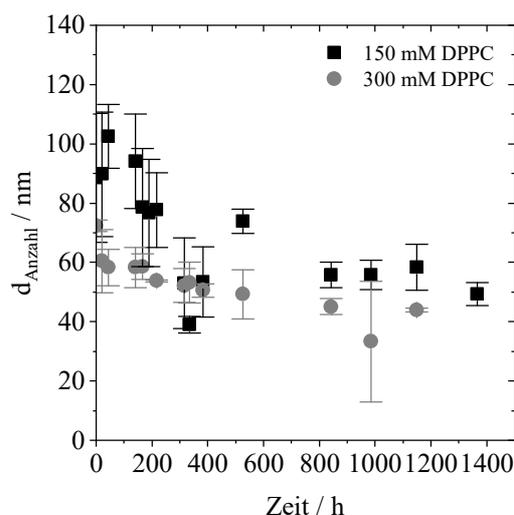


Abbildung 6.5: Langzeitstabilität über 8 Wochen für Liposomen, hergestellt aus einer 150 und 300 mM DPPC-Stamm suspension. Dargestellt ist der anzahlgewichtete Durchmesser d_{Anzahl} .

60 nm. Möglich ist eine Sedimentation der größeren Liposomen aufgrund des höheren Öl-Anteils in der Membran. Liposomen aus der 300 mM DPPC-Suspension weisen bereits zu Anfang eine Größe von durchschnittlich 62 nm auf und verbleiben in diesem Größenbereich für die untersuchte Zeit. Die Stabilitätsuntersuchungen von Stark et al. [134] zeigen ebenfalls eine Stabilität von 8 Wochen, wobei hierbei deutlich niedrigere Lagertemperaturen von -18°C sowie Frier-Auftau-Zyklen in der Herstellung verfolgt wurden. Da gegensätzlich zu den Arbeiten von Stark et al. weder eingekapselte Proteine noch Modifizierungen an den Liposomen vorhanden waren, konnte mit der Lagerstabilität von 4°C eine deutlich höhere Praktikabilität in der Versuchsdurchführung erzielt werden. Mit derzeitigem Kenntnisstand lässt sich vermuten, dass eine niedrigere Lagertemperatur keine Verbesserung der Langzeitstabilität von Liposomen aus DMPC, DPPC und DSPC bringt. Neben der Größe und Stabilität ist außerdem die bereits diskutierte Einkapselungseffizienz von Interesse, welche im Folgenden zu betrachten ist.

6.4 Auswahl der Nachweismethoden zur Einkapselung

Eine grundlegende Herausforderung bestand in der Auswahl einer Nachweismethode für die Bestimmung der Einkapselungseffizienz. Vorzugsweise ist die Methode einfach zu handhaben, schnell durchführbar und kann zwischen verschiedenen Stoffkomponenten, wie der Emulsion, den Liposomen und dem API, unterscheiden. Da sowohl Proteine als auch Fluoreszenz-markierte

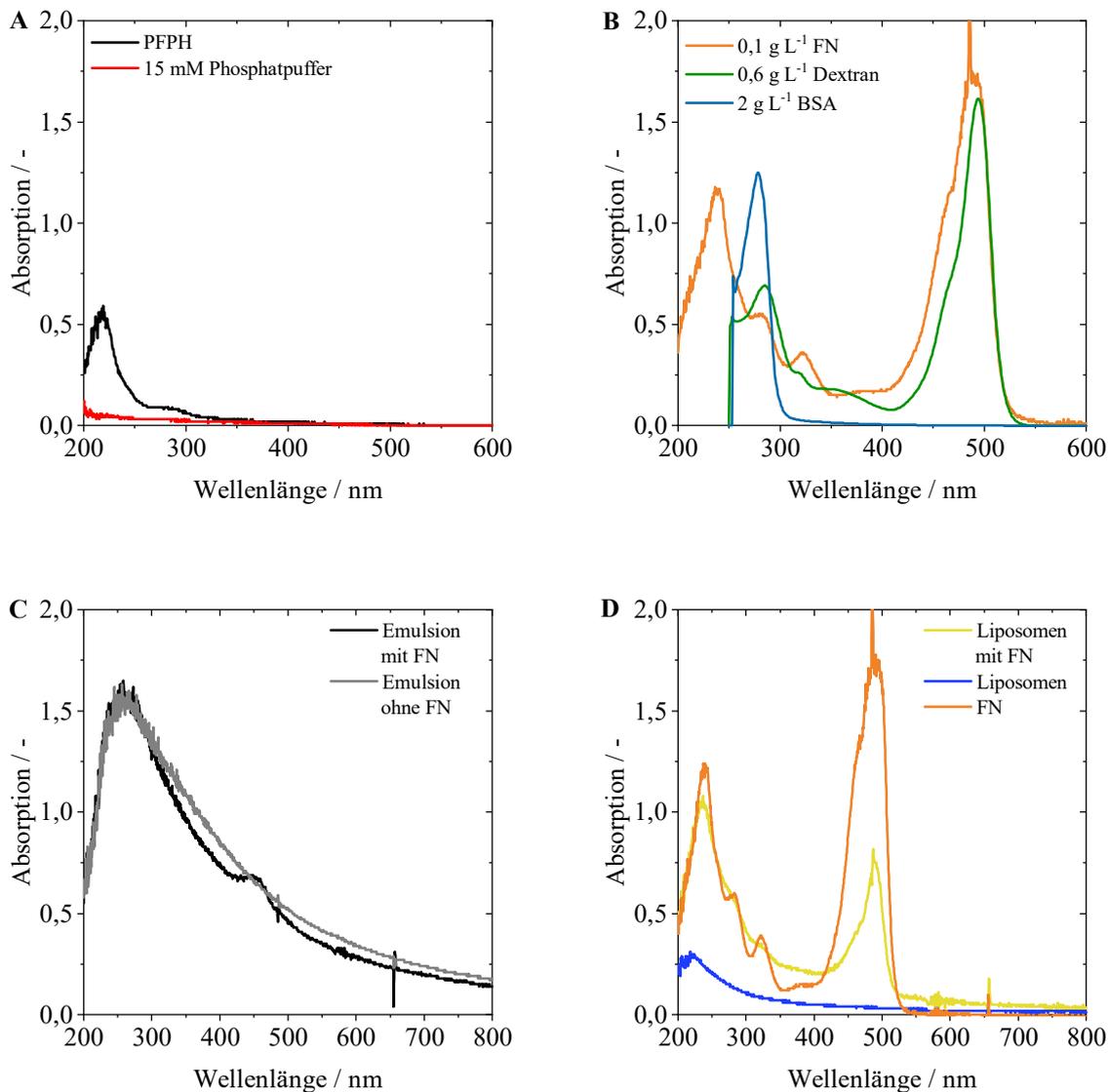


Abbildung 6.6: Absorptionsspektren der verschiedenen Komponenten, die Teil der Liposomenherstellung sind. (A): Spektrum des reinen Fluorocarbons PFPH (schwarz), Phosphatpuffers (rot) sowie (B) der verwendeten Modellwirkstoffe Fluoreszein-Natrium (FN, orange), FITC-D (grün) und BSA (blau). (C): Spektrum einer Emulsion mit und ohne FN (schwarz und grau), (D) Liposomen mit und ohne FN (gelb und blau) sowie das Spektrum einer FN-Stammlösung in Phosphatpuffer ohne Phospholipide in der Konzentration $c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$ (orange).

Stoffe im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich nachweisbar sind, fand eine Prüfung der Anwendbarkeit der UV-Vis Spektroskopie statt. Weisen die im Vorfeld aufgenommenen Spektren der Einzelkomponenten große Unterschiede auf, ist dies als besonders vorteilhaft für die Unterscheidung im Mehrkomponentensystem zu werten.

In Abbildung 6.6 sind die Spektren des Fluorocarbons, des Phosphatpuffers, der Emulsion, der Stammlösung, der Liposomen und die verdünnten Lösungen von entweder Fluoreszein-Natrium,

BSA oder Dextran dargestellt. Abbildung 6.6 A zeigt die Spektren des reinen PFPs und des Phosphatpuffers ohne Phospholipide. Der Phosphatpuffer weist keinen signifikanten Peak im ultravioletten oder sichtbaren Licht auf, während für PFP bei 215 nm eine Erhöhung der Absorption zu verzeichnen ist. Die Phospholipide streuen bei 230 nm, dargestellt anhand verschiedener DPPC-Konzentrationen in Abbildung A 7.2 im Anhang A7. Die Spektren der eingesetzten Modellwirkstoffe sind in Abbildung 6.6 B dargestellt. Der Modellwirkstoff Fluoreszein-Natrium zeigt einen signifikanten Absorptionspeak bei 491 nm, BSA bei 280 nm und FITC-D bei 493 nm. Weder das Fluorocarbon, der Phosphatpuffer noch unterschiedliche DPPC-Konzentrationen in den Stammlösungen weisen einen signifikanten Peak an der gleichen Position auf, sodass eine Unterscheidung der Modellwirkstoffe von den Einzelkomponenten gewährleistet ist.

Für die Bewertung der Einkapselungseffizienz während des Phasentransfers der Emulsionströpfchen sind nicht nur die Spektren der Einzelkomponenten (Abbildung 6.6 A und B), sondern vor allem die der im Herstellungsprozess notwendigen Zwischenprodukte wie die Nanoemulsion und die transferierten Liposomen relevant. Ein Vergleich des Absorptionsspektrums einer Emulsion mit FN und einer Emulsion ohne FN in Abbildung 6.6 C zeigt, dass das Fluorocarbon eine abschirmende Wirkung auf den Farbstoff hat, da der ursprüngliche Peak des reinen FN bei 491 nm gänzlich verschwindet. Ein Nachweis bzw. eine Unterscheidung ist dennoch möglich, da für die Emulsion mit FN ein kleiner Peak bei 458 nm sichtbar ist.

Die Spektren der hergestellten Liposomen mit und ohne eingekapselten FN sind in Abbildung 6.6 D dargestellt. Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum des reinen FN erneut abgebildet. Es ist zu erkennen, dass Liposomen ohne Modellwirkstoff lediglich einen Peak bei 220 nm aufweisen, während Liposomen, die FN enthalten, den charakteristischen Peak bei 491 nm zeigen. Die Höhe des Absorptionspeaks lässt Rückschlüsse auf die eingekapselte Konzentration anhand einer Kalibriergerade zu. Beispielhafte Spektren verschiedener FN-Konzentrationen und die daraus resultierende Kalibriergerade ist dem Anhang A 7 in Abbildung A 7.1 zu entnehmen.

Um Rückstände des Farbstoffes in der ursprünglichen W/FC Emulsion nach der Zentrifugation ausschließen zu können, wurde die hydrophobe Phase nach dem Phasentransfer vermessen. Das Spektrum des Fluorocarbons ist im Anhang A 7 Abbildung A 7.2 rechts dargestellt und zeigt nach der Zentrifugation die gleiche Extinktion wie im reinen Zustand. Dies deutet darauf hin, dass weder FN noch Phospholipide in der hydrophoben Phase verbleiben und der Transfer vollständig stattfindet.

Sowohl die einfache und schnelle Handhabung als auch die Möglichkeit, die einzelnen Stoffkomponenten gezielt unterscheiden zu können, machen die UV-Vis Spektroskopie zu einer geeigneten Nachweismethode der Einkapselung. Die Messmethode ist darüber hinaus für in-situ Messungen geeignet, sodass bei einer zukünftigen kontinuierlichen Herstellungsweise der Liposomen eine online-Beobachtung während des Prozesses möglich wäre. Dies haben bereits Rolinger et al. [135] und Rüdts et al. [136] im Rahmen von Prozess-Analyse Technologien für die Aufreinigung von Proteinen bzw. Virus-ähnlichen Partikeln zeigen können.

6.4.1 Einkapselungseffizienz

Die Modellwirkstoffe FN, BSA und FITC-D ergänzen die Stammlösung der Phospholipide mit 10 g L^{-1} , 100 g L^{-1} und 50 g L^{-1} . Die finale Konzentration in der Emulsion ist 1:100, da die Emulsion 1% der dispersen Phase enthält. Der komplette Einkapselungsprozess ist in Abbildung 6.7 dargestellt. Die Schritte 1 und 2 zeigen die Herstellung der Emulsion mittels Sonotrode. Anschließend erfolgt die Überschichtung der Emulsion mit der wässrigen, zweiten Phase sowie die Zentrifugation und der Transfer der Tröpfchen zur Liposomenbildung (Schritte 3-5). Zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz findet nach der Zentrifugation (Schritte 4 und 5) zuerst die Abnahme der oberen, wässrigen Phase statt. Die Trennung von freiem und eingekapseltem API (Schritt 6) findet in der Zentrifugaleinheit Vivaspin[®] mit integriertem Filtermodell statt. Für FN fand das Vivaspin 500[®] mit einer Kapazität von $500 \mu\text{L}$ und einem Molekulargewicht cut-off von 50 kDa Verwendung, das Vivaspin 2[®] kam für BSA und FITC-D mit einer Kapazität von 2 mL und Molekulargewicht cut-off von 100 kDa zum Einsatz. Für die Trennung der Phasen ist eine Zentrifugationsdauer von 3 h bei 4000 g und 0°C notwendig. Die Liposomen bleiben in der Filtermoduleinheit des Vivaspins[®] zurück und bilden das Retentat, während der freie Modellwirkstoff die Membran passiert und mittels UV-Vis Spektroskopie als Filtrat quantifiziert wird. Die theoretische Einkapselungseffizienz EE_{theo} ist in % angegeben und berechnet sich nach

$$EE_{theo}(\%) = \left(1 - \frac{c_F}{c_0}\right) \cdot 100, \quad (6.1)$$

wobei c_F die Konzentration an freiem API im Filtrat und c_0 die ursprüngliche Konzentration des API in der Emulsion darstellt.

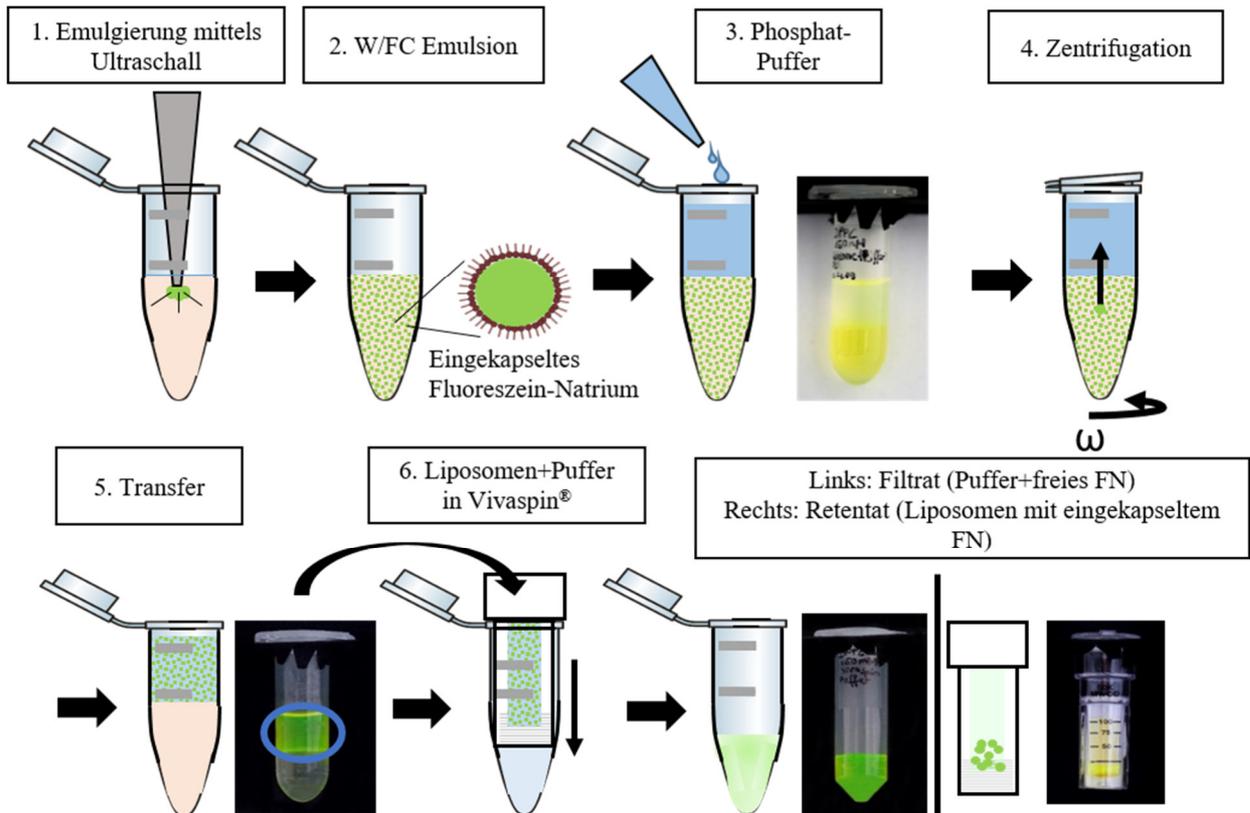


Abbildung 6.7: Schematische Darstellung des Einkapselungsprozesses am Beispiel von Fluoreszein-Natrium (FN). Die Schritte 1 und 2 zeigen die Emulgierung mittels Ultraschall und die daraus resultierende W/FC Nanoemulsion. Nach der Überschichtung der wässrigen Phase (hier Phosphatpuffer) in Schritt 3 folgt die Zentrifugation und dadurch der Transfer der Tröpfchen (Schritte 4 und 5). Der erfolgreiche Transfer ist in Schritt 5 anhand der Fotografie zu erkennen. Schritt 6 beinhaltet die Überführung der oberen wässrigen Phase in die Filtereinheit des Vivaspins® sowie Trennung von freiem und eingekapseltem Wirkstoff.

