

# Metallchalkogenide in Vesikeln

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen-Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Theodor Alpermann  
geboren am 06.06.1980 in Frankfurt/Oder

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Weigand, FSU Jena
2. Prof. Dr. Alfred Fahr, FSU Jena
3. Ph.D. Pierre-Alain Monnard, University of Southern Denmark

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14. Oktober 2011

Was wir wissen, ist ein Tropfen;  
was wir nicht wissen, ist ein Ozean.  
(Sir Isaac Newton)



# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>XIII</b> |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Vesikel - Modelle für biologische Kompartimente . . . . .                        | 1           |
| 1.1.1 Eigenschaften und Anwendungen von Vesikeln . . . . .                           | 1           |
| 1.1.2 Liposomen . . . . .  | 4           |
| 1.1.3 Polymersomen . . . . .   | 4           |
| 1.1.4 Vesikel als Zellmodelle . . . . .  | 5           |
| 1.1.5 Vesikel mit Metallchalkogenid-Nanopartikeln . . . . .                          | 6           |
| 1.2 Hypothesen zur Chemischen Evolution und der Entwicklung ersten Lebens            | 6           |
| 1.2.1 „Ursuppen“-Hypothese . . . . .   | 7           |
| 1.2.2 RNA-Welt-Hypothese . . . . .   | 8           |
| 1.2.3 Chemoautotropher Ursprung des Lebens . . . . .                                 | 8           |
| 1.3 Zielstellungen . . . . .   | 12          |
| <b>2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)</b>                                | <b>14</b>   |
| 2.1 Vorbemerkungen . . . . .   | 14          |
| 2.2 Einschluss von Fe <sup>2+</sup> -Ionen in Liposomen . . . . .                    | 15          |
| 2.2.1 Vorüberlegungen . . . . .  | 15          |
| 2.2.2 Untersuchungen zur Stabilisierung von Fe <sup>2+</sup> -Ionen . . . . .        | 16          |
| 2.2.3 Experimente zur Herstellung Fe <sup>2+</sup> -haltiger Liposomen . . . . .     | 20          |
| 2.2.4 Quantifizierung von intravesikulärem Eisen . . . . .                           | 21          |
| 2.2.5 Fe <sup>2+</sup> -haltige Liposomen mit Reverse-Phase-Evaporation . . . . .    | 22          |
| 2.2.6 Fe <sup>2+</sup> -haltige Liposomen mit Filmhydratisierung-Extrusion . . . . . | 26          |
| 2.2.7 Diskussion - Einschluss von Fe <sup>2+</sup> -Ionen in Liposomen . . . . .     | 29          |
| 2.3 Fällung von FeS in Liposomen . . . . .   | 31          |
| 2.3.1 Herstellung FeS-haltiger Liposomen . . . . .                                   | 31          |
| 2.3.2 Untersuchungen zur FeS-Fällung in Liposomen . . . . .                          | 32          |
| 2.3.3 Diskussion - FeS in Liposomen . . . . .  | 38          |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.4      | Magnetische Liposomen - Magnetoliposomen . . . . .  | 41        |
| 2.4.1    | Motivation . . . . .  | 41        |
| 2.4.2    | Liposomen mit intravesikulär generiertem Magnetit . . . . .   | 41        |
| 2.4.3    | Liposomen mit Magnetit-Nanopartikeln . . . . .  | 46        |
| 2.4.4    | Diskussion - Zugänge zu Magnetoliposomen . . . . .  | 47        |
| <b>3</b> | <b>Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)</b>   | <b>49</b> |
| 3.1      | Vorbemerkungen . . . . .  | 49        |
| 3.2      | Einschluss von $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Polymersomen . . . . .                                    | 50        |
| 3.2.1    | Charakterisierung von $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen . . . . .                             | 50        |
| 3.2.2    | Diskussion - $\text{Fe}^{2+}$ -haltige Polymersomen . . . . .                                       | 55        |
| 3.3      | Fällung von FeS in Polymersomen . . . . .   | 56        |
| 3.3.1    | Herstellung und Stabilität von FeS-haltigen Polymersomen . . . . .                                  | 56        |
| 3.3.2    | Spektroskopische Verfolgung der Bildung von FeS in Polymersomen                                     | 58        |
| 3.3.3    | Lokalisierung des FeS-Niederschlags in Polymersomen . . . . .                                       | 60        |
| 3.3.4    | Reversibilität der FeS-Fällungsreaktion in Polymersomen . . . . .                                   | 70        |
| 3.3.5    | Diskussion - FeS-haltige Polymersomen . . . . .   | 74        |
| 3.4      | Alternative Zugänge zu metallsulfidhaltigen Polymersomen . . . . .                                  | 79        |
| 3.4.1    | Polymervesikel mit $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und $\text{H}_2\text{S}$ bei niedrigem pH-Wert . . . . . | 79        |
| 3.4.2    | Polymervesikel mit internem Thioacetamid und Metallsalzen . . . . .                                 | 80        |
| 3.4.3    | Polymervesikel mit FeS-Nanopartikeln . . . . .  | 84        |
| 3.5      | Eisenoxidhaltige Polymervesikel . . . . .   | 86        |
| 3.5.1    | Motivation . . . . .  | 86        |
| 3.5.2    | Polymersomen mit intravesikulär gebildeten Magnetit-Nanopartikeln                                   | 87        |
| 3.5.3    | Polymersomen mit stabilisierten Magnetit-Nanopartikeln . . . . .                                    | 88        |
| 3.5.4    | Diskussion - Magnetithaltige Polymersomen . . . . .   | 92        |
| 3.6      | Exkurs: Magnetit-Nanopartikel . . . . .   | 94        |
| 3.6.1    | Motivation . . . . .  | 94        |
| 3.6.2    | Solvothermische Herstellung von Magnetit-Nanopartikeln . . . . .                                    | 94        |
| 3.6.3    | Charakterisierung von Magnetit-Nanopartikeln . . . . .  | 95        |
| 3.6.4    | Diskussion . . . . .  | 97        |
| <b>4</b> | <b>Einschluss weiterer Übergangsmetalle in Polymersomen</b>   | <b>98</b> |
| 4.1      | Motivation . . . . .  | 98        |

|  |   |            |
|--|---|------------|
| 4.2                                      | Nickelhaltige Polymersomen . . . . .  | 99         |
| 4.2.1                                    | Vorbemerkungen . . . . .  | 99         |
| 4.2.2                                    | Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Ni <sup>2+</sup> -Ionen . . | 99         |
| 4.2.3                                    | Herstellung und Charakterisierung Ni <sup>2+</sup> -haltiger Polymersomen .   | 100        |
| 4.2.4                                    | Herstellung und Charakterisierung NiS-haltiger Polymersomen . .               | 102        |
| 4.3                                      | Cadmiumhaltige Polymersomen . . . . .   | 108        |
| 4.3.1                                    | Vorbemerkungen . . . . .  | 108        |
| 4.3.2                                    | Herstellung und Charakterisierung Cd <sup>2+</sup> -haltiger Polymersomen .   | 109        |
| 4.3.3                                    | Herstellung und Charakterisierung CdS-haltiger Polymersomen . .               | 110        |
| 4.3.4                                    | Diskussion - CdS-haltige Polymersomen . . . . .                               | 120        |
| 4.4                                      | Kupferhaltige Polymersomen . . . . .  | 123        |
| 4.4.1                                    | Vorbemerkungen . . . . .  | 123        |
| 4.4.2                                    | Herstellung und Charakterisierung Cu <sup>2+</sup> -haltiger Polymersomen .   | 123        |
| 4.4.3                                    | Herstellung und Charakterisierung CuS-haltiger Polymersomen . .               | 125        |
| 4.5                                      | Diskussion - Übergangsmetallhaltige Polymersomen . . . . .                    | 127        |
| <b>5 Untersuchungen zu Eisensulfiden</b> |   | <b>133</b> |
| 5.1                                      | Motivation . . . . .  | 133        |
| 5.2                                      | Herstellung und Charakterisierung von amorphem FeS . . . . .                  | 134        |
| 5.3                                      | Herstellung und Charakterisierung von Pyrit FeS <sub>2</sub> . . . . .        | 135        |
| 5.4                                      | Untersuchungen zur Reaktion von FeS und H <sub>2</sub> S . . . . .            | 137        |
| 5.4.1                                    | Vorbemerkungen . . . . .  | 137        |
| 5.4.2                                    | Durchführung und Analyse der Reaktionsprodukte . . . . .                      | 137        |
| 5.4.3                                    | Untersuchungen zum H <sub>2</sub> -Einschluss in Pyrit . . . . .              | 138        |
| 5.4.4                                    | Diskussion . . . . .  | 139        |
| 5.5                                      | Untersuchungen zur Reduktion von DMSO durch das FeS/H <sub>2</sub> S-System . | 141        |
| 5.5.1                                    | Vorbemerkungen . . . . .  | 141        |
| 5.5.2                                    | Durchführung und Beobachtungen . . . . .                                      | 141        |
| 5.5.3                                    | Quantitative Bestimmung des DMS-Gehaltes mittels GC . . . . .                 | 142        |
| 5.5.4                                    | Analyse der festen Reaktionsprodukte . . . . .                                | 146        |
| 5.5.5                                    | Diskussion und Ausblick . . . . .   | 148        |
| <b>6 Zusammenfassung</b>                 |   | <b>151</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>7 Experimenteller Teil</b>                         | <b>155</b> |
| 7.1 Chemikalien und Methoden . . . . .                | 155        |
| 7.2 Vorschriften . . . . .                            | 159        |
| <b>Literaturverzeichnis</b>                           | <b>168</b> |
| <b>Anhang</b>   | <b>176</b> |
| Danksagung . . . . .                                  | 176        |
| Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen . . . . . | 178        |
| Publikationen . . . . .                               | 178        |
| Poster . . . . .                                      | 178        |
| Vorträge . . . . .                                    | 179        |
| Selbständigkeitserklärung . . . . .                   | 180        |
| Supplement . . . . .                                  | 181        |

## Abbildungsverzeichnis

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Schematische Darstellung eines Liposoms und eines Polymersoms . . . . .   | 2  |
| 2  | a: Packungsparameter $P$ , b: Struktur von POPC . . . . .   | 3  |
| 3  | Herausbildung von zellulären Strukturen im Eisen-Schwefel-Welt-Szenario   | 10 |
| 4  | Prinzip eines kompartimentierten Pionier-Metabolismus . . . . .   | 12 |
| 5  | Prinzip der Herstellung FeS-haltiger Liposomen . . . . .  | 15 |
| 6  | (a) Absorption von $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Lösungen; (b) graphische Ermittlung der<br>Fe <sup>2+</sup> -PDC-Komplezzusammensetzung . . . . .                  | 18 |
| 7  | Fe <sup>2+</sup> -PDC-Komplezzusammensetzung - Methode der molaren Verhältnisse   | 19 |
| 8  | Effekt von EDTA und H <sub>2</sub> S auf Fe <sup>2+</sup> -PDC-Lösungen . . . . .   | 20 |
| 9  | Struktur von TRITON X 100 . . . . .   | 22 |
| 10 | Prinzip der RVE . . . . .   | 23 |
| 11 | PCS von extrudierten, Fe <sup>2+</sup> -PDC-Komplex-haltigen Liposomen . . . . .  | 27 |
| 12 | Cryo-TEM-Aufnahmen von extrudierten, Fe <sup>2+</sup> -PDC-Komplex-haltigen Li-<br>posomen . . . . .  | 28 |
| 13 | Struktur von Tween 80 . . . . .   | 30 |
| 14 | UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der Reaktion des Fe <sup>2+</sup> -PDC-Komplexes<br>innerhalb und außerhalb von Liposomen mit H <sub>2</sub> S . . . . . | 33 |
| 15 | Cryo-TEM-Aufnahmen von Fe <sup>2+</sup> - und potenziell FeS-haltigen Liposomen   | 35 |
| 16 | Cryo-TEM-Aufnahmen von Fe <sup>2+</sup> -PDC-Komplex-haltigen Liposomen nach<br>Inkubation mit NaHS-Lösung . . . . .  | 36 |
| 17 | Cryo-TEM-Aufnahmen von Fe <sup>2+</sup> -haltigen Liposomen nach Inkubation mit<br>NaHS-Lösung . . . . .  | 37 |
| 18 | Cryo-TEM-Aufnahmen von Fe <sup>2+</sup> -haltigen Liposomen nach externer Zu-<br>gabe einer FeS-Suspension . . . . .  | 37 |
| 19 | Aufnahmen von Fe <sup>2+</sup> -haltigen RVE-Liposomen nach Lagerung an einem<br>Supermagnet . . . . .  | 42 |
| 20 | Cryo-TEM-Aufnahmen von RVE-Liposomen nach Inkubation mit NH <sub>3</sub><br>und Lagerung an Luft . . . . .  | 43 |
| 21 | Cryo-TEM-Aufnahmen von RVE-Liposomen nach Inkubation mit NH <sub>3</sub><br>und Lagerung an Luft . . . . .  | 44 |
| 22 | Cryo-TEM-Aufnahmen von RVE-Liposomen nach Inkubation mit NH <sub>3</sub><br>und Lagerung an Luft . . . . .  | 45 |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 23 | Cryo-TEM-Aufnahmen von FHE-Liposomen nach Inkubation mit $\text{NH}_3$ und Lagerung an Luft . . . . .   | 46 |
| 24 | Struktur von block-1,2-Polybutadien-polyethylenoxid . . . . .   | 49 |
| 25 | Lichtmikroskopische Aufnahme einer mittels GPC aufgereinigten Polymersomendispersion . . . . .  | 51 |
| 26 | Cryo-TEM-Aufnahme von extrudierten, mit TRIS-Puffer beladenen Polymersomen . . . . .  | 51 |
| 27 | $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt in aufgereinigten, $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomendispersionen . . . . .   | 53 |
| 28 | Prinzip der Generierung von FeS in aufgereinigten, $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen . . . . .  | 56 |
| 29 | Verfärbung einer $\text{FeCl}_2$ -haltigen Polymersomendispersion im Verlauf der $\text{H}_2\text{S}$ -Begasung . . . . .   | 57 |
| 30 | UV/Vis-Spektrum von aufgereinigten, $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomen (a) und dessen zeitliche Veränderung nach $\text{H}_2\text{S}$ -Inkubation (b) . . . . .            | 59 |
| 31 | Nachweis der intravesikulären Generierung von FeS in Polymersomen . . . . .   | 61 |
| 32 | Inhibierender Einfluss von EDTA auf die FeS-Fällung aus dem $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex . . . . .   | 62 |
| 33 | Lichtmikroskopische Aufnahmen von aufgereinigten, $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomen, fixiert auf Objektträger, vor und nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . . | 63 |
| 34 | TEM-Aufnahmen von eingetrockneter Probe aufgereinigter, $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltiger Polymersomen nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . .                              | 64 |
| 35 | Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, 500 mM $\text{FeCl}_2$ -haltigen Polymersomen vor und nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . .                                     | 66 |
| 36 | Prinzip der REM und REM-Aufnahme von aufgereinigten, $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomen nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . .                                 | 68 |
| 37 | REM-Aufnahmen von potenziell FeS-haltigen Polymersomen bei unterschiedlichen Anregungsenergien . . . . .  | 69 |
| 38 | REM-EDX-Spektrum von aufgereinigten, $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . .   | 70 |
| 39 | REM-ESMA von FeS- und CdS-haltigen Polymersomen bei unterschiedlicher Lagerung . . . . .  | 72 |
| 40 | Abhängigkeit der $\text{S}^{2-}$ -Konzentration von der $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration bei pH 7,4 . . . . .  | 76 |

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 41 | Cryo-TEM-Aufnahmen von PB-PEO-Polymersomen nach Inkubation mit $\text{NH}_3$ und Lagerung an Luft . . . . .  | 88  |
| 42 | Cryo-TEM-Aufnahmen von (a) Magnetit-Nanopartikeln und (b), (c) Polymersomen mit Magnetit-Nanopartikeln . . . . .   | 90  |
| 43 | Cryo-TEM-Aufnahmen von Polymersomen mit Magnetit-Nanopartikeln .   | 91  |
| 44 | Cryo-TEM-Aufnahmen von Polymersomen mit Membran-deformierenden Magnetit-Nanopartikeln . . . . .  | 91  |
| 45 | Pulver-Röntgendiffraktogramm von Magnetit-Nanopartikeln . . . . .  | 95  |
| 46 | TEM-Aufnahme von Magnetit-Nanopartikeln . . . . .  | 96  |
| 47 | (a): Struktur von $\text{Ni}^{2+}$ -Dimethylglyoxim und (b): $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt in aufgereinigten, $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen . . . . . | 101 |
| 48 | Experimente-Schema zum Nachweis der intravesikulären Bildung von NiS in aufgereinigten, $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen . . . . .                  | 103 |
| 49 | UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der NiS-Fällung in Polymersomen .   | 105 |
| 50 | Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen vor und nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . .                              | 106 |
| 51 | Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen nach Inkubation mit $\text{H}_2\text{S}$ . . . . .                                      | 107 |
| 52 | Wellenlänge der CdS-Absorptionskante in Abhängigkeit von der Partikelgröße . . . . .   | 108 |
| 53 | Mittels FAAS bestimmter $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt in aufgereinigten, $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen . . . . .  | 110 |
| 54 | Graphische Ermittlung der CdS-Absorptionskante aus UV/Vis-Spektrum CdS-haltiger Polymersomen . . . . .   | 111 |
| 55 | UV/Vis-Spektren zur zeitlichen Verfolgung der CdS-Fällung in Polymersomen und in als Vergleich in Lösung . . . . .   | 112 |
| 56 | pH-Abhängigkeit der Partikelgröße von intravesikulär gebildetem CdS . .  | 114 |
| 57 | Abhängigkeit der Partikelgröße von intravesikulär gebildetem CdS vom Mischungsverhältnis mit $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung . . . . .                                    | 115 |
| 58 | Abhängigkeit der Partikelgröße von intravesikulär gebildetem CdS von der $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration und dem pH-Wert . . . . .                                 | 116 |
| 59 | Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen   | 117 |
| 60 | Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen nach Inkubation mit wässriger $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung . . . . .                    | 118 |