6.4.2 Wiederfindungsrate

Es stellt sich die Frage, ob der gesamte Anteil des Markers nach der Zentrifugation in die obere Phase übergegangen ist und sich der Modellwirkstoff nur noch als freies Fluoreszein-Natrium im Filtrat und eingekapselt im Retentat befindet. Aus der Messung der Konzentration des Markers in der oberen wässrigen Phase $c_{x,gesamt}$ lässt sich die Wiederfindungsrate WF_x

$$WF_x(\%) = \left(\frac{c_{x,gesamt}}{c_0} \right) \cdot 100 = \frac{m_F + m_R}{m_0} \cdot 100, \quad (6.2)$$

definieren. Der Index x steht für FN (Fluoreszein-Natrium), D (Dextran) oder PL (Phospholipid) und c_0 für die ursprüngliche Konzentration des Modellwirkstoffes in der Stammsuspension. Im optimalen Fall eines vollständigen Transfers finden sich 100% der Ausgangsmenge in der wässrigen Phase wieder. Um dies zu ermöglichen, ist die Zugabe einer 70%-igen Perchlorsäure im

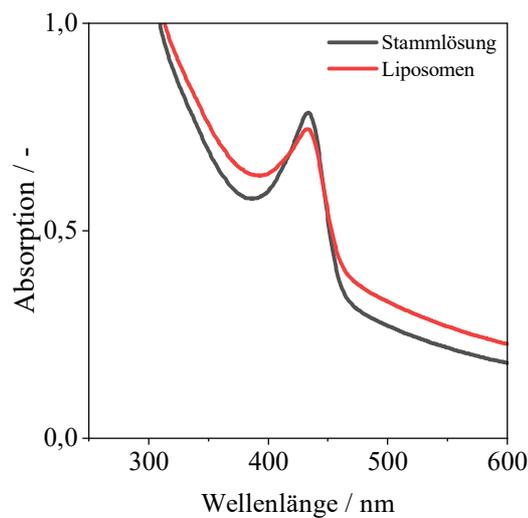


Abbildung 6.8: Absorptionsspektrum einer Stamm- und Liposomen-Suspension mit FN, beide behandelt mit Perchlorsäure für 10 min bei 50°C.

Volumenverhältnis von 1:1 zur wässrigen Phase notwendig. Die Perchlorsäure zerstört die Liposomen und setzt das eingekapselte FN frei. Entspricht die Summe aus der Menge FN im Filtrat m_F und der Menge FN im Retentat m_R der Ausgangsmenge m_0 , ist eine 100% Wiederfindungsrate und somit ein vollständiger Transfer gegeben.

Der Aufschluss der Liposomen erfolgte für 10 min bei 50°C auf einem beheizten Schüttler. Die Hitze beschleunigt die Reaktion der Säure mit der Liposomenphase. Die Quantifizierung des Modellwirkstoffes wurde mit der UV-Vis Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 435 nm und anhand einer Kalibrierkurve mit Perchlorsäure durchgeführt. Die charakteristische Peak-Position von FN verschiebt sich aufgrund der Zugabe der Säure von 491 nm auf 435 nm. Um die Vorgehensweise auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen und unterschiedliche Resultate zwischen einer behandelten Stammsuspension und der Liposomenphase auszuschließen, wurden beide Phasen mit Perchlorsäure behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.8 dargestellt und zeigt, dass die Spektren beider Proben den gleichen Verlauf und einen charakteristischen FN-Peak bei 435 nm aufweisen. Somit ist von einer Freisetzung des FN in der Liposomenphase durch die Aufschlussmethode auszugehen.

Die WF_{FN} ist im Folgenden für zwei unterschiedliche Konzentrationen der Phospholipide DMPC, DPPC und DPPG bestimmt und in Tabelle 6.3 zusammengefasst. Beide Konzentrationen an

DPPG, 150 und 300 mM, zeigen einen höheren Verlust an FN während des Liposomenherstellungsprozesses mit einer WF_{FN} von 81%, während die WF_{FN} für 150 und 300 mM DPPC-Liposomen bei 91% liegt. Eine Konzentration von 50 mM DPPC in der Stammsuspension führt lediglich zu einer WF_{FN} von 48%. Dies stimmt mit den Erkenntnissen aus Kapitel 6.3.1 überein, in denen eine Konzentration von nur 50 mM als zu niedrig für eine ausreichende Stabilisierung von W/FC-Nanoemulsionen ist. Ergo resultiert daraus eine schlechtere Wiederfindungsrate für die Modellwirkstoffe.

Das Phospholipid DMPC zeigt eine ähnlich niedrige WF_{FN} von 45% trotz einer Konzentration von 150 mM. DMPC besitzt eine Übergangstemperatur von 24°C, sodass durch die höhere Beweglichkeit der Phospholipide ein höherer Verlust während des Transfers zu vermuten ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter der Berücksichtigung von Verlusten während des Sonotriervorgangs und des Transfers bei einem hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis, eine WF_{FN} von 91% für das Phospholipid DPPC eine hohe Ausbeute zu erreichen ist.

Die in Tabelle 6.3 diskutierten Wiederfindungsraten zeigen, dass ein Teil des Modellwirkstoffes nicht am Phasentransfer teilnimmt und in der Stammsuspension oder an der Phasengrenze verbleibt. Da die theoretisch mögliche Wiederfindung von 100% ($\cong c_0$) nicht erreichbar ist, erfolgt die Einführung einer korrigierten Einkapselungseffizienz EE_{korr} . Diese berücksichtigt nur die Mengen, die tatsächlich am Phasentransfer teilgenommen haben und quantifiziert den eingekapselten Anteil der transferierten Menge nach

$$EE_{korr}(\%) = \left(1 - \frac{c_F}{c_{WF}}\right) \cdot 100 = \left(1 - \frac{m_F}{m_F + m_R}\right) \cdot 100. \quad (6.3)$$

Tabelle 6.3: Wiederfindungsrate von Fluoreszein-Natrium in %. Die Wiederfindungsrate WF_{FN} berechnet sich nach Gleichung (6.2) für verschiedene Phospholipide und Konzentrationen.

Phospholipid und Konzentration / mM	WF_{FN} / %
150 mM DMPC	45,08
50 mM DPPC	48,13
150 mM DPPC	91,97
300 mM DPPC	91,46
150 mM DPPG	81,26
300 mM DPPG	81,51

6.4.3 Positivnachweis der Einkapselung

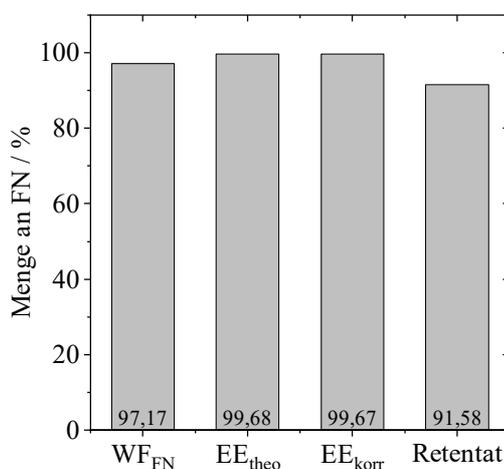


Abbildung 6.9: Unterschiedliche Berechnungen der Fluorescein-Natrium Menge (FN) zum Nachweis der Einkapselung. Dargestellt ist die Wiederfindungsrate WF_{FN} basierend auf der gesamten quantifizierten Menge an FN nach dem Transfer, die Menge an FN im Filtrat berechnet nach der theoretischen und korrigierten Einkapselungseffizienz EE_{theo} und EE_{korr} sowie die quantifizierte Menge an FN im Retentat nach zweimaliger Waschung der Membran mit Perchlorsäure.

Die eingeführten Berechnungen basieren auf einem Negativnachweis, bei dem vom frei vorliegenden Modellwirkstoff auf den eingekapselten geschlossen wird. Am Beispiel von DPPC ist im Folgenden der Positivnachweis gezeigt und mit den Ergebnissen der Wiederfindungsrate sowie der theoretischen und korrigierten Einkapselungseffizienz verglichen. Für den Positivnachweis ist die Menge des eingekapselten Wirkstoffes im Retentat zu bestimmen. Das Retentat enthält die Liposomen, welche mittels Perchlorsäure aufgeschlossen werden. Durch zweimaliges Waschen werden die Liposomen aufgrund der Reaktion mit der Säure zerstört und setzen den Modellwirkstoff frei. Die Konzentration des Modellwirkstoffes ist anschließend mittels UV-Vis Spektroskopie quantifiziert.

Die Wiederfindungsrate und die mit verschiedenen Methoden berechnete Einkapselungseffizienz sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Die WF_{FN} beträgt fast 100% im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Da das Filtrat nur geringe Mengen an FN enthält und die WF_{FN} hoch ist, nehmen sowohl EE_{theo} als auch EE_{korr} Werte von mehr als 99% an. Das auf der Filtermembran des Vivaspin[®] verbliebene Retentat misst fast 92%, was um 7% von der aus dem Filtrat berechneten Einkapselung abweicht. Eine Abweichung in der Größenordnung liegt darin begründet, dass sich

Liposomen auch innerhalb der Filtermembran befinden können, wo sich der Aufschluss schwieriger gestaltet. Unter diesem Aspekt weisen die Ergebnisse eine gute Übereinstimmung des Negativ- und Positivnachweises auf, sodass im Folgenden der Negativnachweis zur Bestimmung der Einkapselungseffizienz dient.

6.5 Einkapselung verschiedener Modellwirkstoffe

6.5.1 Fluoreszein-Natrium

6.5.1.1 Einfluss verschiedener Fluorocarbone

Im Vorfeld konnte bereits die Eignung von Fluorocarbonen für die Emulsionsherstellung festgestellt werden. Neben dem bereits intensiv untersuchten PFPH (auch als $C_{14}F_{24}$ bezeichnet) kamen drei weitere Fluorocarbone zum Einsatz, um die Einkapselungseffizienz am Beispiel von FN zu untersuchen: Perfluoroheptan (C_7F_{16}), Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan (C_8F_{16}) sowie Perfluoromethyldecalin ($C_{11}F_{20}$).

Die Ergebnisse der vier Fluorocarbone in Abbildung 6.10 sind so zu interpretieren, dass ein großer Unterschied zwischen EE_{theo} und EE_{korr} mit einer schlechten Einkapselungseffizienz einhergeht. Für die Fluorocarbone C_7F_{16} und C_8F_{16} ist eine große Differenz zwischen EE_{theo} und EE_{korr} zu erkennen. Das bedeutet, ein Großteil des Modellwirkstoffes verbleibt während des Transfers in der Emulsion. Das höhermolekulare $C_{11}F_{20}$ weist absolut einen geringeren FN-Verlust bei gleichzeitig niedrigem Unterschied von 10% in den Einkapselungseffizienzen auf. Dieses Fluorocarbon verzeichnet demnach einen geringeren Verlust während des Transfers. Konträr zu den Ergebnissen zeigen visuelle Beobachtungen während der Experimente für diese drei hydrophoben Phasen instabile Nanoemulsionen mit Tröpfchen, die bereits ohne Zentrifugation schnell in die obere Phase übergehen. Dies erschwert die Kontrolle des Prozesses und ist nicht wünschenswert. $C_{14}F_{24}$ weist mit Abstand die höchste Einkapselungseffizienz auf und zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen EE_{theo} und EE_{korr} . Visuell sind keine Instabilitäten zu beobachten.

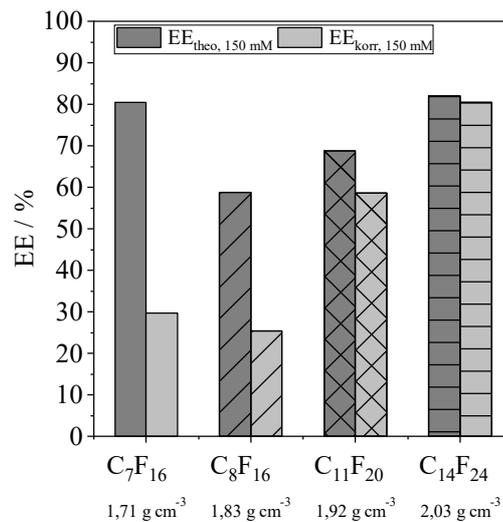


Abbildung 6.10: Einkapselungseffizienz EE der Fluorocarbone Perfluoroheptan (C_7F_{16}), Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan (C_8F_{16}) sowie Perfluoromethyldecalin ($C_{11}F_{20}$) und Perfluoroperhydrophenanthren ($C_{14}F_{24}$) für den Modellwirkstoff Fluoreszein-Natrium, der in DPPC-Liposomen eingekapselt ist (Stammsuspension von 150 mM für die Stabilisierung der W/FC Nanoemulsion). In dunkelgrau ist die theoretische Effizienz nach Gleichung (6.1) und in hellgrau die korrigierte Effizienz nach Gleichung (6.3) dargestellt. Ergänzt ist für jedes Fluorocarbon die jeweilige Dichte.

Abbildung 6.10 lässt den Schluss zu, dass die Einkapselungseffizienz mit niedriger Dichte der Fluorocarbonphase abnimmt. Die Erkenntnis zur Instabilität von Nanoemulsionen mit leichteren Fluorocarbonen decken sich mit der Arbeit von Kabalnov et al. [106]. Ein höherer Verlust an Wirkstoff ist wahrscheinlich, wenn die Stabilität der Nanoemulsionen bereits schlecht ist und aufgrunddessen die Mizellen schneller aufbrechen können. Da $C_{14}F_{24}$ die höchste Stabilität der Nanoemulsionen erzielt und die besten Resultate zur Einkapselung zeigt, ist dieses im Folgenden weiter zu verwenden.

6.5.1.2 Einfluss verschiedener Phospholipide und Zugabe von Cholesterin

Sowohl verschiedene Phospholipide als auch Variationen von deren Konzentrationen sind Gegenstand der Untersuchungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.4 aufgelistet. Es zeigt sich, dass höhere Mengen an DPPC in der Stammsuspension mit einer größeren Menge an verkapseltem FN einhergehen: Eine hohe Konzentration von 300 mM führt zu einer Einkapselungseffizienz von 84%, während 50 mM DPPC in der Stammsuspension eine maximale Menge von 48% verkapseln. Dies lässt den Schluss zu, dass höhere Ausgangskonzentrationen von Phospholipiden

Tabelle 6.4: Berechnete Einkapselungseffizienz EE_{korr} (%) für verschiedene Phospholipide und Konzentrationen für den Modellwirkstoff Fluoreszein-Natrium. Phosphatpuffer wurde als wässrige Phase verwendet.

Phospholipid	EE_{korr} / %
150 mM DMPC	96,8
50 mM DPPC	48,1
150 mM DPPC	80,4
300 mM DPPC	83,6
300 mM DPPC + Cholesterin (60:40)	73,7
300 mM DPPG	63,1

nicht nur zur Stabilisierung der Nanoemulsionen beitragen, sondern auch eine größere Menge des Modellwirkstoffes einkapseln. Die Erkenntnis zur Einkapselungseffizienz deckt sich mit den Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Nanoemulsionen aus Kapitel 5.4. Darüber hinaus wurde überprüft, ob mögliche Verluste der Phospholipide während des Transfers ebenfalls die geringere Einkapselung erklären könnten. Die Verlustanalyse kann dem Anhang A8 aus Tabelle A 8.1 entnommen werden. Der festgestellte Phospholipidverlust von 30% während des Herstellungsprozesses begründet, dass für eine Stabilisierung der Wassertröpfchen eine größere Menge an Phospholipiden notwendig ist.

Die Verwendung des Phospholipids DMPC mit einer kürzeren Kettenlänge führt zu einer Einkapselungseffizienz von 96%. Allerdings ist die WF_{FN} im Vergleich zu DPPC mit 45% deutlich geringer (vgl. Tabelle 6.3). Von den 45% Wirkstoff, die tatsächlich am Phasentransfer teilnehmen, wird ein Großteil eingekapselt, insgesamt ist jedoch ein höherer Verlust vermutlich an der Wand des Reaktionsgefäßes und in der Phasengrenze zu verzeichnen.

Generell stabilisiert der Zusatz von Cholesterin oder negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppen die Zellmembranen. Eine erhöhte Stabilität geht mit einer Steigerung der Membranflexibilität einher. Ob sich diese positiv oder negativ auf die Einkapselung von FN auswirkt, gilt es einerseits mit einem Gemisch aus DPPC und Cholesterin im Molverhältnis von 60:40 und andererseits mit reinem, anionischen DPPG zu überprüfen.