## Abbildungsverzeichnis

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 61 | Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, Cd <sup>2+</sup> -haltigen Polymersomen nach Inkubation mit wässriger H <sub>2</sub> S-Lösung . . . . .                                | 119 |
| 62 | Mittels FAAS bestimmter Kupfergehalt in aufgereinigten, Cu <sup>2+</sup> -haltigen Polymersomen . . . . .   | 124 |
| 63 | UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der CuS-Fällung: (a) in Cu <sup>2+</sup> -haltigen Polymersomen und (b) aus einer 0,8 mM CuCl <sub>2</sub> -Lösung . . . . .               | 125 |
| 64 | Verfolgung des Fällungskinetik über Veränderungen der optischen Dichte für Cd <sup>2+</sup> - und Cu <sup>2+</sup> -haltige Polymersomen . . . . .                            | 130 |
| 65 | Röntgenpulverdiffraktogramm von aufgereinigtem Pyrit aus der Reaktion von FeS und S <sub>8</sub> . . . . .  | 136 |
| 66 | (a) Schematische Darstellung der Extraktion von DMS aus einer Probe der Reaktionslösung und (b) Beispiel-Gaschromatogramm von DMS in Toluol . . . . .                         | 143 |
| 67 | DMS-Ausbeute der Reduktionsreaktion von DMSO durch FeS/H <sub>2</sub> S bzw. H <sub>2</sub> S . . . . .   | 145 |
| 68 | PXRD-Diffraktogramm der Reaktionsprodukte der DMSO-Reduktion mit FeS sowie mit FeS/H <sub>2</sub> S . . . . .   | 147 |
| 69 | (a) REM-Aufnahme FeS-haltiger Polymersomen, (b) Cryo-TEM-Aufnahme von Liposomen mit Magnetit-Nanopartikeln und (c) Cryo-TEM-Aufnahme eines CdS-haltigen Polymersoms . . . . . | 152 |
| 70 | Berechnung des internen Volumens von Liposomendispersionen . . . . .  | 182 |
| 71 | Massenspektrum des Rückstands aus FeS-Polymersomendispersionen . . . . .  | 183 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| acac                            | Acetylacetonat                                   |
| BET                             | Brunauer-Emmett-Teller                           |
| BSE                             | Rückstreu-Elektronen (back-scatter electrons)    |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | Dichlormethan                                    |
| CHCl <sub>3</sub>               | Chloroform                                       |
| Cryo-TEM                        | Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie          |
| DBSO                            | Dibenzylsulfoxid                                 |
| dimegly                         | Dimethylglyoxim                                  |
| DMS                             | Dimethylsulfid                                   |
| DMSO                            | Dimethylsulfoxid                                 |
| DNS                             | Desoxyribonukleinsäure                           |
| DPSO                            | Diphenylsulfoxid                                 |
| DTA                             | Differenzthermoanalyse                           |
| EDTA                            | Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EDX                             | Energie-dispersive Röntgenstrahlung              |
| EE                              | Einschlusseffizienz                              |
| ESMA                            | Elektronenstrahl-Mikroanalyse                    |
| FAAS                            | Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie             |
| FHE                             | Filmhydratisierungs-Extrusions-Methode           |
| FID                             | Flammenionisationsdetektor                       |
| GC                              | Gaschromatographie                               |
| ggf.                            | gegebenenfalls                                   |
| GPC                             | Gelpermeationschromatographie                    |
| min                             | Minuten  |
| MS                              | Massenspektrometrie                              |
| NP                              | Nanopartikel(n)                                  |
| PB-PEO                          | 1,2-Polybutadien-polyethylenoxid block-Copolymer |
| PCS                             | Photon Correlation Spectroscopy                  |
| PDC                             | Pyrazin-1,2-dicarbonensäure                      |
| PDI                             | Polydispersitätsindex                            |
| phen                            | 1,10-Phenanthrolin                               |

## Abbildungsverzeichnis

|          |   |
|----------|---|
| PL       | Phospholipide   |
| POPC     | 1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphatidylcholin |
| PXRD     | Röntgenpulverdiffraktometrie (powder X-ray diffraction)     |
| REM      | Rasterelektronenmikroskopie                                 |
| RNA      | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)                         |
| RVE      | Reverse-Phase-Evaporation-Methode                           |
| SE       | Sekundär-Elektronen   |
| TAA      | Thioacetamid  |
| TEM      | Transmissionselektronenmikroskopie                          |
| TG       | Thermogravimetrie   |
| THF      | Tetrahydrofuran   |
| TREG     | Triethylenglykol  |
| TRIS     | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                             |
| TRIS-HCl | 100 mM TRIS-HCl-Puffer mit pH 7,4                           |
| u.U.     | unter Umständen   |
| v.a.     | vor allem   |

# 1 Einleitung

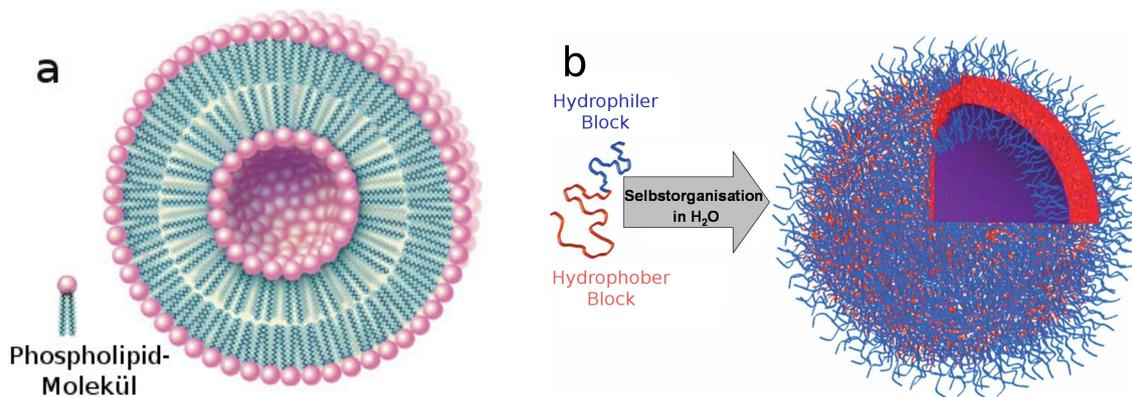
Vesikel sind synthetische Kompartimente, die sowohl Anwendung in der Biotechnologie, Pharmazie und Medizin als auch als Modell für biologische Kompartimente finden [1]. Insbesondere Lipidvesikel (Liposomen) sind aus Membranen aufgebaut, die lebenden Zellen strukturell sehr ähneln. Darum sind sie für Untersuchungen von Membranprozessen sowie für die Simulation von grundlegenden zellulären Vorgängen äußerst attraktiv. Vesikel finden überdies bei der Konstruktion von so genannten Minimal- bzw. semi-synthetischen Zellen Anwendung [2]. Solche Untersuchungen sollen zur Aufklärung der wesentlichen Komponenten und Prinzipien zellulären Lebens beitragen und bei der Identifizierung der (über)lebensnotwendigen, nicht-redundanten Ausstattung einer lebenden Zelle helfen. Es wird letztendlich angestrebt, eine artifizielle (Minimal-)Zelle zu erzeugen, die von einem einfachen, plausibel präbiotischen Anfangsstadium ausgehend alle oder zumindest einzelne Eigenschaften von Leben, also Stoffwechsel, Reproduktion und Anpassungsfähigkeit, entwickelt [1]. Die Untersuchungen können auch Hinweise auf die Funktionsweise und Gestalt von einfachen Protozellen als mögliche Vorläufer erster Zellen und somit ersten Lebens auf der Erde liefern.

Hierbei wird ein anderer Ansatz verfolgt als bei der vor kurzem publizierten Generierung eines artifiziellen Bakteriums [3]. Dort wurde zunächst computergestützt eine künstlichen DNS aus Bruchstücken eines Bakteriengenoms erzeugt. Anschließend erfolgte die Transplantation dieser DNS in eine Bakterienzelle ohne Erbinformation, jedoch mit kompletter Zellausstattung. Bei diesem Experiment wurde allerdings nur Leben aus Leben geschaffen und somit nicht im Sinne der semi-synthetischen Zelle die Entwicklung einer nicht komplett ausgestatteten Protozelle untersucht.

## 1.1 Vesikel - Modelle für biologische Kompartimente

### 1.1.1 Eigenschaften und Anwendungen von Vesikeln

Vesikel sind zellähnliche Strukturen, bei denen ein wässriges Tröpfchen vollständig von einer semipermeablen Membran eingeschlossen wird. Die Vesikelmembran wird von amphiphilen Molekülen mit einer geeigneten Molekülstruktur aufgebaut, die es ermöglicht, dass sich die Moleküle unter bestimmten Bedingungen in geschlossenen Kompartimenten mit einer Doppelschicht organisieren (s. Abb. 1). Es gibt verschiedene amphiphile, vesikelbildende Molekülklassen, z.B. Phospholipide (PL), langkettige Carbonsäuren



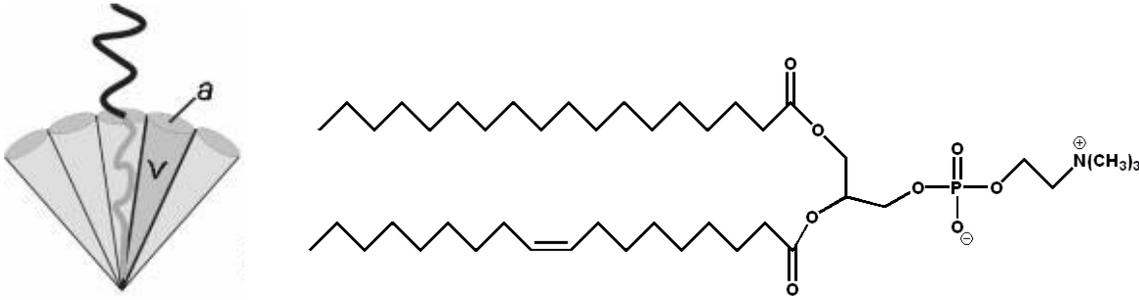
**Abb. 1:** links (a): Schematische Darstellung eines aus Phospholipidmolekülen aufgebauten Liposoms (aus [4]) und rechts (b): Schematische Darstellung eines Polymersoms, das aus einem Copolymer mit einer hydrophilen (blau) und einer hydrophoben (rot) Einheit aufgebaut ist (aus [5])

(Fettsäuren) und auch block-Copolymere. All diesen Molekülen ist ein langkettiger hydrophober Teil und eine hydrophile bzw. geladene Kopfgruppe eigen. Für die Fähigkeit, Vesikel zu bilden, ist das Größenverhältnis zwischen dem hydrophoben Teil und der hydrophilen Kopfgruppe entscheidend. Dieses wird durch den so genannten Packungsparameter  $P$  beschrieben:

$$P = V \cdot a^{-1} \cdot l^{-1}$$

Dabei ist  $V$  das Volumen des hydrophoben Teils,  $a$  der Flächenbedarf der hydrophilen Kopfgruppe und  $l$  die Länge der hydrophoben Kette als Normale zur Fläche der Kopfgruppe (vgl. Abb. 2a). Der Packungsparameter sowie die Wölbung der Grenzfläche zwischen hydrophilem und hydrophobem Teil bestimmen die geometrische Form des einzelnen amphiphilen Moleküls und dirigieren damit die Anordnung vieler solcher Moleküle in eine bestimmte selbstorganisierende Struktur [6]. Bei einem Packungsparameter von  $\frac{1}{2} < P < 1$  ordnen sich die Amphiphile in Doppelschichten an, was die Bildung von Vesikeln ermöglicht. Die thermodynamisch treibende Kraft bei dem Prozess der Selbstorganisation ist dabei die Verminderung der Grenzflächenenergie zwischen dem hydrophoben Teil des isolierten Amphiphils und umgebendem Wasser [6]. Dieses Phänomen ist auch unter dem Namen „hydrophober Effekt“ bekannt [7].

Für die Generierung von Vesikeln ist zudem die Temperatur von Bedeutung. So lassen sich stabile Vesikel aus Phospholipiden nur oberhalb der so genannten „Phasenübergangstemperatur“ herstellen. Oberhalb dieser Temperatur befinden sich die Moleküle in der



**Abb. 2:** links (a): Veranschaulichung des Packungsparameters  $P$  von amphiphilen Molekülen (aus [6]) und rechts (b): Strukturformel von POPC

Phospholipidmembran im flüssigkristallinen Zustand, der für eine höhere Beweglichkeit der Moleküle und somit für die notwendige Flexibilität der Membran sorgt. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur befinden sich PL im so genannten Gelzustand, in dem die Moleküle in der Membran deutlich starrer und weniger beweglich sind.

Weitere wichtige Parameter sind, insbesondere für amphiphile Moleküle mit ionischer Kopfgruppe, die Ionenstärke bzw. für protonierbare Lipide der pH-Wert. Je nach  $\text{pK}_S$ -/ $\text{pK}_B$ -Wert der amphiphilen Moleküle bzw. deren funktionellen Gruppen können saure Gruppen deprotoniert oder basische Gruppen pH-abhängig protoniert werden. In Abhängigkeit vom pH-Wert kann sich damit die Anordnung der amphiphilen Moleküle in der Vesikelmembran und die Ausrichtung an der Membranoberfläche deutlich verändern. Das unter anderem aus Eidotter oder Sojabohnen gewonnene POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphatidylcholin; Struktur s. Abb. 2b) besitzt beispielsweise eine zwitterionische Kopfgruppe mit einer Phosphatgruppe und einem quartären Ammoniumion, deren Orientierung an der Membranoberfläche sich pH-abhängig verändern kann. Daraus resultiert eine pH-abhängige Membranpermeabilität und auch Stabilität von POPC-Liposomen [8, 9].

Fettsäuren wie z.B. Ölsäure bilden Vesikel überhaupt nur in einem engen pH-Bereich von ungefähr pH 7 - 9. Es wird angenommen, dass die Vesikel aus einem Gemisch von deprotonierten und protonierten Fettsäuremolekülen aufgebaut sind [1]. Bei niedrigerem pH-Wert findet eine Phasentrennung der vollständig protoniert vorliegenden Säure statt, bei hohen pH-Werten bilden sich Mizellen aus der vollständig deprotonierten Fettsäure. Zusätzlich wird die Vesikelbildung noch durch andere Faktoren wie Gegenionen, Temperatur und Konzentration beeinflusst [1].

### 1.1.2 Liposomen

Liposomen repräsentieren einen bedeutenden Typ von Vesikeln. Sie sind üblicherweise aus natürlich vorkommenden Phospholipiden wie POPC, manchmal auch aus rein synthetischen PL aufgebaut (s. Abb. 1a). Phospholipide können aufgrund ihrer Struktur und ihren amphiphilen Eigenschaften im wässrigen spontan Vesikel in einem Größenbereich von ca. 20 nm bis zu 10  $\mu\text{m}$  bilden [8,10]. Da Liposomen meist aus natürlichen PL aufgebaut sind, die auch in zahlreichen Biomembranen vorkommen, ähneln sie strukturell in gewisser Weise Zellen, was ihre mannigfaltige Verwendung als Zellmodell begründet (s. Kapitel 1.1.4). Liposomen können verschiedenste Materialien je nach deren Löslichkeits-Eigenschaften im wässrigen Inneren oder auch in der Membran einschließen. Aus diesem Grund finden Liposomen vielfältige Anwendung, z.B. in der Verkapselung und dem Transport von physiologisch relevanten Substanzen bzw. Arzneistoffen (drug delivery) [11]. Zudem können so genannte superparamagnetische, meist mit Magnetit-Nanopartikeln (Magnetit-NP) beladene Liposomen als Röntgenkontrastmittel, Kontrastmittel in der Kernspintomographie oder auch als Anti-Tumor-Reagenz eingesetzt werden [11–13]. In letzterem Fall reichern sich Liposomen nach der Verabreichung aufgrund der erhöhten Stoffwechselaktivität in den Krebszellen an. Mittels eines auf den Tumor gerichteten Wechsellmagnetfeldes können die Magnetit-Partikel dann erwärmt werden, was den Tod umgebender Tumorzellen zur Folge hat [14]. Allerdings weisen Liposomen im Allgemeinen eine nur moderate chemische und mechanische Stabilität auf und sind auch nur sehr begrenzt lagerbar [5]. Diese Einschränkungen können durch den Einsatz anderer vesikulärer Systeme wie Polymersomen (s. nächstes Kapitel) verringert werden. Liposomen sind durch eine Vielzahl von Methoden generierbar. So zählen u.a. die Erzeugung in wässrigen Dispersionen von Phospholipiden mittels Ultraschall und die Hydratisierung eines Phospholipidfilms mit einem wässrigen Medium (Film-Hydratisierungsmethode) zu Standardmethoden. Des Weiteren sind die Injektion einer alkoholischen oder etherischen Lösung des Phospholipids in ein wässriges Medium und die sogenannte Reverse-Phase-Evaporation-Methode (RVE) (s.S. 22) neben vielen anderen Methoden bekannt [15].

### 1.1.3 Polymersomen

Eine strukturell ganz andere vesikelbildende Substanzklasse stellen bestimmte amphiphile block-Copolymere dar, die so genannte Polymersomen bilden können (s. Abb. 1b).

Derartige Vesikel wurden erstmals 1995 beschrieben [16]. Polymersomen können in vergleichbaren Größen wie Liposomen hergestellt werden, weisen im Vergleich zu Liposomen allerdings eine deutlich dickere Membran, bedingt durch die höheren Molmassen, auf. Aufgrund der rein synthetischen Natur der Polymere können dabei Parameter wie Molmasse und Zusammensetzung (z.B. Diblock-, Triblock- oder Multiblock-Copolymere verschiedener Einheiten) innerhalb bestimmter Grenzen für die Vesikelbildung beliebig variiert werden. So können unter anderem durch das Einstellen der Molmasse die mechanischen Eigenschaften der Membran und deren Permeabilität kontrolliert bzw. durch die Art des verwendeten Polymers die Oberfläche der Polymersomen mit unterschiedlichsten biochemisch relevanten funktionellen Gruppen versehen werden [5]. Auch Polymersomen eignen sich analog zu Liposomen für den Einschluss von hydrophilen Substanzen im Vesikelinneren und hydrophoben Substanzen in der Vesikelmembran. Zudem ist es durch den Einbau von Gruppen, die auf äußere Stimuli reagieren, möglich, Polymersomen gezielt durch z.B. pH-Veränderungen, UV-Licht oder Oxidationsmittel abzubauen. Dies ist insbesondere für die gesteuerte Freisetzung von eingeschlossenen Substanzen interessant [5].

Polymersomen sind prinzipiell analog den Herstellungsmethoden für Liposomen zugänglich. Die Bildungsgeschwindigkeit der Vesikel ist jedoch, bedingt durch die Flexibilität der Polymerketten, meist niedriger.

### 1.1.4 Vesikel als Zellmodelle

Als sehr einfaches Zellmodell spielen Vesikel eine wichtige Rolle, da mit ihnen einzelne, meist isolierte Prozesse aus der Fülle intrazellulärer Vorgänge erforscht werden können. Die Untersuchungen, bei denen aufgrund der Ähnlichkeit zu natürlichen Membranen oft Phospholipide (z.B. POPC) eingesetzt werden, sollen zur Verbesserung des Verständnisses von intrazellulären biochemischen Reaktionen unter den besonderen Bedingungen der Kompartimentierung, d.h. in einer abgeschlossenen Mikroumgebung, dienen. So wurden in Vesikeln die DNS-Polymerase-Kettenreaktion, die enzymatische Synthese der amphiphilen Membrankomponenten sowie in mehreren Fällen die Expression von Proteinen erfolgreich durchgeführt (zusammengefasst in [1]). Trotz faszinierender Ergebnisse bei der Simulation von einzelnen, zellulären Vorgängen sind diese Untersuchungen nur modellhaft. Dies liegt u.a. in fehlenden Membrantransportmöglichkeiten zur Aufrechterhaltung der Reaktionen begründet. Als Konsequenz daraus kommen die erforschten intrazellu-

lären Prozesse in der Regel schon nach kurzer Zeit zum Erliegen. Dieses Problem kann durch den Einsatz von membranständigen Transportenzymen umgangen werden [17].

### 1.1.5 Vesikel mit Metallchalkogenid-Nanopartikeln

Neben den bereits in der Medizin Anwendung findenden Magnetit-haltigen Liposomen (s. Kapitel 1.1.2) bietet die Kompartimentierung von photohalbleitenden Metallchalkogeniden ein vielversprechendes Forschungsfeld. Ziel dabei ist der Einschluss eines elektronenübertragenden Systems in einem Kompartiment, das als eine Art Mikroreaktor angesehen werden kann.

Es wurden bereits von verschiedenen Gruppen die photokatalytisch aktiven Metallchalkogenide CdS [18–23] und TiO<sub>2</sub> [24] in Liposomen eingeschlossen. Die photokatalytische Aktivität von CdS und TiO<sub>2</sub> konnte anhand eines Elektronentransports bei Bestrahlung von einem intravesikulären Elektronendonator zu einem extravesikulären Elektronenakzeptor belegt werden [18–20, 24]. Diese Untersuchungen sind auch für die generelle Modellierung von potenziellen Vorläufern von primordialen Protozellen (s. nächstes Kapitel) von Relevanz. Das kompartimentierte elektronenübertragende System könnte dabei zur Aufrechterhaltung eines primitiven Metabolismus in einer Art Protozelle dienen. Dies wird für das verkapselte TiO<sub>2</sub> vorgeschlagen, das als Modell für eine frühe Photosynthese angesehen werden kann [24]. Hingegen fehlen bisher Untersuchungen zu kompartimentierten mineralischen Systemen wie FeS<sub>x</sub> (x = 1,2) und Montmorillonit, die womöglich ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung ersten Lebens spielten (s. Kapitel 1.2.3).

## 1.2 Hypothesen zur Chemischen Evolution und der Entwicklung ersten Lebens

„Chemische Evolution“ wird als der Prozess der Synthese von biochemischen Bausteinen wie z.B. Aminosäuren, Fettsäuren und Nucleinsäurebasen aus einfachen, auf der Urerde vorhandenen Molekülen unter präbiotischen Bedingungen definiert [25]. Der Aufbau von immer komplexeren, hochmolekularen Strukturen aus diesen Bausteinen durch eine Vielzahl heute kaum mehr rekonstruierbarer Prozesse führte schließlich zur Entstehung ersten Lebens (Biogenese) [26].

Die Beantwortung der Frage, wie und in welchen Stufen der Prozess der Biogenese auf der Erde vor ca. 3,8 Milliarden Jahren erfolgte, stellt eine kaum zu bewältigende Herausforderung für die Naturwissenschaften dar. Schließlich handelt es sich bei der Biogenese

## 1.2 Hypothesen zur Chemischen Evolution und der Entwicklung ersten Lebens

um ein Ereignis, das unter bisher nur ungenügend bekannten Bedingungen ablief. So kann die Zusammensetzung der Uratmosphäre und die damit verbundenen Redoxbedingungen auf der Urerde vor ca. 3,8 Milliarden Jahren nur grob extrapoliert werden [27], die genaue Umgebung, in der sich erstes Leben entwickelte, ist unbekannt. Zudem existieren praktisch keinerlei geologische Rückstände aus dieser Zeit, die Hinweise auf frühe Lebensformen und deren Vorläufer geben könnten. Damit ist jegliche Hypothese zur Entstehung von Leben nicht falsifizierbare Spekulation. Verschiedene Hypothesen können ausschließlich hinsichtlich ihrer Plausibilität miteinander verglichen werden [26]. Nichtsdestotrotz wird die Frage nach dem Ursprung des Lebens heute zu den wichtigsten und herausforderndsten Fragestellungen der Chemie gezählt [28].

### 1.2.1 „Ursuppen“-Hypothese

Als Erster versuchte *Oparin* 1924 mit seiner „Ursuppen“-Hypothese, den Prozess der Biogenese in den naturwissenschaftlichen Diskurs einzubringen. Er postulierte, dass sich in der reduzierenden Uratmosphäre mit den Gasen  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  unter dem Einfluss von UV-Strahlung und Blitzentladungen organische Materie bildete [25]. Diese Materie habe sich dann in der Hydrosphäre angereichert und eine Art „verdünnter Suppe“ gebildet, aus der dann spontan erstes Leben entstand [25].

Doch erst durch das „Miller-Urey-Experiment“ im Jahr 1953 [29], in dem die Bildung biochemisch relevanter Bausteine wie z.B. mehrerer Aminosäuren sowie kurzkettiger Hydroxysäuren in einer reduzierenden Atmosphäre unter Blitzentladungen nachgewiesen werden konnte, wurde aufgezeigt, dass das Biogenese-Problem experimentell zugänglich ist. Darum begannen in den nachfolgenden Jahrzehnten intensive experimentelle Untersuchungen zur Bildung von biochemisch relevanten Molekülen unter mutmaßlich präbiotischen Bedingungen [25]. Nach und nach gelang es, verschiedene biochemische Bausteine wie Aminosäuren, kurzkettige Fettsäuren und Nucleinsäurebasen, allerdings nicht alle unter vergleichbaren Bedingungen, zu generieren [30]. Derartige Molekülklassen konnten zudem auf dem prominenten *Murchison*-Meteoriten entdeckt werden, so dass die Verfügbarkeit biochemischer Bausteine aus terrestrischen bzw. extraterrestrischen Quellen auf der Urerde als gegeben angesehen wird [25]. Allerdings gelang es bislang nicht, plausible Wege für den konvergenten Aufbau von hochmolekularen Systemen wie Proteinen und informationstragenden Polymeren aus den Bausteinen zu finden. Eine stringente Hypothese von der Bildung organischer Materie bis zur Ausbildung ersten

## 1 Einleitung

Lebens kann die Ursuppen-Hypothese somit nicht liefern [30].

### 1.2.2 RNA-Welt-Hypothese

Einen anderen Ansatz hat die RNA-Welt-Hypothese, entsprechend der sich ein erstes selbst-replizierendes und katalytisch aktives System auf Basis der RNA ausgebildet hat. Die Annahme stützt sich auf die vielfältigen Eigenschaften der RNA, welche sowohl die Fähigkeit zur Informationsübertragung besitzt als auch katalytische Eigenschaften aufweist [31]. Allerdings gilt es auch für die RNA plausible Mechanismen zum Aufbau eines Polymers aus einzelnen Nukleotiden zu finden, da sich eine katalytische Aktivität erst bei der Verknüpfung von mindestens 20-30 Nukleotiden einstellt. Tatsächlich ist aber noch kein präbiotisch plausibler Weg bekannt, Nukleotide überhaupt herzustellen, so dass über eine Prä-RNA-Welt spekuliert wird [32]. Immerhin konnte bereits gezeigt werden, dass RNA-Oligomere aus aktivierten Nukleotiden in speziellen kompartimentierten Umgebungen wie entwässerten Lipiddoppelschichten bzw. im eutektischen Wasser-Eis-Gemisch bei  $-18^{\circ}\text{C}$  unter Katalyse von Metallionen aufgebaut werden können [33, 34]. Die Frage, wie hinreichend lange und stabile sowie rasch genug gebildete bzw. replizierte RNA-Sequenzen generiert werden können und wie überhaupt Nukleotide plausibel präbiotisch entstehen können, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen [25].

### 1.2.3 Chemoautotropher Ursprung des Lebens

Natürlich vorkommende Minerale wie Montmorillonit (Tonmineral) sowie Übergangsmetallsulfide haben möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Herausbildung von lebenden Systemen gespielt, da sie in der Lage sind, an der Oberfläche angelagerte Moleküle zu aktivieren und somit bestimmte Reaktionen gezielt zu katalysieren [35, 36]. So ist z.B. bekannt, dass eine Vielzahl von Mineralen in der Lage ist, die Umwandlung von Fettsäure-Micellen in Vesikel zu befördern [37].

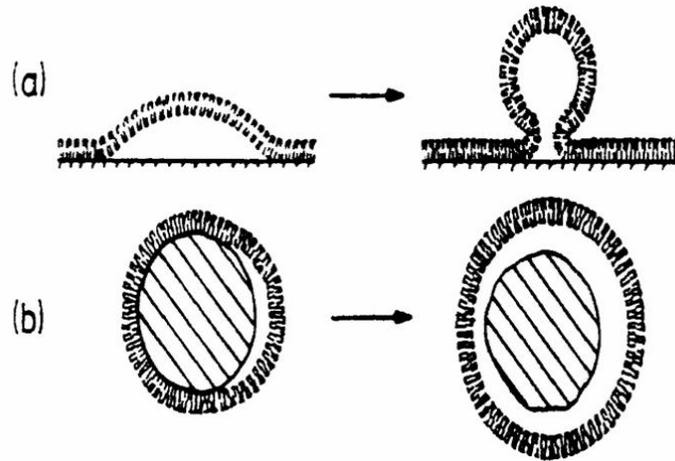
Ende der 1980er wurden überdies zwei Hypothesen vorgestellt, welche die womöglich zentrale Bedeutung von Eisensulfiden für die Entstehung ersten Lebens betonen. Eisenmonosulfid  $\text{FeS}$  ist oxidationsempfindlich gegenüber Sauerstoff und kommt darum nur in geringen Mengen auf der Erde, z.B. in der Umgebung so genannter „Schwarzer Raucher“ auf dem Meeresboden, vor [25]. Allerdings waren  $\text{FeS}$  und Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) auf der Urerde in der sauerstofffreien Atmosphäre vorhanden [25]. Plausibilität gewinnen die Hypothesen durch die Tatsache, dass einfache Fe-S-Verbindungen wie  $[\text{2Fe:2S}]$ - und

[4Fe:4S]-Cluster Redoxpotenziale mit einer großen Bandbreite aufweisen und in einer Vielzahl von Enzymen wirksam sind [38]. So bilden Eisen-Schwefel-Cluster u.a. die aktiven Zentren in heutigen Enzymen, die Redoxreaktionen an Molekülen wie  $N_2$ ,  $H_2$  und CO katalysieren [38]. Diese Moleküle waren höchstwahrscheinlich wichtige Bestandteile der Uratmosphäre [38].

### Biogenese in FeS-Blasen

Diese von *M. Russel* und *W. Martin* maßgeblich entwickelte Hypothese postuliert, dass sich erstes Leben am Meeresboden in Eisensulfid-Kompartimenten entwickelte, die an der Grenzfläche zwischen dem sulfidhaltigen Wasser von Hydrothermalquellen und dem  $Fe^{2+}$ -haltigen Wasser des Ozeans gebildet wurden [39]. Die Triebkraft für den Aufbau organischer Materie aus  $CO_2$  lieferte ein Temperatur-, Redox- und pH-Gradient an der ausgefällten Membran aus Eisensulfid zwischen dem warmen, alkalischen und  $H_2$ -haltigen Hydrothermalwasser und dem kalten  $CO_2$ -haltigen Wasser des Ozeans [40]. Die gebildeten FeS-Blasen werden als funktionelle Vorläufer von später entstehenden Zellwänden interpretiert. Durch sie konnten Reaktanden im Inneren der Kompartimente hinreichend aufkonzentriert werden. Durch die vorherrschenden Gradienten sowie durch die katalytische Wirkung von Metallsulfiden konnten komplexere organische Moleküle unter Fixierung von  $CO_2$  aufgebaut werden [40]. In den mineralischen Vorläufern entwickelten sich nach und nach zwei alternative Wege der Lipidsynthese und ein genetischer Apparat, bis schließlich erste Zellen ohne anorganische Hülle entstanden. Somit wäre für die Entstehung von Leben keinerlei biologische Kompartimentierung als Ausgangsvoraussetzung notwendig gewesen, und ein genetischer Apparat wäre erst nach dem Metabolismus im FeS-Kompartiment entstanden [40].

Für die Hypothese gibt es einzelne geologische Belege. So wurden vor wenigen Jahren tatsächlich alkalische Hydrothermalquellen am Meeresboden entdeckt, die signifikante Mengen an  $H_2$  und  $HS^-$ -Ionen beinhalten [41]. Zudem sind Strukturen, die Kompartimenten ähneln, aus fossilisierten, vom Meeresboden stammenden Eisensulfidablagerungen bekannt [42]. Berichte von experimentellen Untersuchungen, die das vorgeschlagene Szenario unterstützen würden, fehlen indes völlig.



**Abb. 3:** Mögliche Wege zur Herausbildung von zellulären Strukturen im Eisen-Schwefel-Welt-Szenario (aus [43])

### Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese

Diese von *G. Wächtershäuser* entwickelte Hypothese postuliert, dass sich an der Oberfläche von Eisensulfiden ein erster so genannter „Pionier-Organismus“ entwickelte [44]. Dieser ist gekennzeichnet durch autokatalytische Kohlenstofffixierungs-Zyklen, die zur Bildung einer organischen Überstruktur auf einer anorganischen, metallsulfidischen Substruktur führen [44]. Die reduktive Kraft für die Bildung und den weiteren Aufbau von niedermolekularen organischen Molekülen mittels  $\text{CO}_2$ -Fixierung liefert die oxidative Pyritbildung (s. Reaktion 1) unter katalytischer Wirkung von anwesenden Übergangsmetallverbindungen [45].



Die durch Reduktion von  $\text{CO}_2$  gebildeten, negativ geladenen organischen Moleküle werden *in statu nascendi* an die gebildete Pyritoberfläche gebunden, verweilen dort je nach Bindungsstärke und können in weiteren Reaktionen zum Aufbau von komplexeren, höhermolekularen Verbindungen beitragen [45]. Es bildet sich nach und nach ein Oberflächen-Reaktionsnetzwerk heraus, welches auch zur Bildung von einfachen Lipiden führt [45]. Eine hinreichende Anreicherung von Lipiden an der Pyrit-Oberfläche kann schließlich zur Ausbildung von semi-zellulären oder zellulären Strukturen führen, die potenzielle Vorläufer erster Zellen sind (s. Abb. 3).

Experimentelle Untersuchungen zur Synthese von zumindest kurzkettingen Lipiden durch das  $\text{FeS}/\text{H}_2\text{S}$ -System wurden unlängst veröffentlicht. Es konnten kurzkettinge  $\alpha$ -Amino-

## 1.2 Hypothesen zur Chemischen Evolution und der Entwicklung ersten Lebens

und  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren mit einer Kettenlänge von bis zu fünf Kohlenstoffatomen durch die Umsetzung von Cyanid, CO und Methylthiolat im alkalischen unter plausiblen geologischen Bedingungen in Gegenwart des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems erzeugt werden [46]. Gleichwohl ist über Untersuchungen zur Verkapselung von FeS- bzw. FeS<sub>2</sub>-Partikeln in biologischen Kompartimenten wie Vesikeln bislang nichts bekannt. Solche Untersuchungen sind vonnöten, um die Funktionalität des energieliefernden FeS/H<sub>2</sub>S-Systems auch unter kompartimentierten Bedingungen, wie in Abb. 3b dargestellt, zu verifizieren.

Die postulierte Reduktionskraft des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems im makroskopischen Maßstab konnte schon in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden. So entstanden bei der Reaktion von FeS/H<sub>2</sub>S mit CO<sub>2</sub> Methylmercaptan (CH<sub>3</sub>SH), Schwefelkohlenstoff (CS<sub>2</sub>), COS und kurzkettige Thiole [47]. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich aus CO und Methylmercaptan (CH<sub>3</sub>SH) in der Gegenwart des gemischten Sulfids (Ni,Fe)S Essigsäure bilden kann [48]. (Ni,Fe)S kann somit als funktioneller Vorläufer des aktiven Zentrums der Acetyl-CoA-Synthase angesehen werden, die eine ähnliche Funktionalität bezüglich der Kohlenstofffixierung aufweist [48]. Weitere Untersuchungen belegen die reduzierenden Eigenschaften des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems unter plausiblen geologischen Bedingungen, wobei insbesondere der Nachweis der Reduktion des reaktionsträgen Stickstoff N<sub>2</sub> zu NH<sub>3</sub> bemerkenswert ist [49]. Die wenigen bislang vorliegenden Berichte zur reduzierenden Wirkung des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems [47–52] sind nur beispielhaft, so dass es weiterer Untersuchungen an anderen Modellverbindungen bedarf.

### 1.3 Zielstellungen

Die Motivation für diese Arbeit liegt in der experimentellen Verifizierung der Reduktionskraft des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems als Energiequelle in der Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese. Zudem sollen, vom kompartimentierten Eisensulfid ausgehend, neuartige Systeme von kompartimentierten Metallsulfiden generiert und charakterisiert werden.