Die Absorption des Filtrats aus DPPC + Cholesterin Liposomen ist deutlich höher als die des Filtrats von DPPC-Liposomen. Die Einkapselungseffizienz unterscheidet sich dementsprechend von 83% bei reinen DPPC-Liposomen zu 74% bei Zugabe von Cholesterin. Ahmad et al. [137] erreichen für eine Mischung aus Phosphatidylcholin (PC) und Cholesterin im Verhältnis von 0,9:1 eine Einkapselungseffizienz von 25,86%, die sich bei einem höheren PC-Anteil von 1,1:1 auf

42,34% erhöht. In dieser Arbeit liegt ein Verhältnis von 1,5:1 vor. Demzufolge gilt eine Verbesserung der Einkapselung durch einen höheren DPPC-Anteil als wahrscheinlich. Eine Abnahme der Einkapselungseffizienz mit einer Erhöhung des Cholesterinanteils beschreiben auch Briguila et al. [138]. Da die Übergangstemperatur des Phospholipids DPPC während des Prozesses nicht überschritten wird ($T_{c,DPPC} = 41,4^{\circ}\text{C}$, Versuchstemperatur 0°C), Cholesterin aber gleichzeitig die Fluidität der Membran unterhalb der Übergangstemperatur erhöht [139], führt dies zu einem höheren Biegemodul bzw. die Zähigkeit der Doppelschicht. Die Vermutung liegt nahe, dass darin die geringere Einkapselung begründet ist. Cholesterin verändert die Eigenschaften der Membran und verlangsamt daher die Dynamik der Membranfusion. Chernomordik et al. [140] beschreiben die Membranfusion als eine Funktion der Membraneigenschaften, wie z.B. der Dichte der Fusionsproteine und der Lipidzusammensetzung. Zwei Membranen kommen in Kontakt und bilden eine Hemifusion, bevor sie zusammenschmelzen. Bei der Zentrifugation fusioniert die Membran in umgekehrter Weise: Beim Passieren der Zweiphasengrenzfläche bildet sich die Doppelschicht dynamisch um den Emulsionstropfen. Im Moment der Ablösung der neu gebildeten Liposomen von der Grenzfläche sind diese noch nicht vollständig geschlossen, was zu einem Auslaufen des Modellwirkstoffs führt. Die Schnelligkeit des Schließens der Membran hat somit eine Signifikanz für die Einkapselungseffizienz. Da Cholesterin das Biegemodul erhöht, wie auch von Pan et al. [141] und Needham et al. [142] beschrieben, benötigen die Membranen mehr Zeit, um sich nach der Ablösung von der Grenzfläche zu schließen und verlieren somit mehr des Modellwirkstoffes.

Ebenso zeigen Liposomen, hergestellt mit dem anionischen Phospholipid DPPG, eine geringere Einkapselungseffizienz von 63% im Vergleich zu Liposomen, die mit dem zwitterionischen DPPC stabilisiert sind. Jing et al. [143] beobachten eine Reduktion der Lipiddoppelschichtdicke und -dichte aufgrund einer höheren Elektronen-Nettoladungsdichte. Dieses Phänomen ist auf die negativ geladenen Kopfgruppen des DPPG zurückzuführen, deren Abstoßungskraft stärker ist als die der zwitterionischen DPPC-Moleküle. Dadurch vergrößert sich der Abstand und Neigungswinkel zwischen den Kopfgruppen. Zusätzlich erhöht sich die Festigkeit der Membran, wie von Faizi et al. [144] beschrieben. Es ist anzunehmen, dass die Doppelschicht bei der Verwendung von anionischen Kopfgruppen durchlässiger und FN daher leichter freizusetzen ist. Cholesterin und negativ geladene Kopfgruppen wirken somit nicht effizienzsteigernd.

6.5.2 Einkapselung von Rinderserumalbumin unter Anwendung osmotischer Bedingungen

Die vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass niedermolekulare Modellwirkstoffe mit sehr hohen Effizienzen eingekapselt werden können. Herausfordernd bleibt die Einkapselung von hochmolekularen Proteinen. Ein gängiges Modellprotein ist BSA, welches hier neben FITC-D Anwendung fand. Beide Modellwirkstoffe sind größer als 60 kDa und lassen sich über die UV-Vis Spektroskopie nachweisen. Darüber hinaus ist es für eine pharmazeutische Applikation besonders relevant, verschiedene osmotische Bedingungen zu untersuchen, die im menschlichen Blut die Einkapselung beeinflussen können. Durch Erhöhung der Konzentration des Phosphatpuffers lässt sich der osmotische Druck im Inneren oder Äußeren des Liposoms steigern. Auf diese Weise können die Untersuchungen am liposomalen wässrigen Modellsystem Prognosen für den menschlichen Organismus ermöglichen.

In Abbildung 6.11 links ist der direkte Vergleich der Einkapselungseffizienz zwischen FN und BSA dargestellt. Die Liposomen stammen aus einer 150 mM DPPC-Stamm suspension. Als wässrige Phase innerhalb und außerhalb der Liposomen diente ausschließlich ddH₂O ohne Phosphationen. Die Einkapselungseffizienz ist für das als deutlich größeres Molekül um 10% niedriger als für FN. Während in der wissenschaftlichen Literatur die Einkapselungseffizienzen mit Steigerung des Molekulargewichts signifikant abnehmen [126,145], scheinen durch die verfahrenstechnische Zentrifugation nur geringe Mengen des hochmolekularen Wirkstoffes verloren zu gehen. Eine Vermutung für die effizientere Einkapselung liegen in der schnelleren Doppelschichtbildung infolge der bereitgestellten Phospholipide an der Phasengrenzen und der Zentrifugalbeschleunigung begründet. Gegensätzlich zur Filmmethode, bei der die Doppelschichtbildung diffusionskontrolliert langsamer abläuft, sorgt der Input infolge der Zentrifugalbeschleunigung beim Phasentransfer für einen positiven Effekt. Darüber hinaus findet über die als erstes hergestellte Emulsion eine gezielte Einkapselung statt, während bei der Filmmethode alle Komponenten unkontrolliert zusammengegeben werden. Dies führt zu einem großen Verlust des Proteins. Das Materialsystem ist als dritter möglicher Einflussfaktor für die verbesserte Einkapselung zu nennen. Das inerte PFPH lässt eine Vermischung mit dem Protein nicht zu, sodass dieses in der wässrigen Phase verbleibt und zwangsläufig am Phasentransfer teilnimmt.

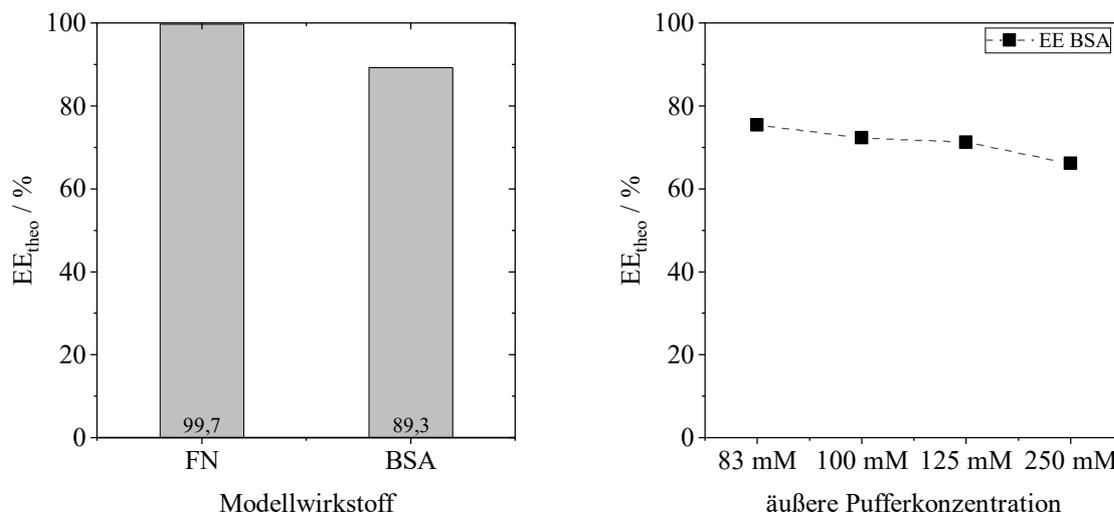


Abbildung 6.11: Einkapselungseffizienz EE von DPPC-Liposomen (150 mM in der Stammsuspension) für den Modellwirkstoff BSA. Links: Vergleich der EE zwischen Fluoreszein-Natrium (FN) und BSA, mit ddH₂O als wässrige Phase. Rechts: Einfluss der Pufferkonzentration auf die EE von BSA. Die innere wässrige Phase enthält durchgängig 83 mM Phosphatpuffer, während die äußere Konzentration des Phosphatpuffers (obere, wässrige Phase) zwischen 83 mM und 250 mM variiert. Die äußere Konzentration ist auf der x-Achse angegeben.

Die Untersuchungen des osmotischen Einflusses auf die Einkapselungseffizienz von BSA zeigt Abbildung 6.11 rechts. Die Phosphatkonzentration ist im Inneren des Liposoms konstant bei 83 mM, während die äußere wässrige Phase von 83 mM auf 250 mM schrittweise zunimmt. Infolge der äußeren höheren Phosphationenkonzentration entsteht außerhalb des Liposoms ein höherer osmotischer Druck. Um den Druck auszugleichen, wandern die Wassermoleküle von Innen nach Außen. Der Ausstrom von Ionen aus dem Liposom wird in der Mikrobiologie als Efflux bezeichnet. Es ist zu erwarten, dass mit erhöhter Salzkonzentration außerhalb des Liposoms auch ein größerer Efflux einhergeht und dieser damit das Auslaufen des Modellwirkstoffes begünstigt. Diese Annahmen spiegeln die in Abbildung 6.11 rechts dargestellten Ergebnissen wider. Die bei gleichen osmotischen Bedingungen innerhalb und außerhalb des Liposoms (83 mM Phosphatpuffer) erreichte Einkapselungseffizienz von 78% liegt unterhalb der Effizienz von Reinstwasser ohne Phosphationen (89%). Da durch die gleiche Salzkonzentration innerhalb und außerhalb kein Efflux entsteht, muss die Phosphatkonzentration die Einkapselungseffizienz während des Phasentransfers beeinflussen. Eine Erklärung liefern Le et al. [146], welche die Rolle verschiedener Metallionen auf die Beeinflussung von Phospholipidmembranen untersuchten. Die Autoren stellen fest, dass sich Ionen wie Na⁺ oder Mg²⁺ zwischen die Kopfgruppen lagern. Über den Phosphatpuffer (NaH₂PO₄ und Na₂HPO₄) werden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Na⁺-Ionen der

Membran zugeführt. Dies könnte zu einer höheren Durchlässigkeit der Membran führen und somit zu einem Verlust des Wirkstoffes.

Mit steigender Salzkonzentration außerhalb des Liposoms und zunehmenden Efflux nimmt die Einkapselungseffizienz weiter ab. Das bedeutet, dass eine erhöhte Salzkonzentration außerhalb des Liposoms im menschlichen Blut eine frühzeitige Freisetzung des Wirkstoffes begünstigen würde. Ein Efflux im Blut liese sich nur durch Anpassung der Salzkonzentration innerhalb des Liposoms während des Herstellungsprozesses erzielen.

Bei einer maximalen Differenz der Salzionen zwischen innen und außen ist eine Effizienz von 66% festzustellen. Da das Molekulargewicht deutlich höher ist, erscheint eine Verkapselung schwieriger und somit ist eine geringere Einkapselungseffizienz auch unter osmotischen Änderungen zu erwarten.

6.5.3 Einkapselung von FITC-D unter Anwendung osmotischer Bedingungen

In einem zweiten Experiment ist der umgekehrte Mechanismus – der Influx – am Beispiel von FITC-D untersucht worden. Der Influx beschreibt eine osmotische Situation, bei der eine geringere Salzkonzentration außerhalb des Liposoms zu einer Bewegung von Wasserionen durch die Membran in das Vesikel führt und damit zu einer Liposomenvergrößerung beiträgt. Der Efflux ist der bereits beschriebene gegenteilige Effekt. Für beide Fälle ist ein maximaler Unterschied in der Salzkonzentration (0 mM und 250 mM) analysiert worden. Zusätzlich ist ein Vergleich bei gleichen Bedingungen innerhalb und außerhalb des Liposoms betrachtet worden.

Auch hier zeigt sich ohne In- und Efflux in Abbildung 6.12 ein ähnliches Ergebnis wie bei den Untersuchungen mit BSA. Während ohne Salz (0 mM) die höchste Einkapselungseffizienz mit 98% zu erreichen ist, reduziert ein Efflux diesen um 31,4%. Im Vergleich dazu kapseln hohe Salzkonzentrationen von 250 mM weniger Dextran ein aber ein Zufluss stabilisiert das Liposom und führt zu einer besseren Einkapselungseffizienz (95%). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ultrareines Wasser innerhalb und außerhalb des Liposoms zu einer geringeren Beeinträchtigung der Phospholipide und zu einer erhöhten Stabilität führt, während ein Efflux die Lipidvesikel destabilisiert und stets Modellwirkstoff freisetzt. Dies geht einher mit den Ergebnissen aus Abbildung 6.9, in der die Einkapselungseffizienz für DPPC-Liposomen und Fluoreszein-Natrium

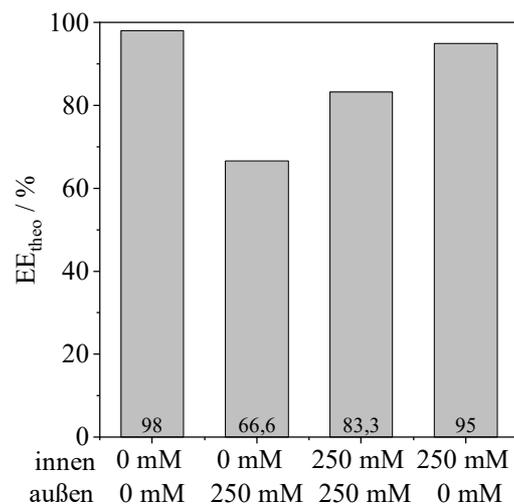


Abbildung 6.12: Einkapselungseffizienz von DPPC-Liposomen (150 mM in der Stammsuspension) für den Modellwirkstoff Dextran bei provoziertem Efflux- und Influx-Verhältnissen: Die erste Zeile der x-Achse bezeichnet die Konzentration des Phosphatpuffers innerhalb des Liposoms, die Konzentrationsangaben in der zweiten Zeile beziehen sich auf den äußeren Phosphatpuffer nach der Zentrifugation.

als Modellwirkstoff 99% erreicht. Überraschend ist die Tatsache, dass ein Influx die Stabilität der Vesikel nicht reduziert. Scheinbar ist die Konzentration von 250 mM noch niedrig genug, um ein Platzen der Liposomen und somit ein Freisetzen von Wirkstoff durch einen starken Influx zu verhindern. Durch die eintretende Flüssigkeit schwellen die Liposomen zwar an, der Wirkstoff bleibt aber eingekapselt und erreicht einen ähnlich hohen Wert wie bei einem Transfer ohne Phosphationen.

6.6 Theoretische Betrachtung des Transfers

Den Transfer der Emulsionströpfchen diskutierte bereits Sommerling et al. anhand eines Modellsystems von Silica-Partikeln und der Öl-Phase Squalen [130]. Für eine mathematische Betrachtung zur Eignung des Transfers für das Fluorocarbon-System fehlten bis dato die entsprechenden experimentellen Daten wie die Grenzflächenspannungen zwischen den fluiden Phasen. An dieser Stelle soll daher neben dem praktischen Nachweis der vorangegangenen Kapitel in Anlehnung an die Theorie von Sommerling et al. ein theoretischer Beweis des Phasentransfers erfolgen.

Die Autoren stellen eine Energiebilanz auf, welche zeigt, dass der Transfer des Partikels maßgeblich vom Kontaktwinkel zwischen Partikel und Fluid abhängt. Somit wäre eine sehr hohe Zentrifugalbeschleunigung für einen vollständigen Transfer notwendig. Beispielsweise sind bei einem Kontaktwinkel von 142° theoretisch mehr als 10.000 G nötig, um eine Partikelgröße von $34 \mu\text{m}$ zu transferieren. Diese Zahlen beruhen auf der Energiebilanz zum Phasentransfer nach Sommerling et al. [130]:

$$E_{PT} = E_{kin} + E_{vol} = \frac{1}{2}mv^2 + \int_0^h F_G - F_A(h)dh . \quad (6.4)$$

Die für den Phasentransfer benötigte Energie setzt sich aus der kinetischen Energie E_{kin} des dispersen Teilchens mit der Masse m und der Geschwindigkeit v sowie der volumetrischen Energie E_{vol} zusammen. Als volumetrische Energie wird hierbei das Integral über die Kräftedifferenz zwischen Gewichtskraft F_G und Auftriebskraft F_A der Länge h definiert. Übersteigt die Summe der kinematischen und volumetrischen Energie die für den Phasentransfer notwendige Energie E_{PT} , erfolgt der Phasenwechsel der dispersen Teilchen. Nach Sommerling et al. kann E_{PT} durch Integration der einzelnen Grenzflächenspannungen über die Benetzungsfläche des dispersen Teilchens bestimmt werden. Substitution und Einsetzen der Young¹⁴-Gleichung führt unter Annahme eines vollständigen Transfers zu:

$$E_{PT}(2r) = -\cos\theta \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \gamma_{f1f2} , \quad (6.5)$$

sodass die Energie zum Phasentransfer lediglich eine Funktion des Kontaktwinkels θ , des Partikelradius r und der Grenzflächenspannung γ_{f1f2} zwischen beiden Fluiden ist. Ist der Kontaktwinkel wie bei Sommerling et al. über 90° , ist von hydrophoben Eigenschaften zu sprechen und Energie ist notwendig, um den Transfer zu vollziehen. Unterhalb von 90° besitzt das Partikel eine hohe Benetzbarkeit – ein bewegtes disperses Teilchen kann die Grenzfläche ohne zusätzliche Energie passieren.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit jeweils um flüssig-flüssig-Grenzflächen handelt, ist eine Umformung der Grenzflächenspannung über die Young-Gleichung nicht notwendig. Nach Kralchevsky et al. [147] ergibt sich in diesem Fall die Berechnung der Phasentransferenergie über die

¹⁴ Thomas Young (* 13. Juni 1773; † 10. Mai 1829) war ein englischer Augenarzt und Physiker.