In einem ersten Teil der Arbeit soll eine Methode etabliert werden, die Zugang zu intravesikulärem Eisensulfid (FeS) ermöglicht. Solche Vesikel stellen einen ersten Schritt zu Modellen von möglichen Protozellen mit einem kompartimentierten, energieliefernden System FeS/H<sub>2</sub>S dar (s. Abb. 4), wie er in der Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese postuliert wird [45]. Es soll geklärt werden, ob auch das kompartimentierte FeS/H<sub>2</sub>S-System noch reduktive Eigenschaften aufweist. Bei einem positiven Resultat könnte eine zentrale Annahme der Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese experimentell unterstützt werden, was die Plausibilität der Hypothese unterstützen würde. Die Untersuchungen sollen nicht die Bildung von amphiphilen Molekülen durch das FeS/H<sub>2</sub>S-System zum Gegenstand haben. Vielmehr soll FeS im Inneren von Vesikeln unter inerten Bedingungen generiert und die erhaltenen Vesikel auf ihre zeitliche und thermische Stabilität sowie Reaktivität hin untersucht werden. Dazu sollten verschiedene vesikelbildende Substanzklassen sowie bekannte Methoden zur Herstellung von Vesikeln hinsichtlich ihrer Eignung getestet werden.

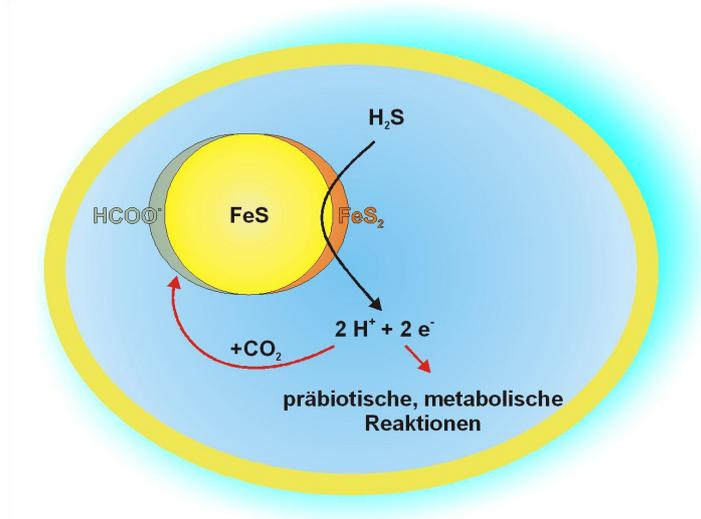


Abb. 4: Prinzip eines kompartimentierten Pionier-Metabolismus (aus [53])

Des Weiteren soll die Reduktionskraft des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems an der Modellsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) untersucht werden. Die Ergebnisse können zur Erweiterung des Verständnisses der reduzierenden Wirkung des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems führen. Es ist zudem zu klären, ob sich das FeS/H<sub>2</sub>S-System als einfaches Modell für das Enzym DMSO-Reduktase, das formal wie eine Oxotransferase wirkt, eignet. Dazu ist eine Methodik für die Durchführung der Reaktion unter inerten Bedingungen und eine zuverlässige Analytik zu entwickeln. Das zu erwartende Reduktionsprodukt Dimethylsulfid besitzt sowohl biologische als auch klimatische Relevanz insbesondere in der marinen Umgebung [54]. Aufbauend auf den Erfahrungen zur Herstellung von FeS-haltigen Vesikeln sollen in vergleichenden Untersuchungen ebenfalls andere, nicht oxidationsempfindliche Metallsulfide wie NiS und CdS in Vesikeln eingeschlossen werden. Diese vergleichenden Untersuchungen können dazu beitragen, den Prozess der intravesikulären Generierung von Metallsulfiden näher zu beleuchten.

Zudem ist es das Anliegen, Magnetit-haltige Vesikel mit neuen Methoden und vesikelbildenden Substanzklassen herzustellen und zu charakterisieren. Dabei kann auf die Ergebnisse der Experimente zu kompartimentierten Metallsulfiden zurückgegriffen werden. Es soll eruiert werden, ob und unter welchen Bedingungen die neuartigen Magnetit-haltigen Vesikel magnetophoretische Eigenschaften aufweisen, die für potenzielle medizinische Anwendungen wie z.B. als Anti-Tumor-Agens (s. Kapitel 1.1.2) interessant sind.

Für die geplanten Untersuchungen sind begleitend synthetische Zugänge zu FeS-, NiS- und Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP zu entwickeln. Die erhaltenen NP können zum einen auf ihre Eignung für den Einschluss in Vesikeln getestet werden. Zum anderen können sie, im Fall von FeS, vergleichend zum amorph hergestellten Metallsulfid charakterisiert werden.

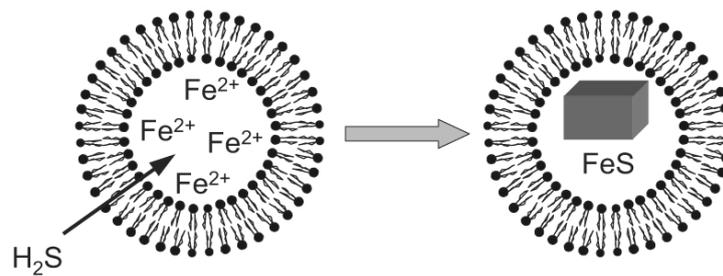
## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

### 2.1 Vorbemerkungen

Für das Einschließen von Eisenchalkogeniden in Vesikeln galt es zunächst, geeignete amphiphile Moleküle zu finden. Dabei mussten mögliche Wechselwirkungen der membranconstituierenden Moleküle mit sowohl  $\text{Fe}^{2+}$ - bzw.  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen als auch mit den erwünschten Zielverbindungen  $\text{FeS}$  und  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  berücksichtigt werden. Die hohe Oxidationsempfindlichkeit von wässrigen  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösungen und wässrigen  $\text{FeS}$ -Suspensionen erforderte zudem die Durchführung aller Präparationsschritte unter anaeroben Bedingungen. Als erstes wurden Vesikel aus POPC auf ihre Eignung zum Einschluss von Eisenchalkogeniden hin untersucht. POPC und andere Phospholipide kamen bereits in vielen Untersuchungen zu Zellmodellen (s. Kapitel 1.1.4) zum Einsatz, z.B. in verschiedenen Ansätzen zur Modellierung einer so genannten „Minimalzelle“ [2]. Zudem sind Zugänge zur Herstellung von intravesikulären Metallchalkogeniden in Phospholipid-Vesikeln bekannt [18, 21, 55, 56].

Für den Einschluss von Eisenchalkogeniden in Vesikeln gibt es mehrere denkbare Herangehensweisen. Die naheliegendste Variante ist der Einschluss von zuvor hergestellten stabilisierten Eisenchalkogenid-NP. Zum Einschluss von Eisenoxid-NP in Phospholipid-Vesikeln existieren bereits Arbeiten [14, 57, 58]. Diese Methode ist prinzipiell auch auf andere Metalloxid-NP, z.B.  $\text{TiO}_2$  [24], übertragbar. Zum Einschluss von Metallsulfid-NP mit dieser Methode sind bisher keine Arbeiten bekannt.

Die Bildung von kompartmentierten Schwermetallsulfiden kann auf andere Weise erfolgen. Kationen diffundieren nur sehr langsam durch Doppellipidschichten, während insbesondere ungeladene Spezies wie  $\text{H}_2\text{O}$ , aber auch Anionen die Vesikelmembran deutlich schneller durchdringen können [59]. Diese Tatsache ausnutzend werden Metallionen im Inneren von Vesikeln eingeschlossen und die erhaltene Vesikeldispersion zur Abtrennung von externen Metallionen mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Dialyse aufgereinigt. Schließlich wird die erhaltene Vesikeldispersion mit einem geeigneten Fällungsreagenz (meist  $\text{H}_2\text{S}$  oder  $\text{OH}^-$  für die Erzeugung von Metallsulfiden und -oxiden) inkubiert. Mit dieser Methode ist es möglich, kompartmentierte Metallsulfide wie  $\text{CdS}$  und  $\text{PbS}$  [18, 21] und Eisenoxide, meist Magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , [56, 60, 61] zu generieren. Für die Herstellung von Liposomen mit Eisensulfid wurde auf das Prinzip der für Schwermetallsulfide bekannten Methode (s. Abb. 5) zurückgegriffen.



**Abb. 5:** Prinzip der Herstellung von FeS-haltigen Liposomen aus aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomen (aus [62])

Auf alternative Varianten zur Präparation intravesikulärer Metallsulfide wird im Kapitel 3.4 eingegangen.

## 2.2 Einschluss von $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Liposomen

### 2.2.1 Vorüberlegungen

Für die Herstellung von FeS-haltigen Liposomen galt es zunächst, eine möglichst hohe Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Liposomen einzuschließen, um nachweisbare Mengen an intravesikulärem FeS zu erzeugen. Der 100%-ige Einschluss einer 100 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung in einem Vesikel mit einem Durchmesser von 30 nm bedeutet, dass sich durchschnittlich insgesamt nur ca. 2000  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in einem Vesikel befinden [59]. Die daraus gebildeten Eisensulfid- bzw. Eisenoxid-Partikel hätten selbst unter idealen Bedingungen bei Einschluss und Ausfällung eine Größe von maximal 2 - 3 nm. Außerdem musste für die einzuschließenden  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ein schwacher Ligand gefunden werden, der

- $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen auch bei pH-Werten bis 7,4 stabilisiert,
- gleichzeitig die Bildung von  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  verhindert,
- mögliche Wechselwirkungen von freien  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mit der zwitterionischen Kopfgruppe von POPC minimiert und
- die annähernd quantitative Ausfällung von FeS aus dem gebildeten Komplex erlaubt.

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

Für eine quantitative Ausfällung von kompartimentiertem FeS ist es unabdingbar, bei  $\text{pH} > 5$  zu arbeiten, da FeS makroskopisch erst ab  $\text{pH} 4$  (bei gesättigter  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung) ausgefällt werden kann [63]. Für die Ausfällung von FeS in Vesikeln dürfte die erreichbare intravesikuläre  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration deutlich unter der Sättigungskonzentration von ca. 100 mM liegen. Somit kann FeS nur durch einen höheren intravesikulären  $\text{pH}$ -Wert als  $\text{pH} 4$  ausgefällt werden. Die obere Grenze für den verwendeten  $\text{pH}$ -Wert wird durch die Bildung von  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  bestimmt. Aufgrund des geringen Löslichkeitsprodukts ( $K_L = 4,9 \cdot 10^{-17} \frac{\text{mol}^3}{\text{l}^3}$ ) fällt  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  aus einer 50 mM Lösung eines  $\text{Fe}^{2+}$ -Salzes bereits ab  $\text{pH} 6,5$  aus. Durch Komplexbildung kann diese  $\text{pH}$ -Grenze allerdings zu höheren  $\text{pH}$ -Werten verschoben werden.

Enorm wichtig in diesem Zusammenhang ist eine Arbeitsweise unter Sauerstoffabschluss, da die Anwesenheit von eventuell gebildeten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bei diesem  $\text{pH}$ -Wert eine Fällung von  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  bedingen würde. Zudem ist bekannt, dass  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen in erheblich größerem Ausmaß die Struktur von Phospholipid-Membranen stören als  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen [64]. Ein geeigneter Ligand sollte mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen einen mäßig stabilen Komplex bilden, der eine Abschirmung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen gegenüber der zwitterionischen Kopfgruppe des POPC bewirken sollte. Eine solche elektrostatische Abschirmung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen kann zudem die Einschlusseffizienz deutlich erhöhen [65]. Aus dem vom Liganden gebildeten Komplex muss jedoch FeS ausfällbar sein, so dass starke Komplexbildner wie 1,10-Phenanthrolin und Cyanid nicht infrage kamen. Um möglichen Wechselwirkungen mit bzw. Einlagerungen in der Vesikelmembran vorzubeugen, wurden auch keine ausgeprägt lipophilen Liganden getestet.

Die notwendige anaerobe Arbeitsweise verringerte die Anzahl geeigneter Methoden für die Herstellung  $\text{Fe}^{2+}$ -haltiger Liposomen. So konnten die in der Literatur für genau diesen Zweck beschriebenen Techniken für *Pro-Liposomen* und *Mikrofluidisation* [66] nicht angewendet werden. Die an anderer Stelle [65] ebenfalls erwähnten Methoden der *Reverse-Phase-Evaporation* (RVE) sowie *Film-Hydratisierung-Extrusion* (FHE) zur Herstellung von  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomen wurden in modifizierter Form angewendet.

### 2.2.2 Untersuchungen zur Stabilisierung von $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen durch Komplexbildung

Auf der Suche nach einem geeigneten Liganden für  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen im Wässrigen wurden verschiedene aromatische und aliphatische stickstoffhaltige Verbindungen hinsichtlich ihrer Komplexbildungseigenschaften getestet. Es zeigte sich, dass mit der Pyrazin-2,3-

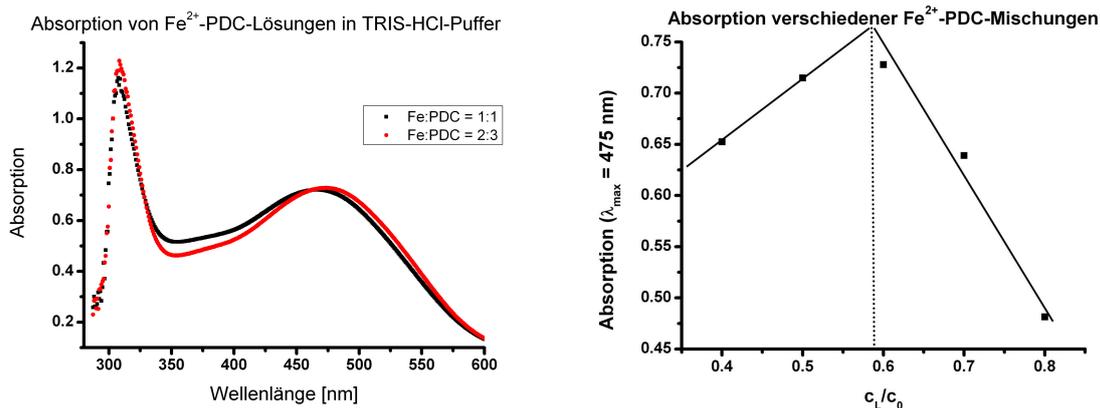
dicarbonsäure (PDC) ein Ligand vorliegt, der zusammen mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in verschiedenen Mischungsverhältnissen einen intensiv roten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{max} = 475 \text{ nm}$  bildet (s. Abb. 6a) [67, 68]. Aus den tiefroten Lösungen scheidet sich ein kristalliner Feststoff mit einer 1:1-Stöchiometrie ab [67, 69], was durch Röntgen-Einkristalluntersuchungen bestätigt wurde [70]. Gleichwohl beschreiben Sanyal *et al.* [68], dass im Wässrigen im pH-Bereich von 5 - 6,5  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und PDC selektiv ein Komplexanion der Zusammensetzung  $\text{Fe}_2(\text{PDC})_3^{2-}$  bilden. Die Selektivität der Komplexbildung ist so hoch, dass man das  $\text{Fe}_2(\text{PDC})_3^{2-}$ -Komplexanion unter Verwendung eines mindestens 10-fachen Überschusses an PDC zur quantitativen Eisenbestimmung heranziehen kann [68]. Das Komplexanion ist wahrscheinlich doppelt negativ geladen, da die  $\text{pK}_a$ -Werte von PDC bei  $\text{pK}_{a1} = 1,5$  und  $\text{pK}_{a2} = 3,25$  liegen [71], und somit bei pH 5,5 beide Carboxylgruppen deprotoniert vorliegen.

Allerdings wird in der Literatur am Beispiel des Oxovanadium(IV)-Kations ( $\text{VO}^{2+}$ ) über das pH-abhängige Vorliegen von in diesem Fall ( $\text{VO}^{2+}$ -PDC)-Spezies unterschiedlicher Stöchiometrie (1:1 bzw. 1:2) in eben diesem pH-Bereich berichtet [71]. Um zu klären, ob sich im gesamten relevanten pH-Bereich von 5 - 7,4 selektiv ein einheitlicher  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex oder ein Gemisch von Komplexen unterschiedlicher Stöchiometrie bildet, wurden mehrere Untersuchungen zur spektrophotometrischen Bestimmung der Komplexzusammensetzung durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Verhalten bei pH 7,4 untersucht, da  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen bei diesem pH-Wert in Liposomen eingeschlossen werden sollten.

Als erstes erfolgte eine Untersuchung mit der Methode der kontinuierlichen Variation nach Job und Ostromisslenski [72]. Voraussetzung zum Anwenden dieser Methode ist, dass Metall und Ligand selektiv nur einen Komplex definierter Zusammensetzung bilden, der Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert. Konkret werden Lösungen gleicher Konzentration von Ligand  $c_L$  und Metall  $c_M$  hergestellt und in verschiedenen Verhältnissen so gemischt, dass das Gesamtvolumen und die -konzentration stets gleich sind ( $c_0 = c_L + c_M = \text{const.}$ ). Die Gleichgewichtskonzentration und damit die Absorption des Komplexes ist somit bei dem Mischungsverhältnis am größten, das genau der Komplexzusammensetzung entspricht.

Es wurden fünf  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Lösungen in verschiedenen Mischungsverhältnissen bei konstanter Gesamtkonzentration von 2 mM in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer, der mit HCl auf pH 7,4 eingestellt wurde (TRIS-HCl-Puffer), hergestellt und die jeweilige

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

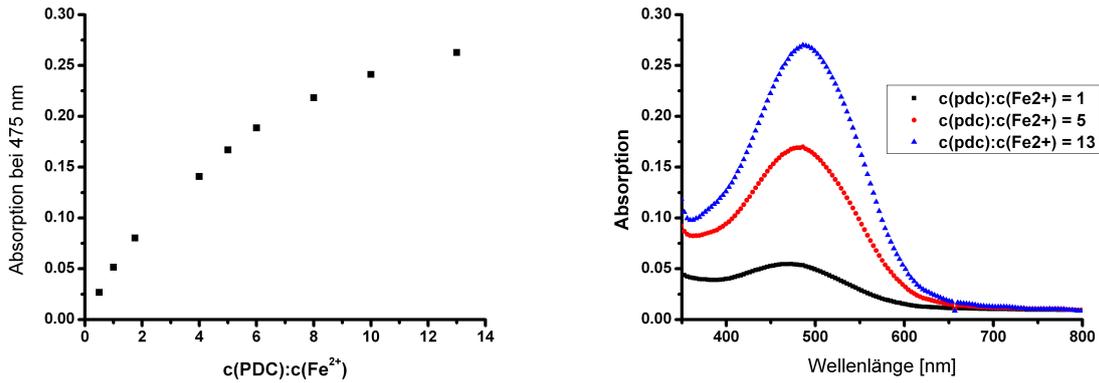


**Abb. 6:** (a) Absorptionsspektren einer 0,8 mM Fe<sub>2</sub>(PDC)<sub>3</sub><sup>2-</sup>- (rot) und einer 1 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Lösung (schwarz) in TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4) und (b) graphische Ermittlung der Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplezzusammensetzung in TRIS-HCl-Puffer nach der Methode der kontinuierlichen Variation;  $c_L$  - Ligandenkonzentration und  $c_0$  - Summe der Konzentrationen von Ligand und Fe<sup>2+</sup>-Ionen

Absorption bei  $\lambda_{max} = 475$  nm bestimmt (s.S. 159). Die aufgetragenen Werte (s. Abb. 6b) können nun zur graphischen Bestimmung des Maximums (aus dem Schnittpunkt zweier Geraden ober- und unterhalb des Maximums) herangezogen werden. Hierbei wurde ein Wert von  $c_L/c_0 \approx 0,59$  erhalten, der auf eine Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplezzusammensetzung von 2:3 hinweist. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der von Sanyal *et al.* [68] beschriebenen Komplezzusammensetzung.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses erfolgte eine zusätzliche Untersuchung der Komplezzusammensetzung mit der Methode der molaren Verhältnisse [72]. Dabei wird die Konzentration eines der komplexbildenden Komponenten (hier des Metallions) konstant gehalten, während die Konzentration des Liganden sukzessive erhöht wird. Bilden die Metallionen tatsächlich quantitativ einen definierten Komplex mit dem Liganden, sollte bei kontinuierlicher Vergrößerung der Ligandenkonzentration ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis  $c_L/c_M$  ein Plateau in der Absorption erreicht werden. Eine weitere Zugabe von Ligand darüber hinaus bliebe ohne Effekt, da bereits alle Metallionen vollständig komplexiert vorliegen.

Es wurden erneut geeignete Lösungen in TRIS-HCl-Puffer hergestellt und UV/Vis-spektroskopisch vermessen (s.S. 159). Dabei zeigte sich, dass die Absorption der erhaltenen Fe<sup>2+</sup>-PDC-Lösungen bei steigender PDC-Konzentration kontinuierlich anstieg, auch weit über den vermuteten Wert von  $c_L/c_M = 1,5$  in einem Fe<sub>2</sub>(PDC)<sub>3</sub><sup>2-</sup>-Komplexanion



**Abb. 7:** links (a): Versuch der Ermittlung der  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexzusammensetzung in TRIS-HCl-Puffer mit der Methode der molaren Verhältnisse und rechts (b): Absorption verschiedener  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Mischungen bei  $c(\text{Fe}^{2+}) = 0,2 \text{ mM} = \text{const.}$

hinaus. Zur genaueren Untersuchung wurden in einem weiteren Experiment  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Lösungen mit einem bei zu dreizehnfachen Überschuss an PDC UV/Vis-spektroskopisch vermessen (s. Abb. 7a). Eine Wiederholung dieses Experimentes in Acetatpuffer pH 5 ergab ein vergleichbares Ergebnis wie in TRIS-HCl-Puffer. Zudem zeigte sich, dass sich das Maximum der Absorptionsbanden bei größeren PDC-Konzentrationen von zunächst  $\lambda_{max} = 475 \text{ nm}$  bathochrom bis  $\lambda_{max} = 485 \text{ nm}$  verschiebt (Abb. 7b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei pH 7,4 nicht nur ein  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex mit definierter Zusammensetzung sondern noch mindestens eine weitere Spezies existiert, die eine andere Zusammensetzung und ein anderes Absorptionsmaximum aufweisen muss. Somit kann das in der Literatur [68] beschriebene  $\text{Fe}_2(\text{PDC})_3^{2-}$ -Komplexanion in TRIS-HCl-Puffer nicht die einzige vorliegende Komplexspezies sein. In Abbildung 7a ist deutlich zu erkennen, dass die Kurve einem Grenzwert zustrebt, diesen allerdings selbst bei einem zehnfachen Überschuss an PDC nicht erreicht. Denkbar ist auch das Vorliegen eines Komplexbildungs-Gleichgewichts bei pH 7,4, das erst bei einem sehr großen Überschuss von PDC vollständig auf der Seite eines Komplexes definierter Zusammensetzung liegt. In der Literatur finden sich indes keine Angaben zu einer Komplexbildungskonstante. Auch bei Sanyal *et al.* wird ohne genauere Begründung ein zehnfacher Überschuss an PDC zur Eisenquantifizierung verwendet [68]. Allerdings weisen die Ergebnisse bei pH 7,4 darauf hin, dass selbst ein so großer Überschuss an PDC nicht ausreicht, um  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen vollständig zu komplexieren.

Da mit den Untersuchungen zur Komplexzusammensetzung kein eindeutiges Ergebnis

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)



**Abb. 8:** Effekt von EDTA und  $\text{H}_2\text{S}$  auf  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösungen:  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex 6 mM in TRIS-HCl-Puffer ohne Zusätze (links), nach der Zugabe einer äquimolaren Menge an EDTA (Mitte) und nach Inkubation mit gasförmigem  $\text{H}_2\text{S}$  (rechts)

erzielt werden konnte, wurde mit einem Verhältnis von  $\text{Fe}^{2+}:\text{PDC} = 1:2$  gearbeitet, um die Bildung von kristallinem  $\text{Fe}^{2+}(\text{PDC})$  sicher durch einen Überschuss des Liganden zu unterdrücken und um die Komplexbildung eines möglichst hohen Anteils an  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu gewährleisten. Noch höhere Konzentrationen an PDC wurden nicht verwendet, da sich eine hohe Ionenstärke ungünstig auf die Einschlusseffizienz auswirken kann [65]. Lösungen mit einem Konzentrationsverhältnis von  $\text{Fe}^{2+}:\text{PDC} = 1:2$  (fortan mit *Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex* bezeichnet) in TRIS-HCl-Puffer zeigten bis zu einer Konzentration von 60 mM keinerlei  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ -Niederschlag. In allen Experimenten mit dem  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex wurde eine maximale  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von 60 mM eingesetzt, da oberhalb dieser Konzentration die Bildung von roten Nadeln (kristallines  $\text{Fe}^{2+}(\text{PDC})$ ) beobachtet wurde. Die Inkubation von Lösungen des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes in TRIS-HCl-Puffer im Konzentrationsbereich von 60 mM bis unter 0,5 mM mit  $\text{H}_2\text{S}$  führte zur Bildung eines dunklen FeS-Niederschlags, der belegt, dass sich aus dem Komplexgemisch FeS ausfällen lässt (s. Abb. 8). Versetzt man Lösungen des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes hingegen mit einer äquimolaren Menge an EDTA (Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure), so wird unter gleichen Bedingungen die FeS-Fällung durch Chelatisierung der Eisenionen verhindert (s. Abb. 8, Mitte).

### 2.2.3 Experimente zur Herstellung $\text{Fe}^{2+}$ -haltiger Liposomen

$\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösungen wurden mittels zweier verschiedener Ansätze, der so genannten Reverse-Phase-Evaporation- und der Film-Hydratisierungs-Extrusions-Methode in POPC-Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 10 mM eingeschlossen. Mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) kann der mittlere hydrodynamische Radius der Liposomen in einer Vesikeldispersion bestimmt werden. Der zudem bestimmbare

Polydispersitätsindex (PDI) ist ein ungefähres Maß für die Verteilungsbreite der Vesikelgrößen und hat einen Wert zwischen 0, für einheitlich monodisperse Partikel, und 1 für polydisperse Partikel. Durch die Extrusion von Vesikeldispersionen können POPC-Liposomen mit einem PDI von unter 0,1, d.h. mit einer sehr engen Verteilungsbreite der Vesikelgrößen, hergestellt werden.

Ergänzend sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen, z.B. Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Cryo-TEM) zur Analyse der Morphologie der Vesikel, zur Verifizierung der PCS-Daten und zur Detektion von möglichen eisenhaltigen Niederschlägen erfolgen. Insbesondere die Cryo-TEM bietet die Möglichkeit, Vesikel nahezu in ihrer nativen Form wie in Lösung abzubilden. Dazu müssen die Proben rasch durch das Eintauchen in flüssiges Ethanol auf ca.  $-190^{\circ}C$  abgekühlt und dann auch bei diesen Temperaturen im Elektronenmikroskop untersucht werden, um die Eisbildung in der Probe zu verhindern. Zudem musste zur Verifizierung der Einschlusseffizienz der verschiedenen Methoden und Herstellungsbedingungen eine Methode zur Quantifizierung von intravesikulärem Eisen entwickelt werden.

Die Verwendung von Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen unter Argon-Atmosphäre bzw. in einem glove bag (deutlich reduzierte  $O_2$ -Konzentration im Vergleich zum Arbeiten an Luft) ermöglichten es, unter nahezu inerten Bedingungen mit sehr kleinen Volumina von maximal  $1000 \mu l$  pro Ansatz zu arbeiten.

### 2.2.4 Quantifizierung von intravesikulärem Eisen

Es musste zunächst eine geeignete Methode entwickelt werden, die hinreichend empfindlich für die zuverlässige Bestimmung der geringen Mengen an intravesikulärem Eisen ist. Als Reagenz für eine spektrophotometrische Bestimmung von  $Fe^{2+}$ -Ionen ist 1,10-Phenanthrolin (phen) geeignet, welches mit  $Fe^{2+}$ -Ionen im Bereich von pH 2 - 9 das stabile Komplexion  $Fe(phen)_3^{2+}$  bildet. Dieses weist im Absorptionsmaximum von  $\lambda_{max} = 508 \text{ nm}$  einen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 11100 \frac{l}{mol \cdot cm}$  auf.

Um nun den  $Fe^{2+}$ -Gehalt in aufgereinigten,  $Fe^{2+}$ -haltigen Liposomen bestimmen zu können, müssen die eingeschlossenen  $Fe^{2+}$ -Ionen zunächst freigesetzt werden. Ein Standardreagenz zum Auflösen von Liposomen ist das sogenannte TRITON X 100 (Struktur s. Abb. 9), ein Detergenz, das mit Phospholipiden Micellen bildet. Nach dem Zusatz eines Überschusses an TRITON X 100 zu der Liposomendispersion kann der Gehalt der in der micellären Lösung zugänglichen  $Fe^{2+}$ -Ionen bestimmt werden. Ein ähnliches

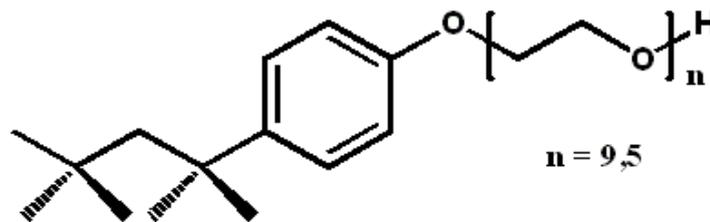


Abb. 9: Struktur von TRITON X 100

Vorgehen lässt sich auch in einer Publikation zur Eisenbestimmung in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -haltigen Liposomen finden [14]. Bei dieser Methode wird zudem noch Hydroxylamin-Hydrochlorid als Reduktionsmittel zum Unterdrücken der Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zugesetzt. Da sich bei der UV/Vis-spektroskopischen Untersuchung das Vorliegen der Micellen aus POPC und TRITON X 100 als störend erwies, kam die Standard-Additions-Methode (zur Bestimmung von Analyten in Proben mit stark störender Matrix) zum Einsatz (s.S. 162).

### 2.2.5 $\text{Fe}^{2+}$ -haltige Liposomen mittels Reverse-Phase-Evaporation (RVE)

#### Prinzip der RVE-Methode

Mit der RVE-Methode ist es möglich, unter bestimmten Bedingungen (geeignete Lipidzusammensetzung, niedrige Ionenstärke) wasserlösliche Substanzen mit vergleichsweise hoher Effizienz von bis zu über 50 % im Inneren von Liposomen einzuschließen [65,73]. Zunächst wird dabei das Phospholipid in einem organischen Lösungsmittelgemisch (meist Diethylether mit  $\text{CHCl}_3$  bzw.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zur Erhöhung der Löslichkeit) gelöst und anschließend mit einer wässrigen Pufferlösung mit der einzuschließenden, wasserlöslichen Substanz versetzt. Nach intensivem Mischen wird eine opaleszierende Emulsion erhalten, aus der das organische Lösungsmittelgemisch nun langsam abdestilliert wird, bis sich schließlich ein viskoses Gel bildet. Dieses kann durch intensives Schütteln gebrochen werden, wobei sich eine Liposomendispersion bildet. Die hohe Einschlusseffizienz der Methode rührt daher, dass in der erzeugten Wasser-in-Öl-Emulsion die wässrigen Tröpfchen im Innern von inversen Micellen schon durch die Phospholipide „vorkoordiniert“ vorliegen (Abb. 10a) [73]. Beim Kollaps des erzeugten Gels setzt ein Teil der inversen Micellen die eingeschlossene Lösung frei. Die dabei freigesetzten Lipidmoleküle tragen zur Ausbildung von vollständigen Doppelschichten um die noch vorhandenen inversen Micellen bei [73]. Inverse Micellen werden somit in Vesikel umgewandelt (s. Abb. 10c,d).

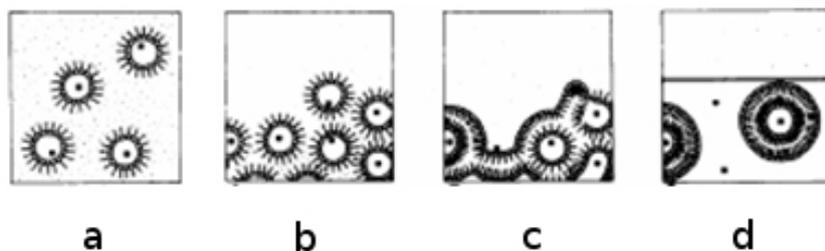


Abb. 10: Prinzip der Reverse-Phase-Evaporation (aus [73])

### Durchführung

Aus der unter inerten Bedingungen präparierten Emulsion wurde am mit Argon gespülten Rotationsverdampfer das organische Lösungsmittelgemisch bei vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Gel konnte durch intensive Behandlung mittels Vortexer gebrochen werden, wobei sich eine Vesikeldispersion bildete (s. S. 160). PCS-Untersuchungen ergaben, dass in der erhaltenen Dispersion die Vesikelgrößen eine große Verteilungsbreite aufwiesen. Für die Studien zur Einschlusseffizienz wurde in einigen Experimenten die erhaltene Liposomendispersion extrudiert, um eine einheitliche Liposomen-Größe mit einer engen Verteilungsbreite zu gewährleisten. Zur Aufreinigung wurde üblicherweise eine Dialyse durchgeführt, um die Liposomendispersion nicht zu verdünnen. Die erhaltenen Liposomendispersionen wurden mittels PCS charakterisiert sowie der Eisengehalt mit einer spektrophotometrischen Methode unter Verwendung von 1,10-Phenanthrolin bestimmt (s.S. 162).

### Eigenschaften von $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen RVE-Liposomen

Die mittels RVE-Methode hergestellten Liposomendispersionen wiesen schon nach einem Tag größere Aggregate auf, die sich allerdings wieder redispergieren ließen. PCS-Untersuchungen zeigten, dass sich in einem typischen RVE-Ansatz Liposomen mit einer mittleren Größe von 200 - 300 nm sowie einem PDI von 0,3 - 0,5 bildeten. Solch große Verteilungsbreiten der Vesikelgrößen können sich nachteilig auf die Stabilität von Liposomendispersionen auswirken, da dadurch eine große Variation in der Oberflächenspannung der einzelnen Vesikel gegeben ist, was die Fusions- bzw. Aggregationstendenz fördert. In extrudierten, monodispersen Liposomenpopulationen hingegen weisen die einzelnen Vesikel nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenspannung auf, was die Fusionsneigung deutlich verringert.

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

Cryo-TEM-Untersuchungen von an Luft mehrere Tage gelagerten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen RVE-Liposomen (s. Kapitel 2.4.2) zeigten, dass sich überwiegend unilamellare Vesikel mit Größen von 50 - 400 nm gebildet hatten. Der Anteil oligolamellarer Vesikel betrug lediglich ca. 10 %. Auffällig war die große Verteilungsbreite der Vesikelgrößen, was in Übereinstimmung mit den PCS-Daten ist und auf die in diesem Fall nicht erfolgte Extrusion zurückgeführt werden kann.

### Einschlusseffizienz von $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen RVE-Liposomen

Die Einschlusseffizienz kann mittels verschiedener Ansätze ermittelt werden. Zum einen kann eine theoretische Einschlusseffizienz (EE) direkt unter Verwendung der Lipidkonzentration und des hydrodynamischen Durchmessers sowie der Packungsparameter des POPC berechnet werden [74]. Allerdings bildet diese theoretische EE nur den Anteil des im Inneren von Vesikeln eingeschlossenen Volumens am Gesamtvolumen der Vesikeldispersion ab. Somit entspricht die theoretische Einschlusseffizienz nur dann der tatsächlichen EE, wenn die eingeschlossene Substanz wie z.B. Glucose nicht mit der Lipidmembran wechselwirkt [75]. Für Substanzen wie  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , die mit der Lipidmembran wechselwirken, kann die tatsächliche EE von der theoretisch berechneten abweichen [75]. In diesem Fall muss zusätzlich zur Berechnung des eingeschlossenen (internen) Volumens der Gesamtgehalt der eingeschlossenen Substanz nach der Aufreinigung ermittelt werden. Da für  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bekannt ist, dass sie aufgrund von Wechselwirkungen mit Phospholipidmembranen deren Packungsstruktur verändern [64], musste hier die modifizierte Variante zur Bestimmung der EE verwendet werden.

Zunächst kann das interne Volumen  $V_{intern}$  schrittweise aus den erforderlichen Parametern Z-Average, der den mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Vesikelpopulation angibt, sowie den Packungsparametern des POPC in der Liposomenmembran, d.h. die Länge des POPC-Moleküls und die Fläche der Kopfgruppe, berechnet werden. Im Anhang (Seite 182) ist eine Tabelle zur Berechnung des internen Volumens in Abhängigkeit vom Vesikeldurchmesser aufgeführt.