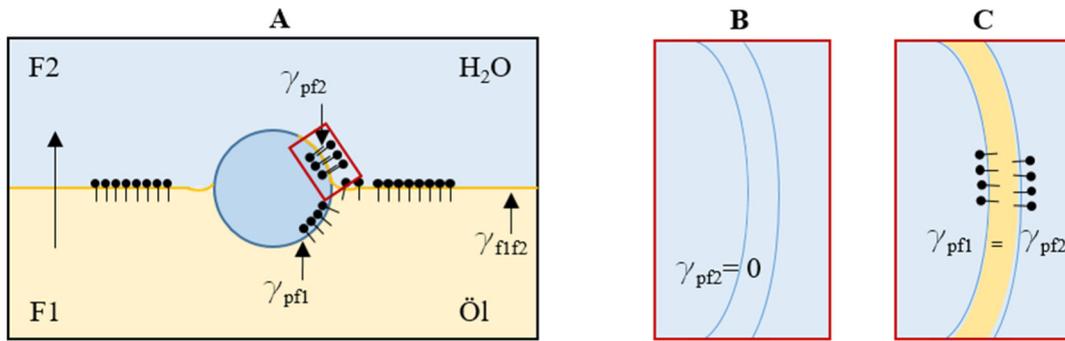


Abbildung 6.13: Schematische Illustration des Phasentransfers. **(A)** Gesamtansicht eines Tropfens während des Transfers zum Zeitpunkt des Durchtritts von Flüssigkeit **F1** (Öl) durch die Grenzfläche γ_{f1f2} in die Flüssigkeit **F2** (Wasser). Die Grenzfläche γ_{pf1} zwischen Wassertropfen und Öl kann mit und ohne Phospholipiden belegt sein, ebenso die Grenzfläche γ_{pf2} zwischen dem Wassertropfen und der wässrigen Phase. **(B)** Im Fall des Transfers eines Wassertröpfchens aus der hydrophoben Phase in die wässrige Phase entsteht keine neue Grenzfläche. **(C)** Aufgrund des dünnen Ölfilms innerhalb der sich ausbildenden Membran sind die Grenzflächenspannungen identisch.

Grenzflächenspannung zwischen dem dispersen Teilchen mit dem Radius r und den Fluiden **F1** (Öl), γ_{pf1} , und **F2** (Wasser), γ_{pf2} zu

$$E_{pT}(2r) = 4 \cdot \pi \cdot r^2 (\gamma_{pf2} - \gamma_{pf1}) . \quad (6.6)$$

Der Wegfall des Kontaktwinkels liegt physikalisch darin begründet, dass ein Kontaktwinkel zwischen zwei flüssigen Phasen nicht existiert.

Schematisch sind die Zustände inklusive der einzelnen Grenzflächenspannungen während des Transfers in Abbildung 6.13 dargestellt. Zuerst sei der Fall betrachtet, dass lediglich ein Wassertropfen von der hydrophoben Phase in die wässrige Phase übergeht (Abbildung 6.13 (B)). In diesem Fall nimmt die Grenzflächenspannung zwischen PFPH und Wasser einen Wert von $\gamma_{pf1} = 52 \text{ mN/m}$ an. Sobald der Tropfen die hydrophobe Phase verlässt, befindet er sich in der ebenfalls wässrigen Phase mit $\gamma_{pf2} = 0 \text{ mN/m}$. Einsetzen in Gleichung (6.6) ergibt immer eine negative Phasentransferenergie – der Transfer ist somit ohne zusätzliche Energie möglich.

In Fall (C) sind zusätzlich die Phospholipide vorhanden. Aus Kapitel 4.3 ist bekannt, dass das Phospholipid DPPC an der CMC einen Wert von $\gamma_{pf1} = 25 \text{ mN/m}$ aufweist. Aufgrund des Ölfilms, der sich um das Emulsionströpfchen und zwischen der Membran bildet, reduziert sich die Grenzflächenspannung zwischen Liposom und wässriger Phase γ_{pf2} auf 25 mN/m . Die Phasentransferenergie wird damit Null und die Summe aus kinetischer und volumetrischer Energie ist zu jeder

Zeit größer als E_{PT} . Die Betrachtung zeigt, dass sowohl in der Praxis als auch in der Theorie der Transfer mit dem Fluorocarbon-System möglich ist.

6.7 Schlussfolgerungen

Die Herstellung von Liposomen ist mit dem Zentrifugationsprozess ohne die Nutzung eines organischen Lösungsmittels erfolgreich gelungen. Dazu sind die Phospholipide im ersten Schritt in der wässrigen Phase mittels Ultraschall zu suspendieren. Ebenfalls durch Ultraschall dispergierung erfolgt im nächsten Schritt die Herstellung einer Wasser-in-Fluorocarbon (W/FC) Nanoemulsion. Die darin enthaltenen Mizellen werden durch Zentrifugalbeschleunigung zum Phasentransfer in eine zweite wässrige Phase gebracht. Während des Aufrahmens bildet sich die Lipiddoppelschicht dynamisch an der Grenzfläche zwischen Nanoemulsion und wässriger Phase.

Zur Bestimmung der mittleren Liposomengröße nach dem Phasentransfer kam neben der im vorherigen Kapitel 5 diskutierten dynamischen Lichtstreuung (DLS) zusätzlich die Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) zum Einsatz. Aufgrund des Ölfilms, welcher sich während des Transfers in der Membran anlagert, ist ein hoher Elektronendichteunterschied zwischen Membraninneren und -äußeren gegeben. Der Elektronendichteunterschied ist für die SAXS besonders vorteilhaft, da hierdurch hohe Streuintensitäten Rückschlüsse zur Liposomengröße erlauben. Sowohl die SAXS-Messungen als auch die Auswertung des anzahlbasierten Durchmessers liefern eine mittlere Liposomengröße von 60 nm.

Eine Studie zur Phospholipidkonzentration zeigte, dass eine Mindestkonzentration von 150 mM an Phospholipiden notwendig ist, um Liposomen mit einer Zielgröße < 200 nm herzustellen. Die Kettenlänge der Phospholipide beeinflusst zwar die Dicke der Doppelschicht, hat aber keinen signifikanten Einfluss auf die Liposomengröße. In Bezug auf eine spätere pharmazeutische Anwendung ist die Langzeitstabilität der Liposomen im untersuchten Konzentrationsbereich über mehrere Wochen gewährleistet.

Die Problematik mit der Eintragung von Gasblasen während der Nanoemulsionsherstellung ist für die Liposomenherstellung unbedeutend. Aufgrund des Dichteunterschieds rahmen nicht nur die Mizellen als Folge der Zentrifugation auf, sondern auch die Gasblasen.

Zur Überprüfung der Einkapselungseffizienz der produzierten Liposomen kamen die Modellwirkstoffe Fluoreszein-Natrium, BSA und fluoreszenz-markiertes Dextran zum Einsatz. In einem ersten Schritt wurde die UV-Vis Spektroskopie als Nachweismethode erfolgreich etabliert. Die eingesetzten Stoffkomponenten weisen unterschiedliche Adsorptionsspektren mit charakteristischen Peaks auf. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz können anhand vorab bestimmter Kalibrierkurven die eingesetzten Komponenten unterschieden und in ihrer Konzentration bestimmt werden. Dementsprechend lassen sich nicht nur O/W, sondern auch W/O oder W/FC Emulsionen analysieren. Da die UV-Vis Spektroskopie auch in-situ Messungen erlaubt, ist die Analytik mit Blick auf eine kontinuierliche Liposomenherstellung und einer Online-Analytik während des Prozesses vielversprechend.

Je nach eingesetztem Phospholipid liegt die Einkapselungseffizienz für Fluoreszein-Natrium zwischen 48 und 98% für PFPH. Andere Fluorocarbone mit einem geringeren Molekulargewicht weisen dagegen eine geringere Einkapselungseffizienz (20-60%) auf. Dies ist sowohl auf die Polydispersität innerhalb der zuvor hergestellten Nanoemulsionen zurückzuführen als auch auf die kurze Emulsionsstabilität. Hier gilt daher: Je höher das Molekulargewicht des Fluorocarbons, desto stabiler ist die Nanoemulsion und desto erfolgreicher die Einkapselung. PFPH ist entsprechend zu bevorzugen.

Die Konzentration der Phospholipide beeinflusst nicht nur die Liposomengröße, sondern auch die Einkapselungseffizienz – 300 mM in der Stammsuspension kapseln effizienter ein als 150 mM. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass sich Komponenten wie Cholesterin oder geladene Phospholipide, welche üblicherweise biologische Membranen stabilisieren, negativ auf die Einkapselung auswirken. Die erhöhte Flexibilität führt im Fall der Einkapselung zu höheren Verlusten, weil sich die Membranen der Liposomen beim Durchtritt durch die Phasengrenze langsamer schließen.

Mit der Zentrifugationsmethode gelingt nicht nur die Einkapselung von niedrigmolekularen Verbindungen wie Fluoreszein-Natrium, sondern auch von Makromolekülen wie BSA oder Dextran mit einer Größe von > 60 kDa. Die erreichte Einkapselung beträgt 89% für BSA und 98% für Dextran. Die für beide Moleküle untersuchten osmotischen Bedingungen sind denen in der menschlichen Blutbahn nachempfunden. Prinzipiell wäre ein Influx dem Efflux vorzuziehen ist, obwohl bei einem Influx das Platzen der Liposomen und somit eine frühzeitige Freisetzung des Wirkstoffes zu erwarten wäre. Vorzugsweise herrschen innerhalb und außerhalb des Liposoms

jedoch die gleichen Bedingungen, sodass der osmotische Effekt zu vernachlässigen ist. Für diesen Fall wäre exakt die Salzkonzentration des menschlichen Blutes innerhalb des Liposoms während des Herstellungsprozesses in der Nanoemulsion einzustellen.

Die theoretische Betrachtung des Phasentransfers zeigt, dass mit der Auswahl der passenden hydrophoben Phase ein Transfer möglich ist. Mathematisch sind für das flüssig-flüssig-System die Grenzflächenspannungen zwischen den fluiden Phasen und der Dichteunterschied anstatt des Kontaktwinkels relevant. Die Summe aus kinematischer und volumetrischer Energie übersteigt die benötigte Phasentransferenergie.

Zusammenfassend sind in Bezug auf die optimalen Bedingungen für die Herstellung von Liposomen folgende Aussagen zu treffen:

1. Die Zentrifugationsmethode erlaubt eine nahezu vollständige Einkapselung verschiedener Wirkstoffe.
2. PFPH ist unter den bisher untersuchten hydrophoben Phasen am besten geeignet für eine stabile Nanoemulsion als Ausgangskomponente.
3. Die Stabilisierung sollte mit mindestens 150 mM DPPC, bestenfalls jedoch 300 mM erfolgen.
4. Gleiche Salzkonzentrationen innerhalb und außerhalb des Liposoms führen zu höheren Einkapselungseffizienzen als osmotische Unterschiede.

Kapitel 7

Schlussfolgerungen und Ausblick für zukünftige Arbeiten

7.1 Schlussfolgerungen

(1) *Verständnis des Adsorptionsverhaltens von Phospholipiden an Fluorocarbon-Grenzflächen*

Da Phospholipide grenzflächenaktive Substanzen sind, ist die tensiometrische Untersuchung des Stoffsystems relevant. Im Fokus stand die Auswahl einer geeigneten Analysemethode für die Grenzflächenspannung zwischen Fluorocarbon und Phospholipid-Suspension. Das Fluorocarbon PFPH lässt sich mit einer doppelt so hohen Dichte wie Wasser aber einem fast identischen Brechungsindex nicht mit allen herkömmlichen tensiometrischen Methoden analysieren. Ungeeignet ist beispielsweise die Profil-Analyse Tensiometrie, welche die Grenzfläche durch Bilderkennung identifiziert und vermisst. Stattdessen fand der invasive Du Noüy-Ring Anwendung. Der physische Kontakt des Ringes mit der Grenzfläche stört kurzzeitig die Phasengrenze, allerdings besteht kein langfristiger oder irreversibler Einfluss auf die Phospholipid-Schicht. Als nicht-invasive Methode wurde das Spinning Drop Tensiometer herangezogen. Der Vergleich beider Methoden zeigte eine ähnliche Messgenauigkeit der Grenzflächenspannung. Der Du Noüy-Ring ist jedoch für das vorliegende Stoffsystem die schnellere und praktikablere Methode.

Mithilfe des Du Noüy-Rings wurde die Grenzfläche zwischen PFPH und wässrigen Suspensionen mit Phospholipiden unterschiedlicher Kettenlänge untersucht. Es ist festzustellen, dass mit kürzerer Kettenlänge sowohl die Gleichgewichtsgrenzflächenspannung schneller erreicht als auch eine niedrigere Grenzflächenspannung im Bereich der CMC zu verzeichnen ist. Dies ist auf die

sterische Hinderung der Kettenlängen zurückzuführen, welche sich mit zunehmender Länge erhöht. Die Messungen mittels Du Noüy-Ring ermöglichten eine vollständige Überwachung des Anlagerungsprozesses der Phospholipide. Andere getestete Methoden erlauben diese Überwachung nicht.

Auch die Temperatur beeinflusst die Adsorption der Phospholipide an die Grenzfläche. Die sterische Hinderung ist bei den Phospholipiden mit längerer Fettsäurekette weniger ausgeprägt, wodurch der Adsorptionsprozess schneller vonstattengeht.

Die logarithmische Auftragung der Grenzflächenspannung über die Phospholipidkonzentration erlaubt die Berechnung der Fläche pro Molekül nach Gibbs. Die konzentrationsabhängige Berechnung stößt bei dem vorliegenden System schnell an Grenzen, da im mittleren Konzentrationsbereich zwei Phasen der Phospholipide starke Schwankungen der Grenzflächenspannung verursachen. Der aus einer flüssigen und festen Phase bestehende Ko-Existenzbereich erschwert somit die Bestimmung der Fläche pro Molekül. Eine geeignete Berechnungsmethode für das vorliegende Fluorocarbon-System wurde in der linearen Interpolation der Grenzflächenspannung als Funktion der Zeit gefunden. Die daraus resultierenden Werte stimmen mit den Flächen pro Molekül aus der Literatur überein.

Zusammenfassend ist eine Charakterisierung des Stoffsystems PFPH und verschiedener Phospholipid-Suspensionen gelungen. Die zur Stabilisierung von Nanoemulsionströpfchen benötigten Mengen an Phospholipiden ließen sich mit den tensiometrischen Untersuchungen quantifizieren.

(2) Stabilitätsanalyse von W/FC Nanoemulsionen für die spätere Liposomenherstellung

Während O/W oder auch FC/W Nanoemulsionen bereits ausführlich in der Literatur beschrieben sind, ist die Analyse des umgekehrten Falles herausfordernder. Die Untersuchung der W/FC Nanoemulsionen ist daher ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit. Das System aus PFPH und Phospholipiden zeigte Schwierigkeiten in der Analyse der Tropfengröße mit herkömmlichen Methoden. Die Bestimmung der Tropfengröße mittels DLS wies insbesondere direkt nach dem Emulgiervorgang Messartefakte durch austretende Gasblasen auf, wodurch der üblicherweise betrachtete z-Average als Vergleichswert verfälscht wird. Aussagekräftiger ist der anzahlbasierte Mittelwert. Anhand dessen ließ sich belegen, dass Gasblasen nur kurzfristig zu beobachten sind. Aufgrund der Unlöslichkeit der Phospholipide in der wässrigen Phase findet eine entropische

Stabilisierung statt, sodass eine Tropfengröße von etwa 200 nm über einen Zeitraum von mehr als 4 Wochen stabil war. Dabei ist die Art des Stabilisators nicht maßgebend – Phospholipide mit kürzerer oder längerer Fettsäurekette sind gleichermaßen geeignet. Die Konzentration ist hingegen von entscheidender Bedeutung. Je höher die Konzentration ist, desto kleiner sind die Tropfengröße und stabiler die Emulsion.

Die Langzeitstabilität konnte in Untersuchungen mit weiteren Fluorocarbonen nicht bestätigt werden. Jedoch zeigte eine geringere Dichte und Viskosität der hydrophoben Phase eine Verbesserung in Bezug auf die Gasblasen nach der Emulgierung. Insgesamt wiesen die hergestellten W/FC Nanoemulsionen die gewünschte Tropfengröße auf, sodass diese für den nachgeschalteten Transferschritt als geeignet einzustufen sind.

(3) Entwicklung des Herstellungsprozesses von Liposomen aus W/FC Nanoemulsionen sowie deren Einkapselungseffizienz

Die Tropfengröße und die Stabilität der W/FC Nanoemulsionen wiesen die gewünschten Kriterien für die Herstellung der Liposomen mittels Zentrifugation auf. Im Gegensatz zu den üblichen Herstellungsmethoden kann mit der Zentrifugationsmethode auf die Nutzung eines organischen Lösungsmittels verzichtet werden. Mit der Zentrifugation gelang die Herstellung von Liposomen mit einem mittleren Durchmesser von etwa 60 nm. Der Größennachweis der Liposomen kann sowohl mit der dynamischen Lichtstreuung als auch mit der Röntgenkleinwinkelstreuung erfolgen. Ein dünner Ölfilm innerhalb der Lipiddoppelschicht, der während des Phasentransfers entsteht, führt zu einem hohen Elektronendichteunterschied und ermöglicht die Größenbestimmung der Liposomen mit der SAXS. Für stabile Liposomen < 200 nm ist eine Mindestkonzentration an Phospholipiden von 150 mM notwendig. Unterschiedliche Kettenlängen beeinflussen lediglich die Dicke der Doppelschicht aber nicht die Liposomengröße. Eine Langzeitstabilität konnte über mehrere Wochen beobachtet werden. Die bei der Emulsionsherstellung eingetragenen Luftblasen stören den Zentrifugationsschritt nicht, da die Luftblasen zusammen mit den Mizellen als Folge der Zentrifugalbeschleunigung aufrahmen.

Die Einkapselungseffizienz der hergestellten Liposomen wurde mit drei verschiedenen Modellwirkstoffe überprüft – Fluoreszein-Natrium, BSA und FITC-D. Die letzteren beiden sind als Makromoleküle besonders interessant, da die Einkapselungseffizienzen für diese Molekülspezies nach

wie vor niedrig sind. Für die Quantifizierung der Einkapselungseffizienz fand die UV-Vis Spektroskopie Anwendung, welche nicht nur die Analyse der Fluoreszenz-Farbstoffe ermöglicht, sondern auch eine Unterscheidung der einzelnen Stoffkomponenten.

Die Einkapselungseffizienz von Fluoreszein-Natrium in DPPC-Liposomen kann einen Wert von 99% in ddH₂O als wässriges Medium erreichen. Unter der Verwendung von Phosphatpuffer sinkt diese um 14% auf 85%, was eine Wechselwirkung der Ionen des Phosphatpuffers mit den Phospholipiden indiziert. Der Vergleich mit weiteren Fluorocarbonen zeigt, dass eine niedrigere Dichte zu einer geringeren Einkapselungseffizienz führt. Von allen untersuchten Fluorocarbonen stellt PFPH die beste hydrophobe Phase dar.

Eine höhere Konzentration an Phospholipiden von 300 mM führt zu einer verbesserten Einkapselungseffizienz, während die Beimischung von Cholesterin die Einkapselungseffizienz verschlechtert. Das höhere Biegemodul der Doppelschicht verlangsamt den Schließmechanismus der Phospholipidmembran, wodurch mehr Wirkstoff in der oberen wässrigen Phase verloren geht.

Proteine wie BSA weisen eine größere Oberflächenaktivität als lösliche Komponenten auf, sodass mit der diffusionslimitierenden Filmmethode eine geringe Einkapselung erzielt wird. Der hier angewandte Zentrifugationsprozess ermöglicht eine nahezu vollständige Einkapselung für BSA (89%) und Dextran (98%). Verschiedene Salzkonzentrationen innerhalb und außerhalb des Liposoms dienen der Imitation von osmotischen Bedingungen im menschlichen Blut. Hier ist eine bessere Einkapselungseffizienz mit einem erhöhten Influx festzustellen, während ein Efflux zu einer geringeren Einkapselung der Modellwirkstoffe führt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch Zentrifugation von Wasser-in-Fluorocarbon Nanoemulsionen die Herstellung von Liposomen möglich ist. Der Prozess ist geeignet, Makromoleküle und sensitive Wirkstoffe effizient und nahezu vollständig einzukapseln.

7.2 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse liefern ein vertiefendes Verständnis für das Fluorocarbon-Phospholipid-System und den Herstellungsprozess der Liposomen. Obwohl eine nahezu vollständige

Einkapselungseffizienz zu erreichen ist, bedarf es für den Einsatz realer Wirkstoffe erneut verschiedener Einzelanalysen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass PFPH aufgrund der inerten Eigenschaften auch hier für die Emulsionsherstellung und den Transfer geeignet ist. Die Wechselwirkungen zwischen den eingesetzten Phospholipiden und den Wirkstoffen kann die Einkapselung jedoch beeinflussen. Da die molekularen Wechselwirkungen nicht im Fokus dieser Arbeit standen, wären zukünftige pharmazeutische Analysen sicherlich aufschlussreich, um Agglomerationen oder Änderungen in der Struktur der Wirkstoffe bewerten zu können.

Ein weiterer Aspekt mit Blick auf die pharmazeutische Anwendung ist der Einsatz von asymmetrischen Liposomen. Natürliche Membranen bestehen nicht aus einem einzelnen Phospholipid, sondern aus einem Gemisch unterschiedlicher Phospholipide, Cholesterin und Membranproteinen. Dabei variiert auch die Zusammensetzung der inneren und äußeren Schicht der Doppelmembran. Die Mischung eines einzelnen Phospholipids und Cholesterin wurde in dieser Arbeit untersucht und machte die Schwierigkeiten sichtbar, die mit erhöhter Elastizität der Membran auftreten. Eine Zugabe von Cholesterin ist zwar möglich, geht aber mit einer geringeren Einkapselungseffizienz einher. Da Cholesterin ein Bestandteil natürlicher Membranen ist, sind Effizienz und Nutzen in Bezug auf die Cholesterinmenge für die Anwendung abzuwägen. Um möglichst nah an den Aufbau natürlicher Membranen heranzukommen, ist eine Adaption des Prozesses für die Herstellung asymmetrischer Liposomen unabdingbar. Denkbar ist hier ein gegenläufiger Zentrifugationsprozess, bei dem Tröpfchen einer W/FC Emulsion mit einem spezifischen Phospholipid-Gemisch und Tröpfchen einer FC/W Emulsion mit einem anderen Phospholipid-Gemisch stabilisiert sind. Dieser Ansatz würde eine Variation der Phospholipide auf der Innen- und Außenseite der Membran ermöglichen. Durch Überschichten beider Emulsionen und anschließender Zentrifugation rahmen die leichten wässrigen Tropfen der W/FC Emulsion auf, während die schweren Öltropfen aus der FC/W Emulsion inklusive der Phospholipide in Richtung Phasengrenze sedimentieren. Die ursprünglich an den Öltropfen gebundenen Phospholipide stehen an der Grenzfläche zur Verfügung und dienen zur Bildung der asymmetrischen Lipidschicht um den aufsteigenden wässrigen Tropfen. Für diesen Prozess wäre nicht nur die Verfahrenstechnik entscheidend – wie schnell sedimentiert der Öltropfen im Vergleich zum Aufrahmen des Wassertropfens? – sondern auch die Eigenschaften der FC/W Nanoemulsion. Die Stabilität kann sich grundlegend von den W/FC Emulsionen unterscheiden. Dient die FC/W Emulsion dann noch

dazu, um zusätzlich zum asymmetrischen Aufbau der Doppelschicht Membranproteine einzubauen, ist eine Stabilitätsanalyse sicherlich erforderlich. Durch den Einbau von weiteren Proteinen oder auch Antikörpern wäre in der Anwendung eventuell ein Austausch des inneren und äußeren Puffers durch zum Beispiel Ionenkanäle möglich. Der Einbau von Antikörpern würde den spezifischen Transport des Liposoms sowie die Freisetzung an der gewünschten Tumorzelle als Folge des Rezeptorprinzips ermöglichen.

Für die industrielle Anwendung ist letztlich vor allem die Skalierbarkeit relevant. Die bisherigen Versuche beschränkten sich auf ein maximales Probenvolumen von 1,5 mL in Mikroreaktionsgefäßen. In diesem Maßstab ist vor allem die Herstellung der Nanoemulsion mittels Ultraschallsonotrode unkompliziert. Die Emulgierung von größeren Volumina ist mit der Sonotrode jedoch ungenau, da der Energieeintrag punktuell erfolgt. Für einen erfolgreichen Prozess im Labormaßstab ist daher ein Wechsel des Emulgiersystems notwendig. Denkbar wäre hier die Nutzung eines Hochdruckhomogenisators. Diverse Zentrifugenvarianten in unterschiedlichen Maßstäben sind industriell vielfach vorhanden, sodass eine Übertragung anhand von Skalierungsparametern möglich ist. Besonders effizient wäre ein kontinuierlicher Prozess, in dem fortlaufend die Nanoemulsionen zentrifugiert und die Liposomen entnommen werden.

Anhang

A1. Chemikalien und technische Geräte

Die folgenden Tabellen listen die verwendeten Chemikalien, technischen Geräte und das Verbrauchsmaterial auf.

Tabelle A 1.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien inklusive des Herstellers.

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)	Lipoid	Ludwigshafen, DE
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)	Lipoid	Ludwigshafen, DE
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-glycerol (DPPG)	Lipoid	Ludwigshafen, DE
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC)	Lipoid	Ludwigshafen, DE
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Ammoniummolybdat-tetrahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Cholesterin	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
E80	Lipoid	Ludwigshafen, DE
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Fluoreszein-Natrium	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE

Fluorezein-Isothiocyanat Dextran	Sigma Aldrich Chemie GmbH	St. Louis, USA
Natrium-Di-hydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Perchlorsäure (70%)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Perfluoroheptan (C ₇ F ₁₆)	F2 Chemicals Ltd.	Preston, UK
Perfluoro-m-dimethylcyclohexan (C ₈ F ₁₆)	F2 Chemicals Ltd.	Preston, UK
Perfluoromethyldecalin (C ₁₁ F ₂₀)	F2 Chemicals Ltd.	Preston, UK
Perfluoroperhydrophenanthren (C ₁₄ F ₂₄)	F2 Chemicals Ltd.	Preston, UK
Rinderserumalbumin, 98%	VWR Chemicals	Radnor, USA
Stickstoff, 200 bar	Linde AG	Dublin, Irland

Tabelle A 1.2: Auflistung der verwendeten Geräte inklusive des Herstellers.

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Blockheizler	Stuart Equipment	Staffordshire, UK
Dispenser Dispensette S	Brand GmbH + Co. KG	Wertheim, DE
Du Noüy-Ring Tensiometer DCAT 11EC	Dataphysics	Filderstadt, DE
Feinwaage Secura 224-1S	Sartorius	Göttingen, DE
Gefrierschrank	Privileg by Bauknecht	Stuttgart, DE
Heizthermomixer MHR 13	HLC by DITABIS AG	Pforzheim, DE
Lipex™ Extruder	Transferra Nanoscience	Burnbary, CA
Origin 2021	Origin Lab	Northampton, USA
pH Sonde WRW 3110	Xylem Water Solutions	White Plains, USA
Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Reinstwasseranlage Arium Pro	Sartorius	Göttingen, DE
Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments	Schwabach, DE
SAXS Xeuss 2.0	Xenocs	Sassenage, F
Sonotrode Sonifier 450	Branson Ultrasonics	Brookfield, CT, USA

Spinning Drop Video Tensiometer SVT20	Dataphysics	Filderstadt, DE
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, DE
UV-Vis Spektrophotometer UV-1900	Shimadzu	Kyoto, JP
Vortex 3	IKA Werke GmbH + Co. KG	Staufen im Breisgau, DE
Wasserbad WNB	Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, DE
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg, DE
Zetasizer Nano ZSP	Malvern Instruments	Worcestershire, UK

Tabelle A 1.3: Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials inklusive des Herstellers.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Firmensitz
Einwegküvetten Rotalibo Halb- mikro	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Mikroreaktionsgefäß 2 mL	Eppendorf	Hamburg, DE
Nuclepore Treck Etch Membranen	Whatman, GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg, DE
Vivaspin 500 und 2	Sartorius	Göttingen, DE
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 mL	Falcon [®] , Corning Incorporated	Tewksbury, USA

A2. Informationen zu den Stoffeigenschaften

Die Eigenschaften der hauptsächlich verwendeten Stoffe, wie die Phospholipide sowie die hydrophilen und hydrophoben Phasen, sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle A 2.1: Molgewicht und Übergangstemperaturen der verwendeten Phospholipide sowie Cholesterin.

Phospholipid	Molgewicht / g mol ⁻¹	Übergangstemperatur / °C
DMPC	677,933	23,5
DPPC	734,039	41,4
DSPC	790,145	55
DPPG-Na	744,95	41
E80	760	Raumtemperatur
Cholesterin	386,76	-

Tabelle A 2.2: Stoffeigenschaften der verwendeter Chemikalien zur Herstellung von Stammlösungen und Nanoemulsionen.

	Molgewicht / g mol ⁻¹	Dichte [20°C] / g cm ⁻³	Viskosität [20°C] / mPa s	Brechungsindex
ddH ₂ O	18,015	0,998	1,0087	1,333
Fluorescein Isothiocyanat	70 000	-	-	1,333
Dextran				
Fluorescein-Natrium	376,28	0,998	1,0	1,333
Perfluoro-1,3-dimethylcyclohexan	400,062	1,83	1,919	1,2895
Perfluoroheptan	388,051	1,72	0,938	1,26
Perfluoromethyldecalin	512,089	1,92	6,41	1,3195
PFPH	624	2,03	28,4	1,335
Phosphatpuffer	-	0,998	1,0087	1,330
Phospholipidstammlösung (in Phosphatpuffer)	-	1,00	1,0087	1,396

A3. Berechnung der benötigten Phospholipid-Konzentration zur Stabilisierung der Nanoemulsionen

Um die Nanoemulsionströpfchen stabilisieren zu können, ist eine bestimmte Menge an Phospholipiden notwendig. Diese ist abhängig von der Größe der Tröpfchen sowie der Fläche pro Molekül, welche aus den Tensiometrie-Versuchen hervorgeht. Als Annahmen gelten, dass die Tropfen der Nanoemulsion eine Größe von 200 nm aufweisen und kugelförmig vorliegen. Als Anhaltspunkt für die Fläche pro Phospholipid-Molekül sind sowohl die eigenen Tensiometrie-Daten als auch Literaturdaten heranzuziehen, um eine möglichst genaue Abschätzung treffen zu können. Die Berechnung ist am Beispiel des Phospholipids DPPC durchgeführt. Unterschiedliche Flächen pro DPPC-Molekül aus Literatur und eigenen Daten sind in Tabelle A 3.1 aufgeführt:

Tabelle A 3.1: Fläche pro DPPC-Molekül A_{min} aus verschiedenen Literaturquellen sowie eigenen Daten, berechnet über die Gibbsche Adsorptionsisotherme (γ vs. c_0 Diagramm) und bei einer bestimmten Konzentration extrapoliert gegen unendlich ($t^{1/2}$ -Diagramm).

Quelle	Temperatur	$A_{min} / \text{\AA}^2$
Li et al. [68]	20°C	61
Toimil et al. [84]	20°C	55,3
Hildebrandt et al. [69]	20°C	40
γ vs. c_0 Diagramm	20°C	20,08
γ vs. c_0 Diagramm	36°C	5,3
γ vs. c_0 Diagramm	48°C	4,7
$t^{1/2}$ -Diagramm	36°C	50,6
$t^{1/2}$ -Diagramm	48°C	46,7

Die Tensiometrie-Daten beziehen sich auf eine Monoschicht und die Messung fand an einer geraden Oberfläche statt. Für einen Tropfen im Nanometerbereich ist davon auszugehen, dass weniger Moleküle an der gekrümmten Oberfläche notwendig sind als im Vergleich zu einer geraden Fläche (vgl. auch Risselada et al. [148]). Aufgrund dessen fallen Werte unterhalb von 50 \AA^2 für die Berechnung der benötigten Phospholipidkonzentration raus. Im Mittel ergibt sich ein Wert von 55,6 \AA^2 pro DPPC-Molekül, welcher dem Berechnungsbeispiel zugrunde liegt.

Weitere Parameter, welche für die Berechnung nötig sind, sind in Tabelle A 3.2 aufgelistet:

Tabelle A 3.2: Parameter für die Berechnung der benötigten Phospholipidkonzentration in der Nanoemulsion.