Zur Ermittlung der tatsächlichen EE von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in RVE-Liposomen unter verschiedenen Bedingungen wurde von den hergestellten Liposomendispersionen nach der Aufreinigung spektrophotometrisch der  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt  $c_{disp}(\text{Fe}^{2+})$  sowie in PCS-Messungen die mittlere Vesikelgröße (Z-Average) bestimmt. Mithilfe des Z-Average kann das interne Volumen  $V_{intern}$  ermittelt werden (s. Seite 182). Schließlich wird unter Verwen-

**Tab. 1:** Einschlusseffizienz ( $\text{EE} = \frac{c_{intern}(\text{Fe}^{2+})}{c_0(\text{Fe}^{2+})}$ ) verschiedener Ansätze der RVE-Methode in Abhängigkeit von pH-Wert und mittlerer Vesikelgröße (Z-Average) für dialysierte 10 mM POPC-Liposomendispersionen in 100 mM TRIS-HCl bzw. Acetatpuffer;  $c_0(\text{Fe}^{2+})$  -  $\text{Fe}^{2+}$ -Startkonzentration;  $V_{intern}$  - internes Volumen;  $c_{disp}(\text{Fe}^{2+})$  -  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration in der Liposomendispersion und  $c_{intern}(\text{Fe}^{2+})$  - intravesikuläre  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration

| pH  | $c_0(\text{Fe}^{2+})$<br>(mM) | Z-Average<br>(nm) | $V_{intern}$<br>( $\mu\text{l}$ ) | $c_{disp}(\text{Fe}^{2+})$<br>(mM) | $c_{intern}(\text{Fe}^{2+})$<br>(mM) | Einschlusseffizienz (%) |
|-----|-------------------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 7,4 | 60                            | 148,2             | 36,7                              | 2,53                               | 52,4                                 | 87,3                    |
| 7,4 | 60                            | 173,0             | 43,5                              | 2,39                               | 41,8                                 | 69,6                    |
| 7,4 | 30                            | 206,4             | 52,7                              | 0,97                               | 13,9                                 | 46,5                    |
| 5   | 30                            | 157,0             | 39,1                              | 1,07                               | 20,8                                 | 69,4                    |
| 5   | 30                            | 180,7             | 45,6                              | 1,65                               | 27,5                                 | 91,7                    |

dung des Gesamtvolumens der Dispersion  $V_{disp}$  die mittlere interne  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration  $c_{intern}(\text{Fe}^{2+})$  erhalten:

$$c_{intern}(\text{Fe}^{2+}) = \frac{V_{disp}}{V_{intern}} \cdot c_{disp}(\text{Fe}^{2+})$$

Die tatsächliche EE gibt an, wie hoch die mittlere intravesikuläre  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration  $c_{intern}(\text{Fe}^{2+})$  im Vergleich zur  $\text{Fe}^{2+}$ -Startkonzentration  $c_0(\text{Fe}^{2+})$  ist.

Es wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf die tatsächliche EE von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in RVE-Liposomen untersucht (s. Tabelle 1). Hierbei sind in der Tabelle 1 nur Ansätze berücksichtigt, die vor der Aufreinigung extrudiert wurden, um eine definierte, enge Vesikelgrößenverteilung zu erzielen. Mit der RVE-Methode konnten generell sehr hohe Einschlusseffizienzen von meist deutlich über 50% erzielt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturangaben [65, 73]. Da nur mit einer maximal 60 mM Lösung des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes gearbeitet werden kann, ist eine hohe EE im Hinblick auf die geplante Ausfällung von FeS eminent wichtig.

Es ist erkennbar, dass sowohl die mittlere Vesikelgröße als auch der pH-Wert einen Einfluss auf die Einschlusseffizienz hat. Mit der RVE hergestellte unextrudierte Liposomen weisen mittlere Vesikelgrößen von 300 - 400 nm mit einer großen Verteilungsbreite auf. Es ist bekannt, dass sich bei der RVE große sowohl uni- als auch oligolamellare Vesikel bilden [73]. Extrudiert man nun größere oligolamellare Vesikel, so bildet sich eine größere

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

Anzahl kleiner, unilamellarer Vesikel. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Einschlusseffizienz bei pH 7,4 mit kleiner werdendem Z-Average. Generell nimmt bei der Extrusion von großen unilamellaren Vesikeln die EE ab, da in den erzeugten kleinen unilamellaren Vesikeln bei gleicher Gesamtoberfläche (Anzahl der POPC-Moleküle) ein kleineres Volumen eingeschlossen wird. Gleichwohl ist die Anzahl der Analysen zu gering, um einen zufälligen Trend vor dem Hintergrund der moderaten Reproduzierbarkeit der RVE mit Sicherheit auszuschließen.

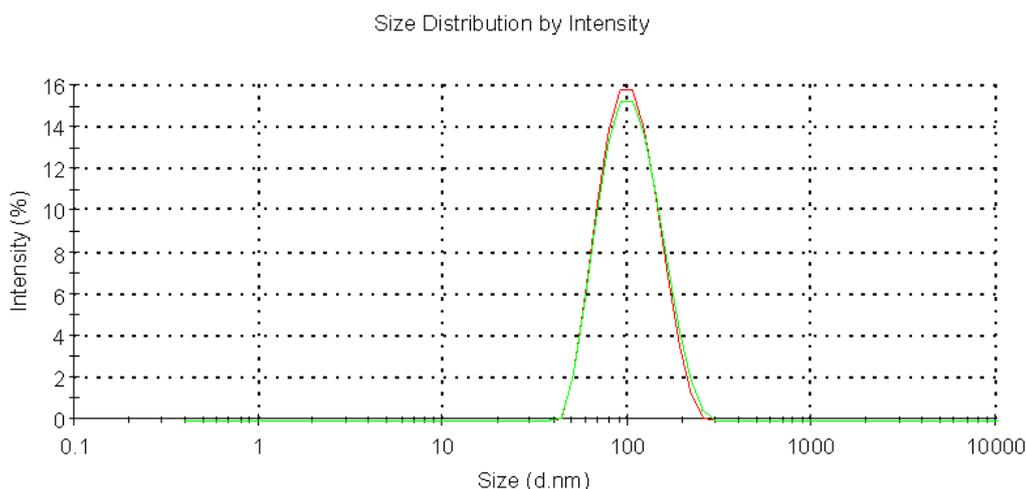
In Vergleichsexperimenten wurde untersucht, inwiefern sich das Absenken des pH-Werts auf die Einschussrate des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes auswirkt. Dabei konnte nur mit einer 30 mM Lösung des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes gearbeitet werden, da sich bei höheren Konzentration kein Gel bildete. Es ist zu erkennen, dass in Acetat-gepufferten Lösungen (pH = 5) höhere Einschlusseffizienzen als in TRIS-HCl-Puffer realisierbar waren. Dies kann u.U. am Einsatz von Acetatpuffer liegen, da Acetat ein schwacher Ligand für  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ist. Der Einsatz eines schwach komplexierenden Puffers kann zur effektiveren Abschirmung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und zugleich zur Stabilisierung von POPC-Liposomen in deren Gegenwart führen [65].

Die RVE-Methode weist generell eine mäßige Reproduzierbarkeit aufgrund der schwer kontrollierbaren Gelbildung auf. Zudem zeigten die mit RVE hergestellten Liposomendispersionen schon nach einem Tag erste Aggregationen. Als Voraussetzung für die Herstellung stabiler FeS-haltiger Liposomen sollten auch die dafür notwendigen  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomen stabil sein. Darum wurde ergänzend zu der RVE-Methode auch die Eignung der Filmhydratisierungs-Extrusionsmethode zur Herstellung stabiler  $\text{Fe}^{2+}$ -haltiger Liposomen untersucht.

### 2.2.6 $\text{Fe}^{2+}$ -haltige Liposomen mittels Filmhydratisierung-Extrusion (FHE)

Diese Standardmethode zur Herstellung von Liposomen wurde ebenfalls verwendet, da man die einzelnen Schritte der Herstellung und Aufreinigung von Liposomen prinzipiell unter inerten Bedingungen durchführen kann. Mit dieser Methode sind EE von bis zu 10%, also deutlich niedriger als mit der RVE, zu erwarten [8].

Eine ausführliche Beschreibung der Durchführung ist auf Seite 159 zu finden. Die wichtigsten Schritte beinhalten zunächst das Überführen einer definierten Menge einer POPC-Stammlösung in  $\text{CHCl}_3$  in einen 100 ml Einhalskolben. Nach Verdünnen mit etwas  $\text{CHCl}_3$  wird dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck voll-



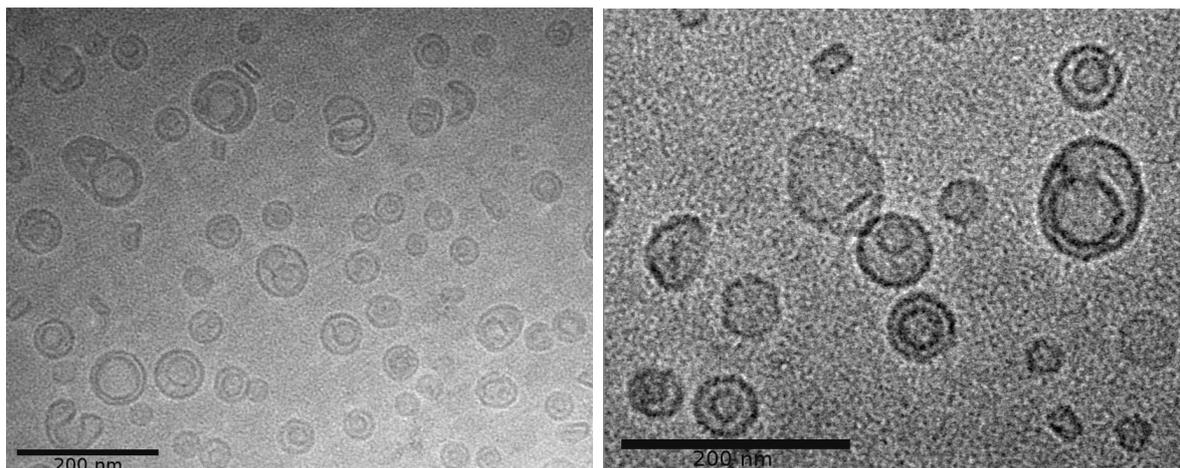
**Abb. 11:** Verfolgung der zeitlichen Stabilität von mittels FHE hergestellten und mittels GPC aufgereinigten POPC-Liposomen mit  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex mit PCS (Ergebnis-Ausdruck) zum Herstellungszeitpunkt (roter Graph; Z-Average: 97,0 nm mit  $\text{PDI} = 0,100$ ) und nach 7 Tagen (grüner Graph; Z-Average: 97,7 nm mit  $\text{PDI} = 0,121$ ); Abszisse: logarithmische Darstellung der mittleren Vesikelgröße (in nm) und Ordinate: Intensität (in %)

ständig entfernt, bis ein dünner Film des Phospholipids an der Kolbenwand zurückbleibt. Auf diesen Film wird eine  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung gegeben und der Kolben intensiv geschüttelt, wobei sich Liposomen bilden. Die erzeugte Liposomendispersion weist dabei üblicherweise eine große Verteilungsbreite der Vesikelgrößen auf. Mittels Extrusion durch eine Polycarbonatfiltermembran mit definierter Porengröße können unilamellare Liposomen mit einer fast einheitlichen Größe (z.B. 100 nm) erzeugt werden. Mittels PCS kann zudem die zeitliche Veränderung des PDI der erhaltenen Dispersion als Indikator für die Stabilität der Liposomendispersion ermittelt werden (s. Abb. 11). Zur Abtrennung von extravikulären  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen muss noch eine Aufreinigung durch Dialyse oder GPC erfolgen. Hierbei wurde eine Dialyse bevorzugt, da so eine Verdünnung der Liposomendispersion vermieden werden kann.

### Eigenschaften von $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen FHE-Liposomen

Cryo-TEM-Aufnahmen von extrudierten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomen zeigen, dass sich überwiegend oligolamellare Vesikel, meist 2 Vesikel ineinander, sowie irreguläre Strukturen gebildet haben (s. Abb. 12). Zudem ist auf Abb. 12b zu erkennen, dass die Membra-

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)



**Abb. 12:** Cryo-TEM-Aufnahmen von extrudierten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Liposomen, die mittels FHE hergestellt wurden; links (a): hoher Anteil an oligolamellaren Liposomen und rechts (b): viele Liposomen weisen keine regelmäßig sphärischen Membranen auf

nen einiger Vesikel nicht mehr sphärisch sind. Diese Membranstörungen könnten durch Wechselwirkungen zwischen dem eingesetzten  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex und der zwitterionischen Kopfgruppe des POPC verursacht sein.

Dennoch zeigten PCS-Studien von extrudierten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomendispersionen, dass solche Dispersionen mehr als 7 Tage ohne nennenswerte Veränderung (Aggregationen) stabil sind (s. Abb. 11). Auch visuell konnten in diesem Zeitraum keine Aggregate beobachtet werden.

### Einschlusseffizienz von $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen FHE-Liposomen

Analog zu den RVE-Liposomen wurden auch die mittels FHE hergestellten Liposomen hinsichtlich der mittleren Vesikelgröße und der Verteilungsbreite mittels PCS untersucht. Zudem erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der RVE die Quantifizierung von intravesikulären  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen nach der Aufreinigung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die EE der FHE-Methode ist wie erwartet generell deutlich niedriger als die der RVE. Trotzdem liegt die EE bei zwei Ansätzen deutlich über dem Literaturwert von ca. 10% [76]. Womöglich spielt hierbei eine anziehende Wechselwirkung des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes bzw. freier  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mit der POPC-Liposomenmembran eine Rolle, die zu einem erhöhten Anteil an vesikulär gebundenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen führt. Die Zunahme der EE bei auf

**Tab. 2:** Einschlusseffizienz ( $EE = \frac{c_{intern}(Fe^{2+})}{c_0(Fe^{2+})}$ ) verschiedener Ansätze der Filmhydratisierungsmethode in Abhängigkeit von der mittleren Vesikelgröße für dialysierte 10 mM POPC-Liposomendispersionen in 100 mM TRIS;  $c_0(Fe^{2+})$  -  $Fe^{2+}$ -Startkonzentration;  $V_{intern}$  - internes Volumen;  $c_{disp}(Fe^{2+})$  -  $Fe^{2+}$ -Konzentration in der Liposomendispersion und  $c_{intern}(Fe^{2+})$  - intravesikuläre  $Fe^{2+}$ -Konzentration

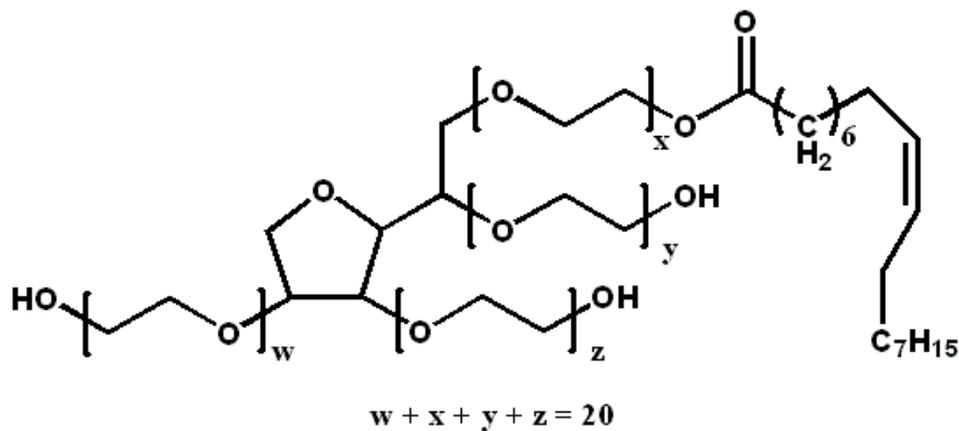
| pH  | $c_0(Fe^{2+})$<br>(mM) | Z-Average<br>(nm) | $V_{intern}$<br>( $\mu$ l) | $c_{disp}(Fe^{2+})$<br>(mM) | $c_{intern}(Fe^{2+})$<br>(mM) | Einschluss-<br>effizienz (%) |
|-----|------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 7,4 | 60                     | 336,2             | 88,3                       | 0,699                       | 6,02                          | 10,0                         |
| 7,4 | 60                     | 209,4             | 53,5                       | 0,794                       | 11,28                         | 18,8                         |
| 7,4 | 30                     | 98,2              | 23,0                       | 0,240                       | 7,95                          | 26,5                         |

kleinere Z-Averages extrudierten Liposomendispersionen kann analog zur RVE-Methode erklärt werden: Durch die vermehrte Erzeugung von kleinen, unilamellaren Vesikeln aus zuvor oligolamellaren Vesikeln im Verlauf der Extrusion steigt die EE. Tatsächlich weisen mittels FHE hergestellte  $Fe^{2+}$ -PDC-Komplex-haltige Liposomendispersionen einen hohen Anteil an oligolamellaren Vesikeln auf (s. Abb. 12a).

### 2.2.7 Diskussion - Einschluss von $Fe^{2+}$ -Ionen in Liposomen

Die beiden untersuchten Methoden der FHE und der RVE erwiesen sich als geeignet, um  $Fe^{2+}$ -Ionen unter inerten Bedingungen in POPC-Liposomen einzuschließen. Mit der RVE ließen sich dabei deutlich höhere EE realisieren. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen von Xia *et al.* [65] zeigt, dass einige Trends bestätigt werden konnten. Xia *et al.* [65] studierten den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Einschluss von  $FeSO_4$  in Liposomen, verwendeten allerdings liposomale Formulierungen mit Anteilen von je 10 % Cholesterol und dem Tensid *Tween 80* (Struktur s. Abb. 13). Gleichwohl wurden auch in diesen Untersuchungen die höchsten Einschlusseffizienzen mit der RVE erzielt. Überdies wurde in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen auch bei Xia *et al.* [65] festgestellt, dass die EE stark vom verwendeten Puffersystem (vgl. Tab. 1) und von der eingesetzten  $Fe^{2+}$ -Konzentration (vgl. Tab. 2) abhängig ist.