Parameter	Wert	Einheit
Molekulargewicht von DPPC M	734,039	g mol^{-1}
Grenzflächenkonzentration von DPPC Γ	$2,99 \cdot 10^{-6}$	mol m^2
Gesamtvolumen Emulsion V_{ges}	$1,0 \cdot 10^{-6}$	m^3
Dispersphasenanteil C	1	vol-%
Volumen disp. Phase V_{disp}	$1,0 \cdot 10^{-8}$	m^3
Tropfendurchmesser d	$2,0 \cdot 10^{-7}$	m

Aus dem Volumen eines Tropfens V mit

$$V = \frac{1}{6} \pi d^3 = 4,19 \cdot 10^{-21} [\text{m}^3] \quad (\text{A 3.1})$$

ergibt sich unter Berücksichtigung des Dispersphasenanteils C eine Anzahl an Tropfen n

$$n = \frac{V_{disp}}{V} = 2,39 \cdot 10^{12} [-] . \quad (\text{A 3.2})$$

Über die Oberfläche O des Tropfens

$$O = \pi d^2 = 1,26 \cdot 10^{-13} [\text{m}^2] \quad (\text{A 3.3})$$

und der damit einhergehenden Oberfläche des Dispersphasenanteils O_{disp}

$$O_{disp} = O \cdot n = 0,30 [\text{m}^2] , \quad (\text{A 3.4})$$

ergibt sich eine Masse an DPPC für die Stabilisierung der Tropfen in der Emulsion m_{Em}

$$m_{Em} = M \cdot \Gamma \cdot O \cdot 1000 = 0,66 [\text{mg}] . \quad (\text{A 3.5})$$

Dies entspricht einer Molarität von 89,7 mM, welche mindestens für die Stabilisierung von 200 nm großen Tropfen notwendig wär. Für den anschließenden Transfer sind die Phospholipide im Überschuss hinzuzugeben, sodass eine Menge von 150 mM als Standardmenge gewählt wurde.

A4. Phosphat-Assay nach Fiske [50]

- Für die Bestimmung des anorganischen Phosphats ist zuerst eine 0,5 mM Standard-Phosphatlösung (NaH_2PO_4) herzustellen, die der Kalibrierung dient. In Doppelbestimmung ist die Lösung mit 0/20/40/60/80/100/120/160 μL in kleine Reagenzgläser (ca. 10 mL Fassungsvermögen) zu pipettieren.
- Für einen späteren Durchführungsschritt kann an dieser Stelle bereits eine 1,2% (w/v) Hexa-Ammoniummolybdatlösung ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$) hergestellt werden.
- Die Probenmenge wird ebenfalls in die Reagenzgläser pipettiert und sollte die Menge von 200 μL nicht überschreiten. Die ungefähre Menge an Phosphat in den Proben sollte zwischen 40 und 60 nmol liegen.
- Die Lösungsmittelmengen in den Reagenzgläsern ist über einen Blockheizer bei 180°C und für etwa 30 min zu verdampfen.
- In jedes Reagenzglas sind 300 μL Perchlorsäure (70%) zu füllen. Glasmurmeln auf den Reagenzgläsern verhindern im weiteren Schritt das Verdampfen der Flüssigkeit.
- Die Proben sind für mindestens 45 min und bei 180°C zu erhitzen.
- Zeitgleich ist das Wasserbad auf 100°C vorzuheizen und eine 5% (w/v) Ascorbinsäure in ddH₂O vorzubereiten.
- Nachdem die Proben ausgekühlt sind, ist 1 mL ddH₂O hinzuzufügen. Anschließend sind von der Ascorbinsäure als auch der Ammoniummolybdat-Lösung jeweils 500 μL zu pipettieren und zu durchmischen.
- Die Reagenzgläser sind für 5 min im heißen Wasserbad zu platzieren.
- Nach erneutem Auskühlen erfolgt die Vermessung der Proben am UV-Vis Spektrometer bei 797 nm mit ddH₂O als Blank-Probe.
- Die Berechnung der Phosphatmenge erfolgt über die Kalibriergerade.

A5. Schrittweise Erhöhung der Grenzflächen- spannung

Die folgende Grafik A 5.1 zeigt, dass eine schrittweise Erhöhung der Konzentration, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, möglich ist und zum gleichen Ergebnis führt, wie die einmalige Zugabe der Endkonzentration.

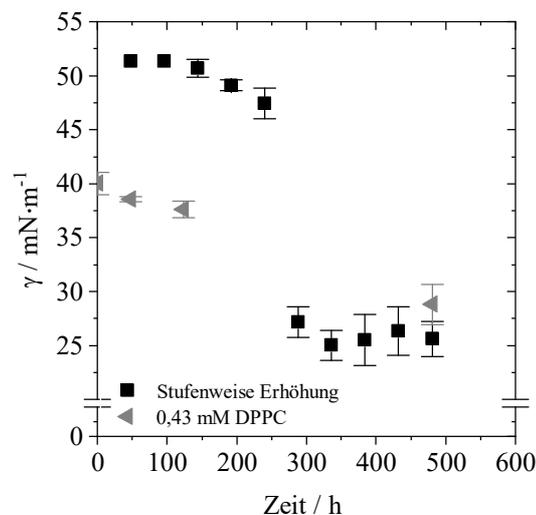


Abbildung A 5.1: Der Adsorptionsverlauf einer schrittweisen (alle 48 h) Erhöhung der DPPC-Konzentration auf 0,43 mM im Vergleich zum Adsorptionsverlauf von 0,43 mM DPPC über die Zeit. Die Gleichgewichtsgrenzflächen-
spannung für verschiedene Konzentrationen ist bei einer schrittweisen Erhöhung nach 48 h erreicht. Eine höhere Anfangskonzentration braucht insgesamt länger, um das Gleichgewicht zu erreichen.

A6. Berechnung zur Aufrahmung der Emulsi- onströpfchen

Um eine vollständige Aufrahmung der Tröpfchen zu gewährleisten, dient die Berechnung nach Stokes-Einstein^{15, 16} der Bestimmung der minimalen G -Zahl. Als Zentrifugationsdauer ist eine Zeit von 30 min festgelegt. Die Drehzahl n berechnet sich aus Gleichung (A 6.1):

$$v = \frac{d^2 \cdot (\rho_{PFPH} - \rho_P)}{18 \cdot \eta} \cdot r_z \cdot (2 \cdot \pi \cdot n)^2, \quad (\text{A 6.1})$$

mit der Auftriebsgeschwindigkeit v , dem Durchmesser der Mizellen d , der Dichte von PFPH ρ_{PFPH} und der Mizelle (analog zur Dichte des Puffers) ρ_P , dem Radius r_z der Zentrifuge und der Drehzahl n . Durch Umstellen und Ersetzen der Geschwindigkeit ergibt sich für die benötigte Drehzahl n bei einer Zeit $t = 30$ min und der Flüssigkeitshöhe h folgende Gleichung (A 6.2):

$$n = \sqrt{\frac{18 \cdot h \cdot \eta}{4 \cdot t \cdot r_z \cdot \pi^2 \cdot d^2 \cdot (\rho_{PFPH} - \rho_P)}}. \quad (\text{A 6.2})$$

Gleichung (A 6.3) erlaubt die Umrechnung der Drehzahl (mit n in $[\text{min}^{-1}]$) in die G -Zahl unter Anwendung der Umrechnungsformel für die Eppendorf-Zentrifuge 5418-R [149]:

$$G = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot n^2 \cdot r_{max}. \quad (\text{A 6.3})$$

Daraus ergibt sich nach Tabelle A 6.1 eine Drehzahl von 3735 g, sodass eine Drehzahl von 4000 g für die Versuche angesetzt wurde.

¹⁵ Sir George Gabriel Stokes (* 13. August 1819; † 1. Februar 1903), irischer Mathematiker und Physiker.

¹⁶ Albert Einstein, siehe auch Fußnote 3.

Tabelle A 6.1: Parameter und Ergebnis der Drehzahlberechnung.

Parameter	800 μL in 2 mL Mikroreaktionsgefäß
Höhe h der W/FC Emulsion im Reaktionsgefäß / m	0,007
Zentrifugationszeit t / s	1800
Radius der Zentrifuge r_z / m	0,077
Erdbeschleunigung g / m s^{-2}	9,81
Mizellendurchmesser d / m	$2 \cdot 10^{-7}$
Dichte PFPH ρ_{PFPH} / kg m^{-3}	2039
Dichte Puffer ρ_P / kg m^{-3}	997
Dyn. Viskosität η_{PFPH} / $\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$ [10°C]	0,0289
Drehzahl n / s^{-1}	124,37
G-Zahl	3735,71

A7. Spektren zum Abschnitt 6.4: Einkapselung

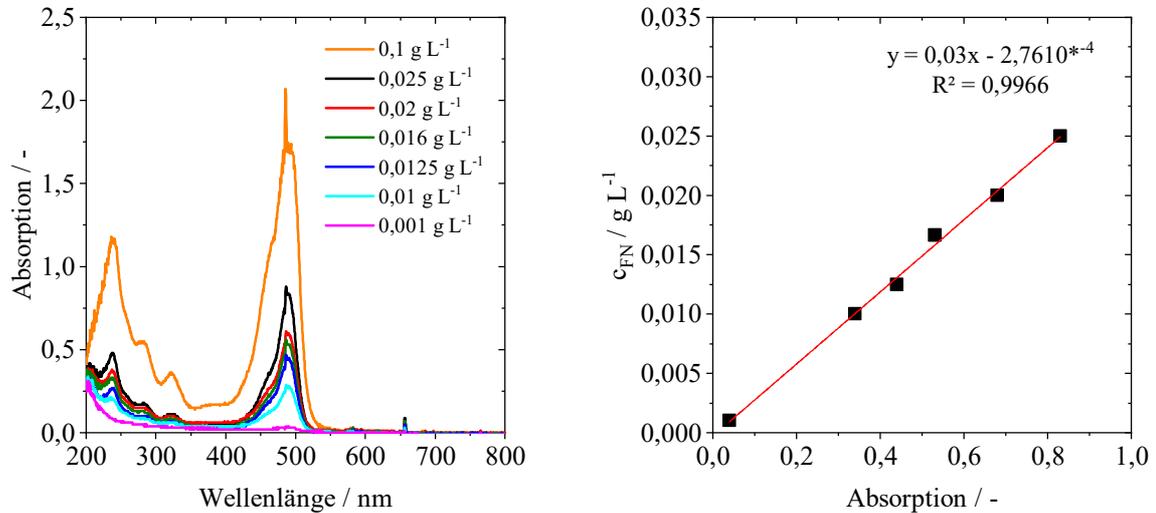


Abbildung A 7.1: Absorptionsspektren von verschiedenen Konzentrationen an Fluoreszein-Natrium in 15 mM Phosphatpuffer, aufgenommen mit der UV-Vis Spektroskopie (links) sowie die daraus resultierende Kalibriergerade zur Berechnung der Konzentration c_{FN} in den Proben (rechts). Die Grafiken sind beispielhaft für die entstandenen Kalibriergeraden zu verschiedenen Versuchen dargestellt.

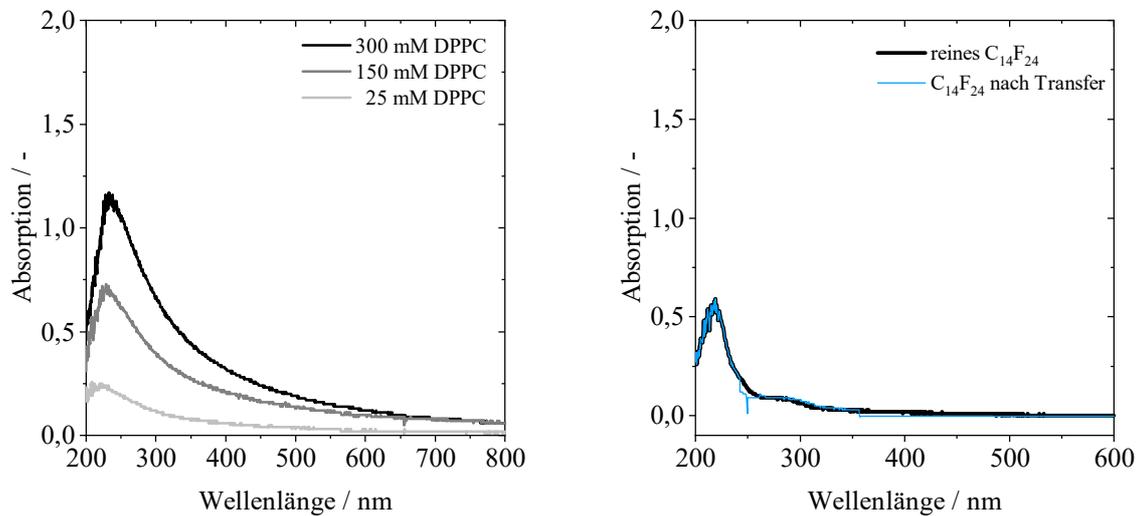


Abbildung A 7.2: Absorptionsspektren von Phospholipid-Stammsuspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen an DPPC (links). Je mehr Phospholipide sich in der Stammsuspension befinden, desto höher der signifikante Peak bei 230 nm. Auf den charakteristischen Peak von Fluoreszein-Natrium bei 491 nm ist entsprechend kein Einfluss zu sehen. Rechts: Absorptionsspektrum des Fluorocarbons Perfluoroperhydrophenanthrene in reinem Zustand und erneut gemessen nach Emulsionsherstellung und Transfer für die Liposomenproduktion. Die Spektren unterscheiden sich nicht, sodass von einem vollständigen Transfer aller beteiligten Komponenten auszugehen ist.

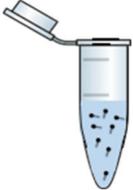
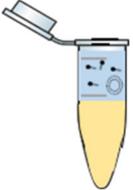
A8. Verlustanalyse der Phospholipide während des Transfers

Im Folgenden findet eine Verlustanalyse für die Phospholipide im gesamten Transferprozess statt. Verluste können sowohl während der Herstellung der Stammsuspension als auch während der Zentrifugation auftreten. Die Bestimmung erfolgte mittels des Phosphat-Assays nach Fiske (vgl. Anhang A4). Exemplarisch erfolgte die Verlustanalyse für das Phospholipid DPPC mit 150 und 300 mM in der Stammsuspension. Die Ergebnisse sind in Tabelle A 8.1 zusammengefasst. Die Schemata ergänzen die verschiedenen Quantifizierungsstellen innerhalb des Probengefäßes.

Es ist festzustellen, dass bereits während des ersten Sonotriervorgangs der Stammsuspension ein Verlust auftritt. Die Stammsuspension enthält daher nicht die initial eingewogene Menge an Phospholipiden, sondern lediglich 70% dessen (Tabelle A 8.1 Spalten (A) und (B)). Nach der Zentrifugation ist ein Großteil der Lipide in der oberen, wässrigen Phase zu finden (Spalte (C)). Lediglich kleinere Mengen verbleiben an der Wand des Reaktionsgefäßes, nachdem die hydrophobe Phase entfernt ist (Spalte (D)). Für die Quantifizierung des Phospholipidverlustes ist in diesem Fall das Reaktionsgefäß mit der gleichen Menge an Perchlorsäure zu waschen wie das vorgelegte Emulsionsvolumen. Spalte (E) stellt die Summe der Phospholipid-Konzentrationen aus (C) und (D) dar. Der Gesamtverlust während des Transfers berechnet sich auf Basis der quantifizierten Phospholipid-Konzentration in der Stammsuspension (Spalte (A)), wobei 1% der Stammsuspension als Dispersphasenanteil am Transfer teilnehmen können. Insgesamt ist ein Verlust von etwa 30% für alle Phospholipide zu beobachten (Spalte (F)), welche vermutlich an der Grenzfläche verbleiben und nicht vollständig zu resuspendieren sind. Gleichzeitig ist aufgrund der geringen Löslichkeit ($< 10^{-8}$ M) der einzelnen Phospholipide in Wasser eine vollständige Akkumulation zu Liposomen zu erwarten [150].

Tabelle A 8.1: Verlustanalyse der Phospholipide. Aufgelistet ist die gemessene Konzentration an Phospholipiden in der Stammsuspension in mM (A). Die Prozentangabe in Spalte (B) berechnet sich aus (A) und der initial eingewogenen Phospholipidmenge. (C) stellt die Konzentration an Phospholipiden gefunden in der gesamten redispersierten wässrigen Phase nach der Zentrifugation dar. (D) sind die Verluste an der Wand des Reaktionsgefäßes nach dem Waschschritt mit Perchlorsäure. (E) stellt die Summe der Mengen (C) und (D) dar. (F) stellt den prozentualen Anteil der gesamten transferierten Phospholipide dar und berechnet sich analog zur WF_{PL} nach Gleichung (6.2).