Keine Angaben finden sich indes über eine begrenzte zeitliche Stabilität der untersuchten Liposomendispersionen in [65]. Allerdings zeigten die ohne weitere Zusätze mittels RVE erzeugten POPC-Liposomendispersionen eine geringere zeitliche Stabilität. Die Stabilität könnte womöglich durch den Zusatz von membranstabilisierenden Sub-



**Abb. 13:** Struktur von Tween 80 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat)

stanzen wie Cholesterol verbessert werden. Die mäßige Stabilität von RVE-Liposomen und deren hohe Einschlusseffizienz lassen sich mit der großen Verteilungsbreite der Vesikelgrößen in den RVE-Liposomendispersionen erklären. Dieser Umstand fördert die Fusions- und Aggregationstendenz von unterschiedlich großen Liposomen. Ein erstaunliches Ergebnis der Cryo-TEM-Untersuchungen war, dass sich im Fall der FHE fast ausschließlich oligolamellare Vesikel bildeten. Im Gegensatz dazu wiesen  $\text{Fe}^{2+}$ -haltige RVE-Liposomendispersionen einen sehr hohen Anteil an unilamellaren Vesikeln auf. Auch dieser Befund kann die höhere Einschlusseffizienz von RVE-Liposomen mit erklären. In den weiterführenden Experimenten zur Generierung von intravesikulärem FeS wurden aus Stabilitätsgründen nur FHE-Liposomen untersucht.

## 2.3 Fällung von FeS in Liposomen

### 2.3.1 Herstellung FeS-haltiger Liposomen

Zunächst erfolgte die Präparation von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Liposomendispersionen mit einer Startkonzentration von 60 mM. Zur Fällung von intravesikulärem FeS wurden diese Dispersionen mit  $\text{H}_2\text{S}$  oder NaHS als Fällungsreagenz behandelt. Es wird angenommen, dass  $\text{H}_2\text{S}$  das maßgebliche Fällungsreagenz zur Herstellung von intravesikulären Metallsulfiden ist [20], da es als ungeladenes Molekül besonders rasch durch eine Phospholipidmembran diffundieren kann [77]. Dabei ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der intravesikulären Fällungsreaktion nicht die Permeation von  $\text{H}_2\text{S}$  durch die Vesikelmembran, sondern komplexere, bislang nicht bekannte Wechselwirkungen im Vesikelinneren [18]. Geladene Sulfidspezies wie  $\text{HS}^-$ -Ionen sollten hingegen nur sehr langsam durch die Membran wandern. Somit ist zur Inkubation mit sulfidischen Spezies auch der extravesikuläre pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Der  $\text{pK}_{\text{S}1}$ -Wert von  $\text{H}_2\text{S}$ , der bei 6,9 liegt, impliziert eine Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  bei  $\text{pH} \leq 7$ . Da es sich als sehr schwierig erwies, die geringen Volumina der erhaltenen Liposomendispersionen von  $V < 800 \mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{S}$  zu begasen, wurden zudem mit  $\text{H}_2\text{S}$  gesättigte Lösungen sowie NaHS-Lösungen auf ihre Eignung zur Generierung von intravesikulärem FeS hin untersucht.

Unabhängig von der Aufreinigungsmethode verfärbten sich  $\text{Fe}^{2+}$ -haltige Liposomendispersionen bei der Inkubation mit einer 5 -10 mM NaHS-Lösung in TRIS-HCl-Puffer grau. Diese Verfärbung der durch den  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex rosa gefärbten Lösung nach grau trat innerhalb von einer Minute nach dem Mischen der beiden Lösungen auf und war für einige Stunden stabil. Gleichwohl verschwand die dunkle Verfärbung der inkubierten Dispersion während der Lagerung über Nacht. Sowohl bei Lagerung an Luft als auch unter Argonatmosphäre wurde nach 15 Stunden wieder eine rosa gefärbte Dispersion erhalten. Eine wiederholte Inkubation einer solchen Dispersion mit NaHS-Lösung bewirkte erneut eine dunkle Verfärbung. So behandelte Dispersionen zeigten eine starke Tendenz zur Bildung größerer, sich absetzender Aggregate. Bei Einsatz einer höherkonzentrierten, 30 mM NaHS-Lösung konnte die dunkle Verfärbung länger beobachtet werden. Indes setzten sich auch in diesem Fall dunkle Aggregate ab, während die überstehende Lösung rötlich gefärbt war.

Bei der Inkubation mit 2,5 - 5 mM  $\text{H}_2\text{S}$  in TRIS-HCl-Puffer verfärbten sich  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltige Liposomendispersionen erst nach mehreren Minuten deutlich grau. Auch

hier nahm die Intensität der Verfärbung innerhalb von 15 Stunden bei Lagerung unter Argon deutlich ab.

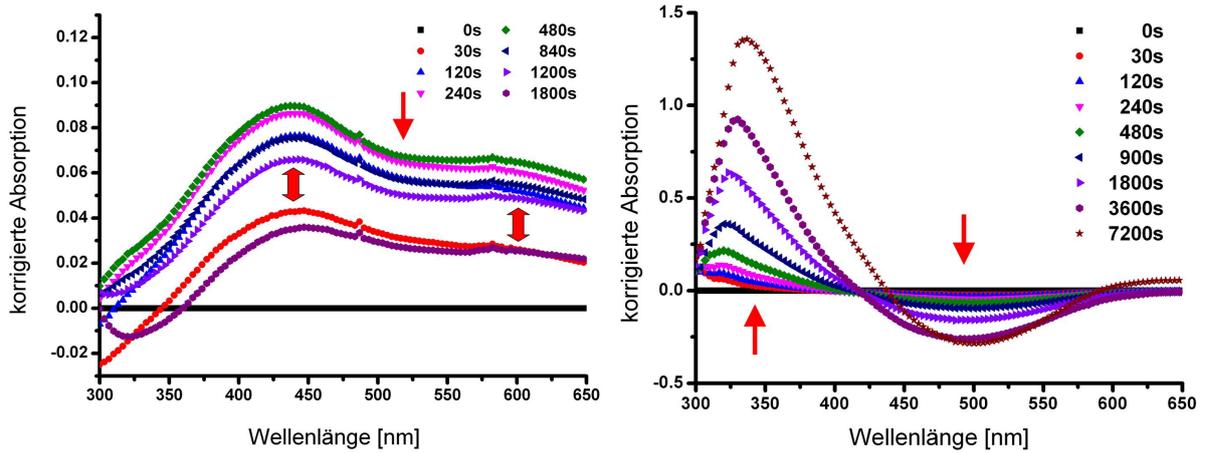
### 2.3.2 Untersuchungen zur FeS-Fällung in Liposomen

#### UV/Vis-Untersuchungen zur intravesikulären FeS-Fällung

Zur Verfolgung der Inkubation von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomendispersionen mit  $\text{H}_2\text{S}$  wurden UV/Vis-Untersuchungen über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten durchgeführt. Mittels UV/Vis-Spektroskopie sollte zum einen die Abnahme der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes (s. Abb. 6a, S. 18) durch Ausfällung von FeS und zum anderen die potenzielle Zunahme der Streuintensität in der Probe durch die Bildung von FeS-NP verfolgt werden. Da bereits die Liposomendispersion einfallendes Licht stark streut und somit sonstige Absorptions- bzw. Streuvorgänge überlagert werden, wurde von den aufgenommenen UV/Vis-Spektren das Spektrum zum Startzeitpunkt ( $t_0 = 0$  s) subtrahiert. Die zeitliche Veränderung der erhaltenen korrigierten Absorptionen ist in Abb. 14a dargestellt. Zusätzlich wurden in einem Kontrollexperiment „leere“, in TRIS-HCl-Puffer hergestellte Liposomen extern mit  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex versetzt und ebenfalls ihr Verhalten gegenüber einer  $\text{H}_2\text{S}$ -haltigen Pufferlösung charakterisiert (Abb. 14b).

In beiden untersuchten Proben ist eine stetige Abnahme der Absorption im Bereich der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes ( $470 \text{ nm} < \lambda < 570 \text{ nm}$ ) zu beobachten. Diese Abnahme ist auf die Ausfällung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen aus dem Komplex und somit auf die Abnahme der Komplex-Konzentration zurückzuführen. Im Falle des extern zugesetzten  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes (Abb. 14b) ist dieser Prozess nach ca. 1 Stunde abgeschlossen. Zudem kann bei dieser Probe bei Wellenlängen von  $\lambda < 430 \text{ nm}$  eine starke Zunahme der Absorption bzw. Streuung beobachtet werden. Diese Veränderung wird wahrscheinlich durch die Bildung von FeS-NP oder anderen liposomalen Aggregaten verursacht.

Deutlich komplexer ist das Ergebnis für die aufgereinigten Liposomen mit eingeschlossenem  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex. Hier wird die Abnahme der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes von anderen Prozessen deutlich überlagert. Zunächst ist eine Zunahme der Absorption bzw. Streuung über den gesamten vermessenen Wellenlängenbereich zu verzeichnen (bis zum Zeitpunkt  $t = 480$  s). Zu diesem Zeitpunkt war die Probe auch visuell deutlich grau gefärbt. Bei der Untersuchung der Probe über diesen Zeitpunkt hinaus zeigte sich eine Abnahme der Absorption bzw. Streuung über den gesamten



**Abb. 14:** Verfolgung der korrigierten Absorptionsspektren (jeweils Ausgangsspektrum vom Zeitpunkt  $t_0 = 0$  s subtrahiert) von Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-haltigen Liposomendispersionen nach Inkubation mit einer 25 mM H<sub>2</sub>S-Lösung in TRIS-HCl-Puffer; links (a): mittels GPC aufgereinigte, Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-haltige Liposomen (Abschätzung: ca. 3 mM POPC-Liposomen und ca. 0,15 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex) und rechts (b): leere, 1,5 mM Liposomen mit extern zugesetztem 1 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex

vermessenen Wellenlängenbereich. Das 30 Minuten nach der Inkubation aufgenommene UV/Vis-Spektrum weist fast über den gesamten Meßbereich eine geringere Absorption bzw. Streuung als das nach 30 s aufgenommenen Spektrum auf (Abb. 14a). In der aufgereinigten Liposomenprobe scheint also ein reversibler Prozess abzulaufen, obwohl die Probe visuell unverändert grau erscheint. Lediglich die geringere Absorption im Bereich der Absorptionsbande des Fe<sup>2+</sup>-Komplexes bleibt erhalten (s. Pfeil). Bemerkenswert dabei ist, dass die zunächst beobachtete Zunahme der Absorption v.a. bei Wellenlängen von  $\lambda > 400$  nm mit einem deutlichen Maximum bei  $\lambda = 440$  nm auftritt, während dieser Effekt bei der Vergleichsprobe mit externem Fe<sup>2+</sup>-Komplex bei kleineren Wellenlängen ( $300 \text{ nm} < \lambda < 430 \text{ nm}$ ) auftritt. Dies könnte auf die Lokalisierung der FeS-Partikelbildung zurückzuführen sein. Extern gebildete, freie FeS-Partikel (Abb. 14b) streuen einfallendes Licht umso stärker, je kürzer die Wellenlänge des Lichtes ist. Hingegen können intravesikulär gebildete FeS-NP lediglich längerwelliges Licht streuen bzw. absorbieren, da die Liposomenhüllen kürzerwelliges Licht deutlich stärker streuen und vornehmlich längerwelliges Licht die Membran durchdringen kann.

### **PCS-Untersuchungen von Liposomen nach FeS-Fällung**

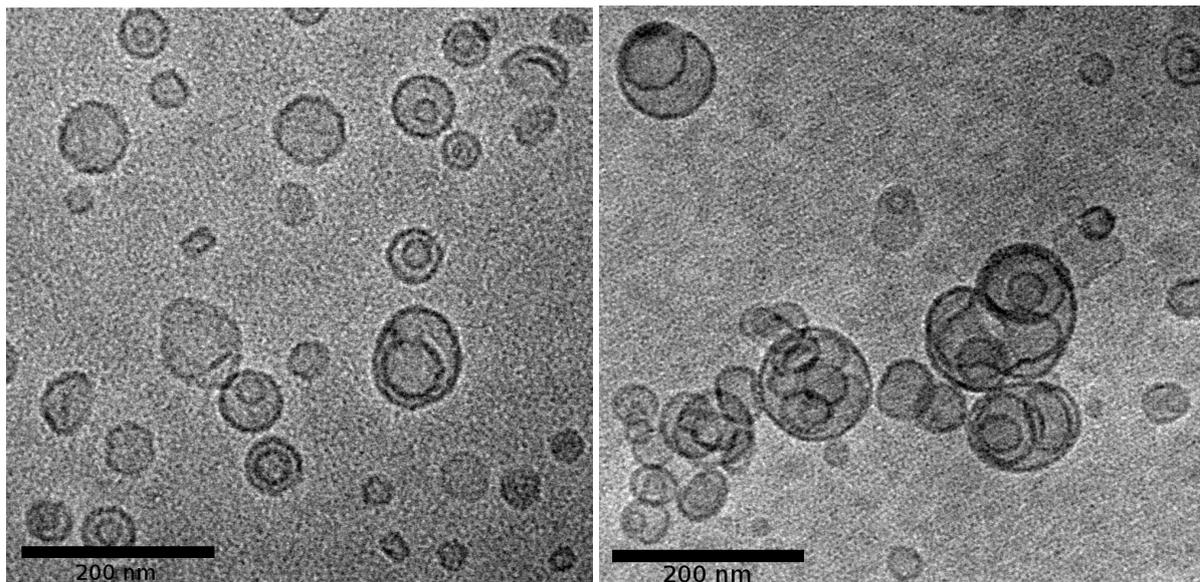
Die mit NaHS-Lösung bzw. H<sub>2</sub>S-gesättigter Pufferlösung inkubierten, grau verfärbten Liposomendispersionen wurde mittels PCS charakterisiert. Es zeigte sich, dass der Z-Average und auch der PDI der Proben vor und nach der Inkubation für mehrere Tage praktisch unverändert waren. Typische Ergebnisse bei PCS-Messungen von auf 100 nm extrudierten Liposomen waren Werte des Z-Average von 97 nm mit PDI < 0,15. Allerdings wurde jeweils nur der Überstand der Liposomendispersionen, nicht die nach einem Tag gebildeten Aggregate nach Homogenisieren der Probe, untersucht. Somit kann nur die Stabilität der Liposomen, d.h. unveränderter Z-Average und PDI, im visuell nicht verfärbten Überstand der inkubierten Liposomendispersion belegt werden.

Wie bereits erwähnt, konnte in entfärbten Liposomendispersionen durch erneute Inkubation mit NaHS-Lösung eine dunkle Verfärbung induziert werden (s. Kapitel 2.3.1). Die PCS-Untersuchung einer solchen Probe zeigte das Auftreten großer Aggregate und eine deutliche Zunahme des PDI der Liposomendispersion und deutet auf eine Instabilität der inkubierten Liposomen unter diesen Bedingungen hin.

### **Cryo-TEM-Untersuchungen von Liposomen nach FeS-Fällung**

Mithilfe der Cryo-TEM wurde untersucht, ob sich durch die Inkubation von aufgereinigten Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-haltigen Liposomendispersionen mit H<sub>2</sub>S zu einer Veränderung hinsichtlich der Vesikel-Morphologie und zum anderen hinsichtlich der Bildung von eisenhaltigen Aggregaten in Liposomen beobachten lassen. Solche Aggregate sollten aufgrund der höheren Ordnungszahl und damit Elektronendichte von Eisen einen stärkeren Kontrast als die umgebenden vesikulären Strukturen aufweisen.

Bei der Interpretation einiger Cryo-TEM-Aufnahmen störte indessen, dass sich auf vielen Aufnahmen durch die Beschaffenheit der Probe bzw. aus apparativen Gründen der Hintergrundkontrast von einer Seite der Aufnahme zur anderen kontinuierlich verändert. Dadurch erscheinen die Membranen von Liposomen bei einem dunkleren Hintergrund dunkler gefärbt als bei einem hellen Hintergrund (s. Abb. 17b). Dies ist problematisch, da bei diesen Untersuchungen nach eben solchen dunkler gefärbten Partikeln bzw. Membranen als Indiz für die Bildung von FeS-Partikeln bzw. -Schichten gesucht wurde. Aus diesem Grund wurden zur Auswertung der Untersuchungen nur solche Aufnahmen verwendet, die einen annähernd einheitlichen Hintergrund mit möglichst geringer Körnigkeit aufweisen.

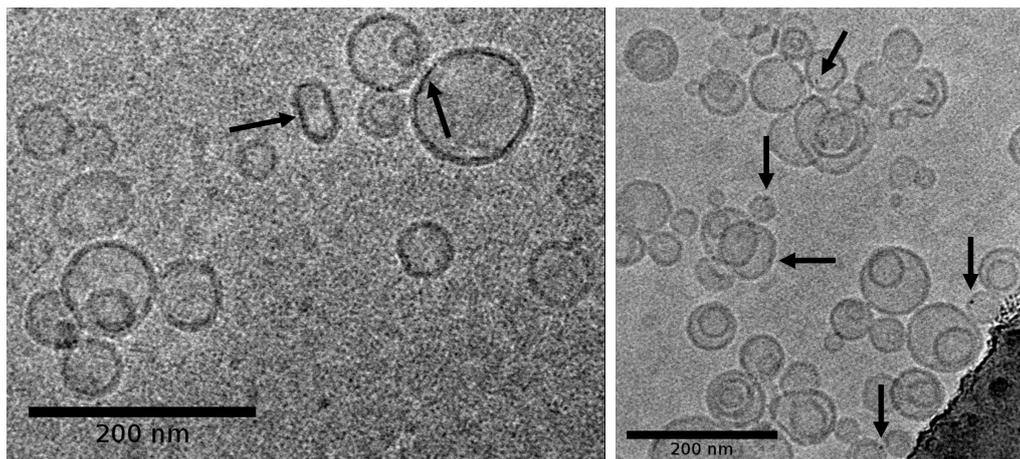


**Abb. 15:** Cryo-TEM-Aufnahmen von mittels Dialyse aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Liposomen; links (a) ohne NaHS und rechts (b) nach Inkubation mit NaHS-Lösung

Beim Vergleich von Abb. 15a und 15b fällt auf, dass bereits ein kleiner Anteil  $\text{Fe}^{2+}$ -haltiger Liposomen (insgesamt  $< 10\%$ ) dunkle Verfärbungen der Membran aufweisen, die auf die Bildung von eisenhaltigen Niederschlägen hinweisen. Rein visuell ist in diesem Fall kein deutlicher Unterschied zu der mit NaHS-Lösung inkubierten Liposomendispersion auszumachen. Im Vergleich konnten dunkle Aggregate an Liposomenmembranen hingegen deutlich häufiger und charakteristischer bei der mit NaHS-Lösung inkubierten Probe beobachtet werden.