Phospholipid	(A) mM	(B) %	(C) mM	(D) mM	(E) mM	(F) %
150 mM DPPC	108,72	72,48	0,65	0,17	0,82	75,58
300 mM DPPC	215,58	71,86	1,11	0,33	1,44	66,72


Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
Chol	Cholesterin
CMC	Kritische Mizellkonzentration („critical micelle concentration“)
DCR	Zählrate („derived count rate“)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPG-Na	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho- <i>rac</i> -glycerol-Natrium-salz
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
EE	Einkapselungseffizienz
FC	Fluorocarbon
FC/W	Fluorocarbon-in-Wasser
FITC-D	Fluoreszein-Isothiocyanat Dextran
FN	Fluoreszein-Natrium
GUV	Riesige unilamellare Vesikel („giant unilamellar vesicle“)
LUV	Große unilamellare Vesikel („large unilamellar vesicle“)
MLV	Multilamellare Vesikel
MRT	Magnetresonanztomographie
O/W	Öl-in-Wasser

O/W/O	Öl-in-Wasser-in-Öl
PAT	Tropfenprofilanalyse („profile analysis tensiometer“)
PC	Phosphatidylcholin
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PFPH	Perfluoroperhydrophenanthrene
PL	Phospholipid
RI	Brechungsindex („Refractive Index“)
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung („small angle x-ray scattering“)
SUV	Kleine unilamellare Vesikel („small unilamellar vesicle“)
UV	Ultraviolett
W/FC	Wasser-in-Fluorocarbon
W/O	Wasser-in-Öl
W/O/W	Wasser-in-Öl-in-Wasser
WF	Wiederfindungsrate

Symbolverzeichnis

Lateinische Buchstaben

Symbol	Einheit	Beschreibung
A	[-]	Basislinie der Autokorrelationsfunktion
A_{min}	[Å ²]	minimale Fläche pro Molekül
B	[-]	Amplitude der Autokorrelationsfunktion
C	[-]	Volumenanteil der dispersen Phase
c	[mM]	Konzentration
c_0	[mM]	Phospholipidkonzentration
c_0	[g/L]	ursprüngliche Konzentration des API
c_F	[g/L]	Menge an API im Filtrat
c_F	[g/L]	Konzentration im Filtrat
c_{WF}	[g/L] oder [mM]	Konzentration der Wiederfindungsrate
D	[m ² /s]	Diffusionskoeffizient
d	[cm]	Dicke der Küvette
dA	[m ²]	Änderung der Oberfläche
d_{Anzahl}	[nm]	anzahlgewichteter Durchmesser
$d_{intensität}$	[nm]	intensitätsgewichteter Durchmesser
d_{SAXS}	[nm]	Durchmesser basierend auf SAXS-Messwerten
D_{sf}	[-]	Fraktale Dimension der Oberfläche

D^{SE}	[m ² /s]	translaterale Diffusionskoeffizient nach Stokes-Einstein
dW	[kJ]	Änderung der freien Energie
dW_{rev}	[kJ]	Änderung der reversiblen Arbeit
$d_z\text{-Average}$	[nm]	Durchmesser basierend auf Gesamtmit-telwert
EE_{korr}	[%]	korrigierte Einkapselungseffizienz
E	[kg m ² /s ²]	Gesamtenergie des Systems
EE_{theo}	[%]	theoretische Einkapselungseffizienz
E_{kin}	[kJ]	kinetische Energie
E_{PT}	[kJ]	Phasentransfer-Energie
E_R	[kg m ² /s ²]	Energie durch Rotation
E_{vol}	[kJ]	volumetrische Energie
E_γ	[kg m ² /s ²]	Energie durch Grenzflächenspannung
F	[N]	Kraft
$F1$ und $F2$	[-]	Fluid 1 und 2
g	[m/s ²]	Erdbeschleunigung
$g(\tau)$	[-]	Autokorrelationsfunktion
h	[mm]	Höhe der Emulsion im Reaktionsgefäß
I	[a.u.]	Intensität
$I(q)$	[a.u.]	Intensität als Funktion des Streuvektors
I_0	[a.u.]	Ursprungsintensität
k_b	[kg m ² /s ²]	Boltzmann-Konstante
L	[mm]	Innen- und Außenumfang des Ringes
m_{Em}	[g]	Masse an Phospholipiden in der Emul-sion
Δn	[-]	Unterschied im Brechungsindex
n	[-]	Anzahl
n	[min ⁻¹]	Drehzahl
N_A	[mol ⁻¹]	Avogadro-Konstante
NV	[m ⁻³]	Partikelanzahlkonzentration

O	[m ²]	Oberfläche
O_{disp}	[m ²]	Oberfläche der dispersen Phase
p	[bar]	Druck
q	[nm ⁻¹]	Streuvektor
R	[J/mol K]	ideale Gaskonstante
r_h	[nm]	hydrodynamischer Durchmesser
r_{max}	[mm]	maximaler Radius
r_z	[mm]	Radius der Zentrifuge
\bar{s}_{PL}	[mN/m]	Standardabweichung
\bar{s}_{Ring}	[mN/m]	Standardabweichung der Grenzflächen- spannung, gemessen mit dem Du Noüy- Ring
\bar{s}_{SD}	[mN/m]	Standardabweichung der Grenzflächen- spannung, gemessen mit dem Spinning Drop
T	[K]	Temperatur
t	[s]	Zeit
T_c	[°C]	Übergangstemperatur der Phospholi- pide
t_e	[h]	Equilibriumszeit
V	[m ³]	Volumen
V_{disp}	[m ³]	Volumen der dispersen Phase
V_{ges}	[m ³]	Gesamtvolumen
V_p	[m ³]	Partikelvolumen
WF	[%]	Wiederfindungsrate
x	[-]	Index

Griechische Buchstaben

Symbol	Einheit	Beschreibung
Γ	[mol/m ²]	Gibbsche Adsorptionsisotherme
γ	[mN/m]	Grenzflächenspannung
γ_e	[mN/m]	Gleichgewichtsgrenzflächenspannung
$\gamma_{f_1f_2}$	[mN/m]	Grenzflächenspannung zwischen Fluid 1 und Fluid 2
γ_{min}	[mN/m]	Minimale Grenzflächenspannung
γ_{pf_1}	[mN/m]	Grenzflächenspannung zwischen Partikel und Fluid 1
γ_{pf_2}	[mN/m]	Grenzflächenspannung zwischen Partikel und Fluid 2
$\Delta\rho$	[kg/m ³]	Dichteunterschied
$\Delta\rho_e^2$	[m ⁻³]	Elektronendichtedifferenz
ε	[L/mol cm]	Extinktionskoeffizient
ζ	[mV]	Zeta-Potential
η_0	[mPas]	ursprüngliche Viskosität
η_1	[mPas]	neue Viskosität
η	[mPas]	dynamische Viskosität
η_{kont}	[mPas]	Viskosität der kontinuierlichen Phase
$\cos \theta$	[°]	Kontaktwinkel
θ	[°]	Streuwinkel
λ	[nm]	Wellenlänge
ρ_{PPFH}	[kg/m ³]	Dichte von Phenanthren
ρ_{Wasser}	[kg/m ³]	Dichte von Wasser
ρ_1	[kg/m ³]	Dichte des Öls
ρ_2	[kg/m ³]	Dichte des Wassers
σ	[mN/m]	Grenzflächenenergie
τ	[s]	Zeitintervall
ω	[rad/s]	Winkelgeschwindigkeit

Literaturverzeichnis

- [1] The Global Cancer Observatory, "Cancer Fact Sheets;" Verfügbar unter: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf> (21.04.2021).
- [2] World Health Organization, "Number of cancer deaths and selected populations;" Verfügbar unter: <https://www.who.int/data/data-collection-tools/who-mortality-database> (21.04.2021).
- [3] Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., "Cancer statistics, 2019." *CA: a cancer journal for clinicians* **2019**;69(1): 7–34.
- [4] Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." *Nature Nanotechnology* **2007**;2(12): 751–60.
- [5] Bayyurt, B., Tincer, G., Almacioglu, K., Alpdundar, E., Gursel, M., Gursel, I., "Encapsulation of two different TLR ligands into liposomes confer protective immunity and prevent tumor development." *Journal of Controlled Release* **2017**;247: 134–44.
- [6] van Hoogevest, P., Wendel, A., "The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients." *European Journal of Lipid Science and Technology* **2014**;116(9): 1088–107.
- [7] Szoka, F., Papahadjopoulos, D., "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1978**;75(9): 4194–8.
- [8] Hwang, S.Y., Kim, H.K., Choo, J., Seong, G.H., Hien, T.B.D., Lee, E.K., "Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of enzymes." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**;94: 296–303.
- [9] Xu, X., Costa, A., Burgess, D.J., "Protein encapsulation in unilamellar liposomes: high encapsulation efficiency and a novel technique to assess lipid-protein interaction." *Pharmaceutical research* **2012**;29(7): 1919–31.

-
- [10] Ushikubo, F.Y., Cunha, R.L., "Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions." *Food Hydrocolloids* **2014**;34: 145–53.
- [11] Scartazzini, R., Luisi, P.L., "Organogels from lecithins." *Journal of Physical Chemistry* **1988**;92(3): 829–33.
- [12] 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(2): 572–84.
- [13] Sadtler, V.M., Krafft, M.P., Riess, J.G., "Achieving Stable, Reverse Water-in-Fluorocarbon Emulsions." *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**;35(17): 1976–8.
- [14] Krafft, M.P., Giulieri, F., Fontaine, P., Goldmann, M., "Reversible Stepwise Formation of Mono- and Bilayers of a Fluorocarbon/Hydrocarbon Diblock on Top of a Phospholipid Langmuir Monolayer. A Case of Vertical Phase Separation." *Langmuir* **2001**;17(21): 6577–84.
- [15] Banks, R.E., Smart, B.E., Tatlow, J.C., "Organofluorine chemistry: principles and commercial applications." *Plenum Press, New York*; **1994**.
- [16] Temme, S., Grapentin, C., Quast, C., Jacoby, C., Grandoch, M., Ding, Z., Owenier, C., Mayenfels, F., Fischer, J.W., Schubert, R., Schrader, J., Flögel, U., "Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions." *Circulation* **2015**: 1405–14.
- [17] Zhang, Z., Shen, W., Ling, J., Yan, Y., Hu, J., Cheng, Y., "The fluorination effect of fluoroamphiphiles in cytosolic protein delivery." *Nature communications* **2018**;9(1): 1377.
- [18] Riess, J.G., "Highly fluorinated systems for oxygen transport, diagnosis and drug delivery." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1994**;84(1): 33–48.
- [19] Lauth, G.J., Kowalczyk, J., "Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide." *Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*; **2016**.
- [20] Dörfler, H.-D., "Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie." *Berlin: Springer*; **2002**.
- [21] Lee, L.-H., "Roles of molecular interactions in adhesion, adsorption, contact angle and wettability." *Journal of Adhesion Science and Technology* **1993**;7(6): 583–634.
- [22] Birdie, K.S., "Surface and Colloid Chemistry: Principles and Applications." *Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group*; **2010**.
- [23] Fabry, B., "Tenside: Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen." *Chemie unserer Zeit* **1991**;25(4): 214–22.

-
- [24] van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**;9(2): 112–24.
- [25] Baer, E., Pavanaram, S.K., "N-Methylcephalins: I. Synthesis of distearoyl 1- α -glycerylphosphoryl-(n-methyl) ethanolamine." *Journal of Biological Chemistry* **1961**;236(5): 1269–72.
- [26] Eibl, H., "Synthesis of Glycerolphospholipids." *Chemistry and Physics of Lipids* **1980**;26: 405–29.
- [27] Veld, G.I., Driessen, A.J., Op den Kamp, Jos A.F., Konings, W.N., "Hydrophobic membrane thickness and lipid-protein interactions of the leucine transport system of *Lactococcus lactis*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**;1065(2): 203–12.
- [28] Bibette, J., Calderon, F.L., Poulin, P., "Emulsions: basic principles." *Reports on Progress in Physics* **1999**;62(6): 969–1033.
- [29] Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M., "Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties." *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**;18(41): R635-R666.
- [30] Schubert, H., Armbruster, H., "Prinzipien der Herstellung und Stabilität von Emulsionen." *Chemie Ingenieur Technik* **1989**;61(9): 701–11.
- [31] Leister, N., Karbstein, H.P., "Evaluating the Stability of Double Emulsions—A Review of the Measurement Techniques for the Systematic Investigation of Instability Mechanisms." *Colloids and Interfaces* **2020**;4(1): 8.
- [32] Schuchmann, H.P., Danner, T., "Emulgieren: Mehr als nur Zerkleinern." *Chemie Ingenieur Technik* **2004**;76(4): 364–75.
- [33] Gogate, P.R., Kabadi, A.M., "A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology." *Biochemical Engineering Journal* **2009**;44(1): 60–72.
- [34] Chisti, Y., "Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity." *Trends in Biotechnology* **2003**;21(2): 89–93.
- [35] Eggers, R. (editor), "Industrial High Pressure Applications: Processes, Equipment and Safety." *Weinheim: Wiley-VCH*; **2012**.
- [36] Wooster, T.J., Golding, M., Sanguansri, P., "Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability." *Langmuir* **2008**;24(22): 12758–65.
- [37] Ostwald, W., "Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper." *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1900**;34U(1): 495–503.

-
- [38] Taylor, P., "Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase." *Advances in Colloid and Interface Science* **2003**;106(1): 261–85.
- [39] Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J., "Nano-emulsions." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2005**;10(3): 102–10.
- [40] Vemuri, S., Rhodes, C., "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review." *Pharmaceutica Acta Helveticae* **1995**;70(2): 95–111.
- [41] Döbereiner, H.G., Käs, J., Noppl, D., Sprenger, I., Sackmann, E., "Budding and fission of vesicles." *Biophysical Journal* **1993**;65(4): 1396–403.
- [42] Marquardt, D., Geier, B., Pabst, G., "Asymmetric lipid membranes: Towards more realistic model systems." *Membranes* **2015**;5(2): 180–96.
- [43] Torchilin, V., "Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**;71(3): 431–44.
- [44] Tran, M.A., Watts, R.J., Robertson, G.P., "Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma." *Pigment cell & melanoma research* **2009**;22(4): 388–99.
- [45] Patil, Y.P., Jadhav, S., "Novel methods for liposome preparation." *Chemistry and Physics of Lipids* **2014**;177: 8–18.
- [46] Mozafari, M.R., "Liposomes: an Overview of Manufacturing Techniques." *Cellular & Molecular Biology Letters* **2005**;(10): 711–9.
- [47] Krafft, M., Riess, J., "Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution." *Biochimie* **1998**;80(5-6): 489–514.
- [48] Lopes, S.C.d.A., Santos Giuberti, C.d., Ribeiro, T.G., Santos Ferreira, D.d., Leite, E.A., Oliveira, M.C., "Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs." In: Rangel L (editor). *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches. InTech*; **2013**. 85-124.
- [49] Juliano, P., Torkamani, A.E., Leong, T., Kolb, V., Watkins, P., Ajlouni, S., Singh, T.K., "Lipid oxidation volatiles absent in milk after selected ultrasound processing." *Ultrasonics sonochemistry* **2014**;21(6): 2165–75.
- [50] Fiske, C.H., Subbarow, Y., "The Colorimetric Determination of Phosphorus." *Journal of Biological Chemistry* **1925**;66: 375–400.
- [51] Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Pierre Guiraud, J., Cheftel, J.C., Dumay, E., "Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments." *Journal of Dairy Research* **2006**;73(4): 454–63.

-
- [52] Kleinig, A.R., Middelberg, A.P., "On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation." *Chemical Engineering Science* **1998**;53(5): 891–8.
- [53] Breki, A., Nosonovsky, M., "Einstein's Viscosity Equation for Nanolubricated Friction." *Langmuir* **2018**;34(43): 12968–73.
- [54] Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R., "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences." *Biophysical reviews* **2016**;8(4): 409–27.
- [55] Malvern Instruments, "Zetasizer Nano User Manual;" Verfügbar unter: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20u-ser%20manual.pdf> (27.06.2021).
- [56] Bruce, D.W., O'Hare, D., Walton, R.I. (editors), "Structure from diffraction methods." *Chichester West Sussex: Wiley*; **2014**.
- [57] van der Pol, E., Coumans, F., Varga, Z., Krumrey, M., Nieuwland, R., "Innovation in detection of microparticles and exosomes." *Journal of thrombosis and haemostasis JTH* **2013**;11 Suppl 1: 36–45.
- [58] Meier, M., Ungerer, J., Klinge, M., Nirschl, H., "Formation of porous silica nanoparticles at higher reaction kinetics." *Powder Technology* **2018**;339: 801–8.
- [59] Beaucage, G., "Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering." *Journal of Applied Crystallography* **1995**;28(6): 717–28.
- [60] Beaucage, G., Schaefer, D.W., "Structural studies of complex systems using small-angle scattering: A unified Guinier/power-law approach." *Journal of Non-Crystalline Solids* **1994**;172-174: 797–805.
- [61] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 7th ed." *Stuttgart: Thieme*; **2005**.
- [62] Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A., "Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots." *Lipids* **1970**;5(5): 494–6.
- [63] Ullmann, K., Poggemann, L., Nirschl, H., Lenewit, G., "Adsorption process for phospholipids of different chain lengths at a fluorocarbon/water interface studied by Du Noüy ring and spinning drop." *Colloid and Polymer Science* **2020**;298(4-5): 407–17.
- [64] Lecomte Du Noüy, P., "A new Apparatus for Measuring Surface Tension." *Journal of General Physiology* **1919**: 521–4.

-
- [65] Lunkenheimer, K., Wantke, K.-D., "Determination of the surface tension of surfactant solutions applying the method of Lecomte du Noüy (ring tensiometer)." *Colloid and Polymer Science* **1981**;259(3): 354–66.
- [66] William D. Harkins and Hubert F. Jordan, "A Method for the Determination of Surface and Interfacial Tension from the Maximum Pull on a Ring **1930**;(Vol. 52): 1751-1772.
- [67] Drelich, J., Fang, C., White, C.L., "Measurements of Interfacial Tensions in fluid-fluid Systems." *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* **2002**: 3152–66.
- [68] Li, J., Miller, R., Möhwald, H., "Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces 2. Comparison of isotherms of insoluble and soluble films of phospholipids at different fluid/water interfaces." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**;114: 123–30.
- [69] Hildebrandt, E., Dessy, A., Sommerling, J.-H., Guthausen, G., Nirschl, H., Leneweit, G., "Interactions between Phospholipids and Organic Phases: Insights into Lipoproteins and Nanoemulsions." *Langmuir* **2016**;32(23): 5821–9.
- [70] Hildebrandt, E., Sommerling, J.-H., Guthausen, G., Zick, K., Stürmer, J., Nirschl, H., Leneweit, 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.
- [71] Li, J., Miller, R., Möhwald, H., "Characterization of phospholipid layers at liquid interfaces. 1. Dynamics of adsorption of phospholipids at the chloroform/water interface." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**;114: 113–21.
- [72] Lee, S., Kim, D.H., Needham, D., "Equilibrium and Dynamic Interfacial Tension Measurements at Microscopic Interfaces Using a Micropipet Technique. 2. Dynamics of Phospholipid Monolayer Formation and Equilibrium Tensions at the Water–Air Interface." *Langmuir* **2001**;17(18): 5544–50.
- [73] Goebel, A., Lunkenheimer, K., "Interfacial Tension of the Water/ n -Alkane Interface." *Langmuir* **1997**;13(2): 369–72.
- [74] Kabalnov, A., Weers, J., Arlauskas, R., Tarara, T., "Phospholipids as Emulsion Stabilizers. 1. Interfacial Tensions." *Langmuir* **1995**;11(8): 2966–74.
- [75] Bender, K., "Herstellung von Nanokapseln aus Nanoemulsionen- Bestimmung der Grenzflächenspannung an Wasser/Öl-Phasengrenzen mittels Tensiometrie. Masterarbeit." *Karlsruhe*; **2016**.

-
- [76] Vonnegut, B., "Rotating Bubble Method for the Determination of Surface and Interfacial Tensions." *Review of Scientific Instruments* **1942**;13(1): 6–9.
- [77] Kovach, I., Koetz, J., Friberg, S.E., "Janus emulsions stabilized by phospholipids." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**;441: 66–71.
- [78] Benmekhbi, M., Simon, S., Sjöblom, J., "Dynamic and Rheological Properties of Span 80 at Liquid–Liquid Interfaces." *Journal of Dispersion Science and Technology* **2014**;35(6): 765–76.
- [79] Vargaftik, N.B., Volkov, B.N., Voljak, L.D., "International Tables of the Surface Tension of Water." *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1983**;12(3): 817–20.
- [80] Vrânceanu, M., Winkler, K., Nirschl, H., Leneweit, G., "Surface rheology and phase transitions of monolayers of phospholipid/cholesterol mixtures." *Biophysical Journal* **2008**;94(10): 3924–34.
- [81] Worthmann, L., Nag, K., Davis, P., Keough, K., "Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy." *Biophysical Journal* **1997**;72(6): 2569–80.
- [82] Stottrup, B.L., Keller, S.L., "Phase Behavior of Lipid Monolayers Containing DPPC and Cholesterol Analogs." *Biophysical Journal* **2006**;90(9): 3176–83.
- [83] Israelachvili, J.N., Mitchell, D., "A model for the packing of lipids in bilayer membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1975**;389(1): 13–9.
- [84] Toimil, P., Prieto, G., Miñones Jr, J., Sarmiento, F., "A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers." *Physical chemistry chemical physics PCCP* **2010**;12(40): 13323–32.
- [85] Pedersen, U.R., Peters, G.H., Westh, P., "Molecular packing in 1-hexanol–DMPC bilayers studied by molecular dynamics simulation." *Biophysical Chemistry* **2007**;125(1): 104–11.
- [86] Khajeh, A., Modarress, H., "Effect of cholesterol on behavior of 5-fluorouracil (5-FU) in a DMPC lipid bilayer, a molecular dynamics study." *Biophysical Chemistry* **2014**;187-188: 43–50.
- [87] Chou, T.-H., Chu, I.-M., "Thermodynamic characteristics of DSPC/DSPE-PEG2000 mixed monolayers on the water subphase at different temperatures." *Colloids and Surfaces B: Bio-interfaces* **2003**;27(4): 333–44.

-
- [88] Purdon, A.D., Tinker, D.O., Neumann, A.W., "The Temperature Dependence of Surface Tension and Critical Micelle Concentration of Egg Lysolecithin." *Colloid and Polymer Science* **1980**;1980(258): 1062–9.
- [89] Marsh, D., "Analysis of the chainlength dependence of lipid phase transition temperatures: Main and pretransitions of phosphatidylcholines; main and non-lamellar transitions of phosphatidylethanolamines." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1991**;1062(1): 1–6.
- [90] Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y., "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems." *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**;10(2): 81–98.
- [91] Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., Lamprou, D.A., "Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release." *Drug Delivery and Translational Research* **2015**;5(3): 231–42.
- [92] Shchipunov, Y.A., Kolpakov, A.F., "Phospholipids at the oil/water interface: adsorption and interfacial phenomena in an electric field." *Advances in Colloid and Interface Science* **1991**;35: 31–138.
- [93] Schlossman, M.L., Tikhonov, A.M., "Molecular Ordering and Phase Behavior of Surfactants at Water-Oil Interfaces as Probed by X-Ray Surface Scattering." *Annual Review of Physical Chemistry* **2008**;59(1): 153–77.
- [94] Ward, A.F.H., Tordai, L., "Time - Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time - Effects." *The Journal of Chemical Physics* **1946**;14(7): 453–61.
- [95] Walder, R.B., Honciuc, A., Schwartz, D.K., "Phospholipid diffusion at the oil-water interface." *The journal of physical chemistry. B* **2010**;114(35): 11484–8.
- [96] Ullmann, K., Meier, M., Benner, C., Lenewit, G., Nirschl, H., "Water - in - Fluorocarbon Nanoemulsions Stabilized by Phospholipids and Characterized for Pharmaceutical Applications." *Advanced Materials Interfaces* **2021**;8(1): 2001376.
- [97] Merrill, R.J., "Determining Mechanical Stability of Emulsions. A Rapid Quantitative Method." *Industrial and Engineering Chemistry* **1943**;15(12): 743–6.
- [98] Vold, R.D., Acevedo, M.C., "Comparison of ultracentrifugal stability parameters with long-term shelf stability of emulsions." *Journal of American Oil Chemists's Society* **1977**;54: 84–90.

-
- [99] Becher, P., "Emulsions: Theory and Practice. 2nd ed." *New York: Reinhold Publishing Corp;* **1965**.
- [100] Mühlbach, M., "Nutzung des Zentrifugalkraftfeldes für die Vorhersage der Langzeitstabilität von kosmetischen Emulsionen. Dissertation; **2006**.
- [101] Schambil, F., Paasch, S., Sax, B.M., "Neue Methoden zur Charakterisierung der Stabilität von W/O- und O/W-Emulsionen; Nouvelles méthodes pour caractériser la stabilité des émulsions W/O et O/W; New methods for the characterisation of W/O and O/W emulsions stability." *Seifen Öle Fette Wachse* **1989**;115(15): 515–21.
- [102] Malvern Instruments, "Zeta Potential: An Introduction in 30 Minutes",
- [103] Kumar, N., Mandal, A., "Experimental Investigation of PEG 6000/Tween 40/SiO₂ NPs Stabilized Nanoemulsion Properties: A Versatile Oil Recovery Approach." *Journal of Molecular Liquids* **2020**;319: 114087.
- [104] Quack, J., Reng, A., Skrypzak, W., "Stabilitätsprüfung kosmetischer Emulsionen." *Parfümerie und Kosmetik* **1975**;56(11): 309–23.
- [105] Grapentin, C., Barnert, S., Schubert, R., "Monitoring the Stability of Perfluorocarbon Nanoemulsions by Cryo-TEM Image Analysis and Dynamic Light Scattering." *PloS one* **2015**;10(6): e0130674.
- [106] Kabalnov, A.S., Shchukin, E.D., "Oswald Ripening Theory: Applications to Fluorocarbon Emulsion Stability." *Advances in Colloid and Interface Science* **1992**;38: 69–97.
- [107] Krämer, W., Grapentin, C., Bouvain, P., Temme, S., Flögel, U., Schubert, R., "Rational manufacturing of functionalized, long-term stable perfluorocarbon-nanoemulsions for site-specific ¹⁹F magnetic resonance imaging." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2019**;142: 114–22.
- [108] Lee, H., Choi, C.-H., Abbaspourrad, A., Wesner, C., Caggioni, M., Zhu, T., Nawar, S., Weitz, D.A., "Fluorocarbon Oil Reinforced Triple Emulsion Drops." *Advanced Materials* **2016**;28(38): 8425–30.
- [109] Riess, J.G., "Oxygen Carriers ("Blood Substitutes") Raison d'Être, Chemistry, and Some Physiology: Blut ist ein ganz besonderer Saft." *Chemical Reviews* **2001**;101(9): 2797–920.
- [110] Kumar, N., Mandal, A., "Surfactant Stabilized Oil-in-Water Nanoemulsion: Stability, Interfacial Tension, and Rheology Study for Enhanced Oil Recovery Application." *Energy & Fuels* **2018**;32(6): 6452–66.

-
- [111] Pal, N., Kumar, N., Mandal, A., "Stabilization of Dispersed Oil Droplets in Nanoemulsions by Synergistic Effects of the Gemini Surfactant, PHPA Polymer, and Silica Nanoparticle." *Langmuir* **2019**;35(7): 2655–67.
- [112] Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.-C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M.E., Bibette, J., "How to prepare and stabilize very small nanoemulsions." *Langmuir* **2011**;27(5): 1683–92.
- [113] Ullmann, K., Lenewit, G., Nirschl, H., "How to Achieve High Encapsulation Efficiencies for Macromolecular and Sensitive APIs in Liposomes." *Pharmaceutics* **2021**;13(5): 691.
- [114] Shurtleff, W., Aoyagi, A., "History of Soybeans and Soyfoods, 1100 B.C. to the 1980s: History of Soy Lecithin;" Verfügbar unter: <https://www.soyinfocenter.com/HSS/lecithin1.php/lecithin1.php> (10.11.2020).
- [115] Juliano, R.L., Stamp, D., "The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1975**;63(3): 651–8.
- [116] Barenholz, Y., "Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned." *Journal of Controlled Release* **2012**;160(2): 117–34.
- [117] Allen, T.M., Cullis, P.R., "Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**;65(1): 36–48.
- [118] Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., Kinoshita, K., "Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope." *Biophysical Journal* **1996**;71(6): 3242–50.
- [119] Deamer, D., Bangham, A.D., "Large volume liposomes by an ether vaporization method." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **1976**;443(3): 629–34.
- [120] Jahn, A., Vreeland, W.N., Gaitan, M., Locascio, L.E., "Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing." *Journal of the American Chemical Society* **2004**;126(9): 2674–5.
- [121] Ivanov, I.T., "Rapid method for comparing the cytotoxicity of organic solvents and their ability to destabilize proteins of the erythrocyte membrane." *Die Pharmazie* **2001**;56(10): 808–9.
- [122] Dwivedi, A.M., "Residual solvent analysis in pharmaceuticals." *Drugs* **2002**;4: 220–9.

-
- [123] Olson, F., Hunt, C.A., Szoka, F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D., "Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1979**;557(1): 9–23.
- [124] Brandl, M., Bachmann, D., Drechsler, M., Bauer, K.H., "Liposome Preparation by a New High Pressure Homogenizer Gaulin Micron Lab 40." *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1990**;16(14): 2167–91.
- [125] Cornell, B.A., Middlehurst, J., Separovic, F., "Small Unilamellar Phospholipid Vesicles and the Theories of Membrane Formation." *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**;81: 163–78.
- [126] Colletier, J.-P., Chaize, B., Winterhalter, M., Fournier, D., "Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer." *BMC Biotechnology* **2002**;2(1): 9.
- [127] Matos, M.B.C. de, Miranda, B.S., Rizky Nuari, Y., Storm, G., Leneweit, G., Schiffelers, R.M., Kok, R.J., "Liposomes with asymmetric bilayers produced from inverse emulsions for nucleic acid delivery." *Journal of drug targeting* **2019**;27: 1–9.
- [128] Pautot, S., Frisken, B.J., Weitz, D.A., "Engineering asymmetric vesicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**;100(19): 10718–21.
- [129] Träuble, H., Grell, E., "Carriers and specificity in membranes. IV. Model vesicles and membranes. The formation of asymmetrical spherical lecithin vesicles." *Neurosciences Research Program bulletin* **1971**;9(3): 373–80.
- [130] Sommerling, J.-H., Uhlenbruck, N., Leneweit, G., Nirschl, H., "Transfer of colloidal particles between two non-miscible liquid phases." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2017**;535: 257–64.
- [131] Hallett, F.R., Watton, J., Krygsman, P., "Vesicle sizing: Number distributions by dynamic light scattering." *Biophysical Journal* **1991**;59(2): 357–62.
- [132] Matsuzaki, K., Murase, O., Sugishita, K., Yoneyama, S., Akada, K., Ueha, M., Nakamura, A., Kobayashi, S., "Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**;1467(1): 219–26.
- [133] Pannwitz, A., Klein, D.M., Rodríguez-Jiménez, S., Casadevall, C., Song, H., Reisner, E., Hammarström, L., Bonnet, S., "Roadmap towards solar fuel synthesis at the water interface of liposome membranes." *Chemical Society Reviews* **2021**.

-
- [134] Stark, B., Pabst, G., Prassl, R., "Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**;41(3): 546–55.
- [135] Rolinger, L., Rüdts, M., Hubbuch, J., "A multisensor approach for improved protein A load phase monitoring by conductivity-based background subtraction of UV spectra." *Biotechnology and bioengineering* **2021**;118(2): 905–17.
- [136] Rüdts, M., Vormittag, P., Hillebrandt, N., Hubbuch, J., "Process monitoring of virus-like particle reassembly by diafiltration with UV/Vis spectroscopy and light scattering." *Biotechnology and bioengineering* **2019**;116(6): 1366–79.
- [137] Ahmad, I., Arsalan, A., Ali, S.A., Sheraz, M.A., Ahmed, S., Anwar, Z., Munir, I., Shah, M.R., "Formulation and stabilization of riboflavin in liposomal preparations." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**;153: 358–66.
- [138] Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., Lamprou, D.A., "Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release." *Drug Delivery and Translational Research* **2015**;5(3): 231–42.
- [139] Coderch, L., Fonollosa, J., Pera, M. de, Estelrich, J., La Maza, A. de, Parra, J., "Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR: Relationship with percutaneous absorption." *Journal of Controlled Release* **2000**;68(1): 85–95.
- [140] Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., "Mechanics of membrane fusion." *Nature structural & molecular biology* **2008**;15(7): 675–83.
- [141] Pan, J., Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F., "Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation." *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2009**;80(2 Pt 1): 21931.
- [142] Needham, D., Nunn, R.S., "Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol." *Biophysical Journal* **1990**;58: 997–1009.
- [143] Jing, H.Y., Hong, D.H., Kwak, B.D., Choi, D.J., Shin, K., Yu, C.-J., Kim, J.W., Noh, D.Y., Seo, Y.S., "X-ray Reflectivity Study on the Structure and Phase Stability of Mixed Phospholipid Multilayers †." *Langmuir* **2009**;25(7): 4198–202.
- [144] Faizi, H.A., Frey, S.L., Steinkühler, J., Dimova, R., Vlahovska, P.M., "Bending rigidity of charged lipid bilayer membranes." *Soft matter* **2019**;15(29): 6006–13.
- [145] Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J., Singh, H., "Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion." *Food Chemistry* **2015**;175: 16–24.

-
- [146] Le, C.T.M., Hourri, A., Balage, N., Smith, B.J., Mechler, A., "Interaction of Small Ionic Species With Phospholipid Membranes: The Role of Metal Coordination." *Frontiers in Materials* **2019**;5: 80.
- [147] Kralchevsky, P.A., Nagayama, K., "Capillary interactions between particles bound to interfaces, liquid films and biomembranes." *Advances in Colloid and Interface Science* **2000**;85(2-3): 145–92.
- [148] Risselada, H.J., Marrink, S.J., "Curvature effects on lipid packing and dynamics in liposomes revealed by coarse grained molecular dynamics simulations." *Physical chemistry Chemical Physics* **2009**;11(12): 2056–67.
- [149] Eppendorf AG, "Bedienungsanleitung Centrifuge 5418 R;" Verfügbar unter: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/de/173997/Eppendorf_Centrifugation_Operating-manual_Centrifuge-5418-R.pdf (08.05.2021).
- [150] Buboltz, J.T., Feigenson, G.W., "Phospholipid Solubility Determined by Equilibrium Distribution between Surface and Bulk Phases." *Langmuir* **2005**;21(14): 6296–301.