Abbildungen 16a und 16b zeigen ebenfalls Aufnahmen von mit NaHS-Lösung inkubierten Liposomen. Deutlich sind an der Liposomenmembran gebildete, dunkle Strukturen sichtbar. Zum einen können in Abb. 16a schichtartige Ablagerungen an der Membran beobachtet werden. Solche Strukturen wurden auch vielfach bei weiteren Cryo-TEM-Aufnahmen detektiert. Allerdings tritt dieses Phänomen auch bei nicht-inkubierten Liposomen sehr vereinzelt auf (s. Abb. 15a). Somit kann nicht mit Sicherheit zwischen vor der Inkubation mit NaHS-Lösung gebildeten, vermutlichen hydroxidischen Ablagerungen und sulfidischen Ablagerungen nach der Inkubation mit NaHS-Lösung unterschieden werden. Zudem war das Erzeugen dieser Membranablagerungen in Folgeexperimenten schwierig zu reproduzieren.

In Abb. 16b erkennt man vereinzelt membranständige NP, die aufgrund ihres Kontrasts

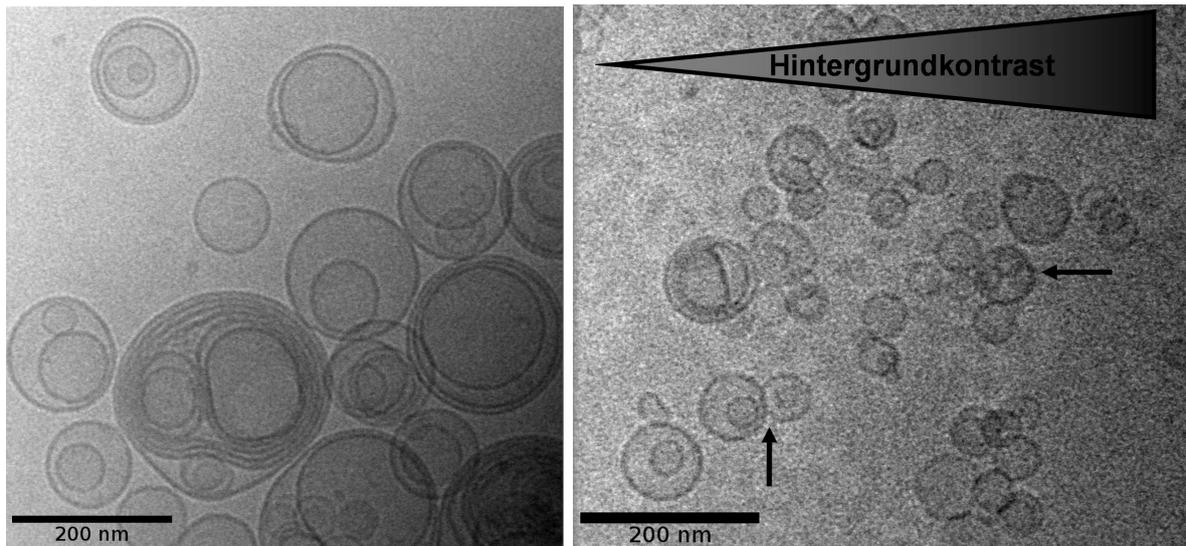


**Abb. 16:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Liposomen nach Inkubation mit NaHS-Lösung; links (a) interne Membranablagerungen und rechts (b) diskrete Partikel in wenigen Liposomen

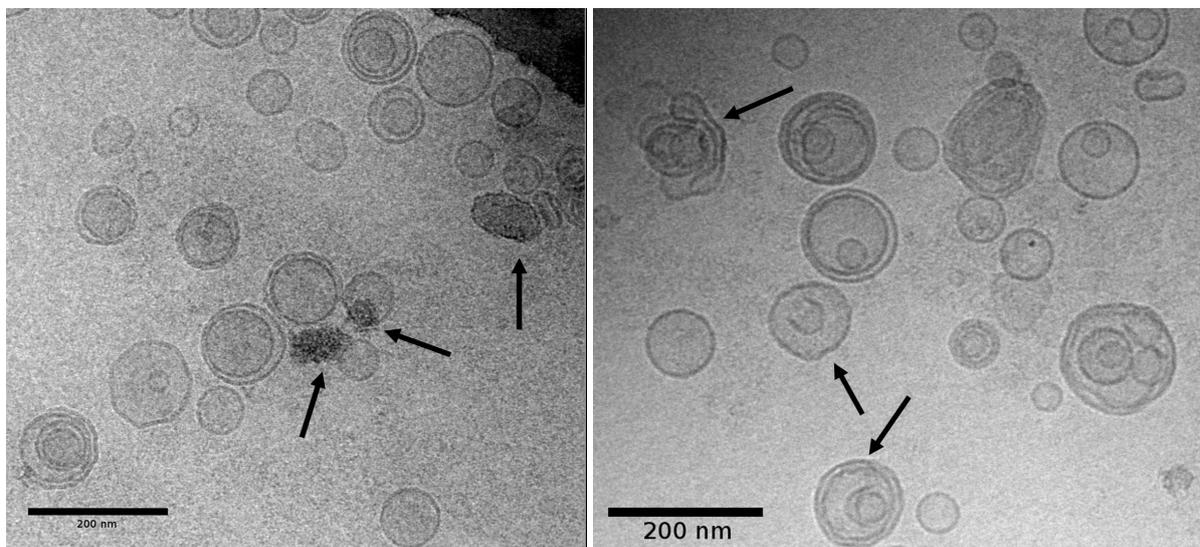
vermutlich eisenhaltig sind. Eine konkrete Aussage über die Lokalisierung dieser Partikel an der äußeren oder inneren Liposomenmembran ist leider nicht möglich. Vergleichbare Ergebnisse mit je einem Partikel pro Liposom wurden auch bei CdS-NP in Liposomen beobachtet [21]. Für die eisenhaltigen Liposomen war allerdings die Ausbildung von NP nur bei sehr wenigen Liposomen ( $<10\%$ ) zu beobachten. Charakteristischer war eher die Bildung von Schichten feingranulärer Partikel entlang der Membran.

Dennoch weisen auch viele Liposomen nach der Inkubation keinerlei dunkle Verfärbung der Membran auf. Solche Spezies waren dominierend in Folgeexperimenten, in denen hauptsächlich oligo- und multilamellare Vesikel ohne dunkle Ablagerungen auf der Membran beobachtet wurden (s. Abb. 17a).

In einem weiteren Experiment wurden aufgereinigte,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltige Liposomen extern mit einer FeS-Suspension versetzt und die Mischung ebenfalls mittels Cryo-TEM analysiert. Da bei der Probenpräparation generell größere Partikel entfernt werden, konnten in der Probe nur an wenigen Stellen überhaupt FeS-Aggregate entdeckt werden. Generell zeigen allerdings die mit der FeS-Suspension behandelten Liposomen deutliche Membranstörungen (Abb. 18, rechts), die bei unbehandelten Liposomen nicht beobachtet wurden und von Wechselwirkungen mit FeS-Partikeln herrühren könnten. Zudem wurde ebenfalls die Wechselwirkung von einzelnen Liposomen mit dunklen FeS-Aggregaten beobachtet (Abb. 18, links). Diese Ergebnisse deuten auf einen destabilisierenden Einfluss von FeS auf die POPC-Liposomenmembran. Dies deckt sich mit den rein phänomenolo-



**Abb. 17:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Liposomen nach Inkubation mit NaHS-Lösung; links (a) vor allem multilamellare Vesikel ohne dunkle Ablagerungen beobachtbar und rechts (b) Einfluss des Hintergrundkontrasts (der Körnigkeit) auf den Kontrast von Liposomenmembranen



**Abb. 18:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Liposomen nach dem Mischen mit einer 5 mM FeS-Suspension in TRIS-Puffer; deutlich sind Wechselwirkungen mit dunklen FeS-Aggregaten (links) bzw. Membranunregelmäßigkeiten (rechts) zu erkennen

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

gischen visuellen Beobachtungen (s. Kap. 2.3.1).

### 2.3.3 Diskussion - FeS in Liposomen

Die intravesikuläre Fällung von FeS in aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-haltigen Liposomen konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden. Mit dieser indirekten Methode zeigte sich, dass nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S-Lösung anfangs eine rasche Zunahme der Absorption in einem Wellenlängenbereich von 300 nm <  $\lambda$  < 650 nm, einhergehend mit einer grauen Verfärbung der rosa gefärbten Probe, auftrat. Schon nach ca. 8 Minuten wurde eine Verringerung der Absorption beobachtet. Nach ca. 30 Minuten wies die Dispersion bereits eine geringere Absorption als 30 s nach Beginn der Inkubation auf. Lediglich die Abnahme der Absorption im Bereich der Absorptionsbande des Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplexes weist auf die Ausfällung von Fe<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Komplex hin. Die beobachtete Reversibilität der Absorptionsänderung könnte durch Aggregationsprozesse verursacht sein und wäre folglich ein Indiz für eine mögliche Instabilität von Liposomen bei der intravesikulären FeS-Bildung. Bilden sich während der Inkubation mit H<sub>2</sub>S Aggregate aus Liposomen mit FeS-NP, so streuen diese weiterhin das einfallende Licht. Indes würde der Gesamtquerschnitt aller mit dem einfallenden Licht wechselwirkenden Liposomen geringer werden. Durch die geringere Anzahl an isolierten Liposomen in der Dispersion könnte wieder mehr Licht die Probe passieren und die Gesamtabsorption bzw. -streuung wieder abnehmen. Dieses Phänomen ist auch unter dem Namen „Shadow-Effekt“ bekannt [78]. Die Bildung von Aggregaten bei höheren H<sub>2</sub>S- bzw. HS<sup>-</sup>-Konzentrationen konnte eindeutig visuell belegt werden. Gleichwohl deuten die PCS-Untersuchungen darauf hin, dass sich weiterhin größen- und aggregationsstabile Liposomen in inkubierten Proben befinden. Allerdings wurde hierbei stets der Überstand der Proben untersucht, so dass keine Aussage über mögliche sedimentierten Aggregate möglich ist. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Cryo-TEM-Untersuchungen, in denen ebenfalls vorwiegend Liposomen mit einer Größe < 200 nm ohne sichtbare Aggregate beobachtet wurden.

Das zu dieser Zeit ungeklärte Phänomen der raschen Entfärbung der inkubierten Liposomendispersionen, sogar bei Lagerung unter Argon, erschwerte die Detektion möglicher intravesikulärer FeS-Partikel bzw. -Ablagerungen. Die Ausbildung von hauptsächlich Schichten feingranulärer eisenhaltiger Aggregate wurde nur vereinzelt beobachtet und war nur schwer reproduzierbar. I.d.R. war kaum ein visueller Unterschied zwischen in-

kubierter und nicht-inkubierter Probe festzustellen. Hierfür könnte die Entfärbung der inkubierten Proben, die vermutlich auf die Auflösung gebildeter FeS-Partikel zurückzuführen ist, verantwortlich sein. In späteren Experimenten mit FeS-haltigen Liposomen wurde beobachtet, dass bei der Lagerung von mit H<sub>2</sub>S inkubierten Proben unter H<sub>2</sub>S-Atmosphäre keine Entfärbung der Probe auftrat. Dies deutet auf eine Reversibilität der FeS-Fällungsreaktion hin. Dieses Phänomen wird vermutlich auch durch die geringen Mengen an intravesikulären Fe<sup>2+</sup>-Ionen mit verursacht. Bilden sich nur wenige, sehr kleine FeS-Aggregate, könnte sich diese womöglich wieder auflösen. Dies könnte mit dem Hinausdiffundieren von H<sub>2</sub>S aus dem Vesikelinneren und schließlich aus der Liposomen-dispersion während der Lagerung erklärbar sein, durch die das Fällungsgleichgewicht wieder auf die Seite freier bzw. komplexierter Fe<sup>2+</sup>-Ionen verschoben würde.

Die Bestimmung der Anzahl an Fe<sup>2+</sup>-Ionen in einem einzelnen Liposom kann durch eine einfache Berechnung erfolgen. Ein FHE-Liposom mit einem Durchmesser von 200 nm, das in einer 60 mM Lösung des Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplexes generiert wurde, weist nach der Aufreinigung eine durchschnittliche interne Fe<sup>2+</sup>-Konzentration von ca. 8,6 mM auf (s. Tab. 2, S. 29). Damit halten sich im Inneren dieses Liposoms lediglich 21700 Fe<sup>2+</sup>-Ionen auf (vgl. [55]). Bildete sich aus all diesen Fe<sup>2+</sup>-Ionen ein einziger, kubusartiger FeS-Kristall, so hätte dieser eine Kantenlänge von nur 13 nm. Da es auch möglich ist, dass sich mehrere kleine Kristallite bilden, wäre eine Detektion mittels Cryo-TEM (Auflösungsgrenze ca. 3 nm) fast unmöglich, da häufig auch der Hintergrund bei Cryo-TEM-Aufnahmen sehr körnig erscheint. Würde sich das potenziell intravesikulär gebildete FeS als eine dünne Schicht auf der Innenseite der Vesikelmembran anlagern, so wäre auch dies kaum elektronenmikroskopisch zu erfassen. Die Abschätzung der Fläche einer hypothetischen FeS-Monoschicht auf der inneren Oberfläche des oben beschriebenen Liposoms ergibt, dass die FeS-Monoschicht durchschnittlich lediglich 4,3 % der inneren Oberfläche des Liposoms bedecken würde. Je größer die Liposomen sind, desto größer würde hingegen auch der Anteil der theoretisch bedeckten inneren Oberfläche. Auch die Größe möglicher FeS-Partikel könnte mit zunehmender Vesikelgröße deutlich zunehmen, was die Detektion mittels Cryo-TEM vereinfachen würde. Die unter Verwendung mittlerer Konzentrationen vorgenommenen Abschätzungen machen deutlich, wie schwierig die Detektion der kleinen Mengen an intravesikulären FeS-Aggregaten mittels Cryo-TEM ist. Gleichwohl lässt sich visuell die FeS-Fällung belegen.

Aufgrund der beobachteten Membranstörungen von POPC-Liposomen in Gegenwart von FeS wurden Membranstabilitätsexperimente unter Verwendung des selbst-löschenden

## 2 *Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)*

Fluoreszenzfarbstoffs Carboxyfluorescein von K. Rüdell (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie) durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass POPC-Liposomen eine erhebliche Instabilität gegenüber FeS aufweisen. Dies konnte in unabhängigen Vesikelstabilitätstests bestätigt werden. Aufgrund dieser Befunde wurde eine andere amphiphile Substanzklasse auf ihre Eignung zur Herstellung von stabilen, FeS-haltigen Vesikeln hin untersucht: Statt des zwitterionischen POPC erfolgten Untersuchungen mit einem ungeladenen block-Copolymer (s. Kapitel 3).

## 2.4 Magnetische Liposomen - Magnetoliposomen

### 2.4.1 Motivation

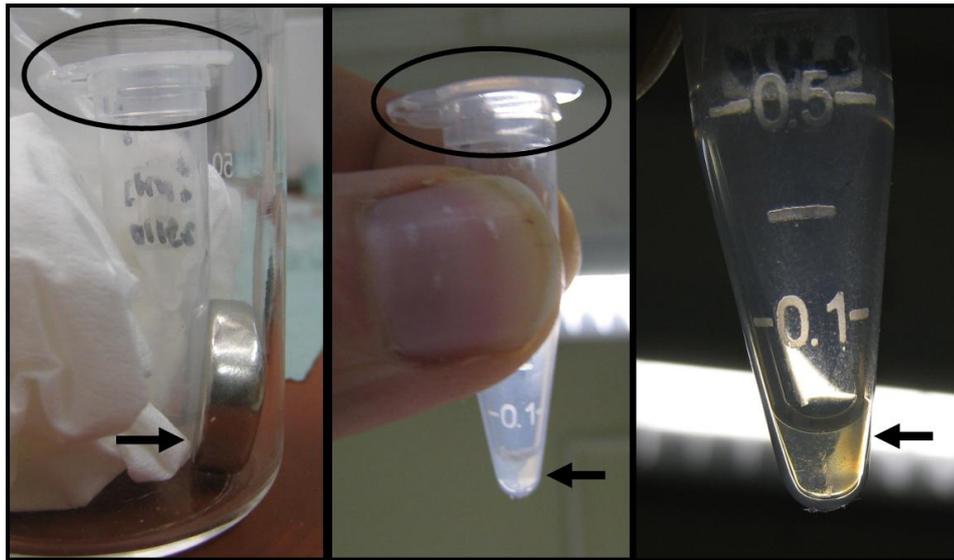
Magnetische Liposomen sind schon seit gut 20 Jahren Forschungsgegenstand aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften [79] und vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten, z.B. in der Anti-Tumor-Therapie oder als Röntgenkontrastmittel (s. Kapitel 1.1.2). Zur Herstellung von eisenhaltigen Magnetoliposomen sind zwei verschiedene Verfahren bekannt. Entweder es werden zuvor präparierte magnetische NP direkt in Liposomen eingeschlossen [57,79,80] oder in einem mehrstufigen Prozess werden zunächst  $\text{Fe}^{2+}$ - und/oder  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen in Liposomen eingeschlossen und nach der Aufreinigung durch Zugabe einer Base die intravesikuläre Bildung von magnetischen Partikeln induziert [56,60,81]. Dieser Vorgang ist durch eine gelbliche Verfärbung der Dispersion gekennzeichnet [60]. Beim Mischen einer wässrigen Lösung mit stöchiometrischen Mengen an  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen mit einer starken Base bilden sich die entsprechenden Eisenhydroxide, die sehr rasch unter Bildung von Magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  altern [80].

Die etablierten Methoden zur Generierung von  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomen (s. Kapitel 2.2) sollten als Grundlage für die Herstellung von Magnetoliposomen mit dem oben beschriebenen mehrstufigen Verfahren dienen. Zudem erfolgten Untersuchungen zum Einschluss von mit Triethylglykol (TREG) stabilisierten Magnetit-NP in Liposomen analog zu den PB-PEO-Polymersomen (vgl. Kapitel 3.5). Die Charakterisierung der hergestellten Magnetoliposomen erfolgte hinsichtlich ihrer Morphologie (Cryo-TEM), Stabilität und ihren magnetophoretischen Eigenschaften.

### 2.4.2 Liposomen mit intravesikulär generiertem Magnetit

#### Präparation

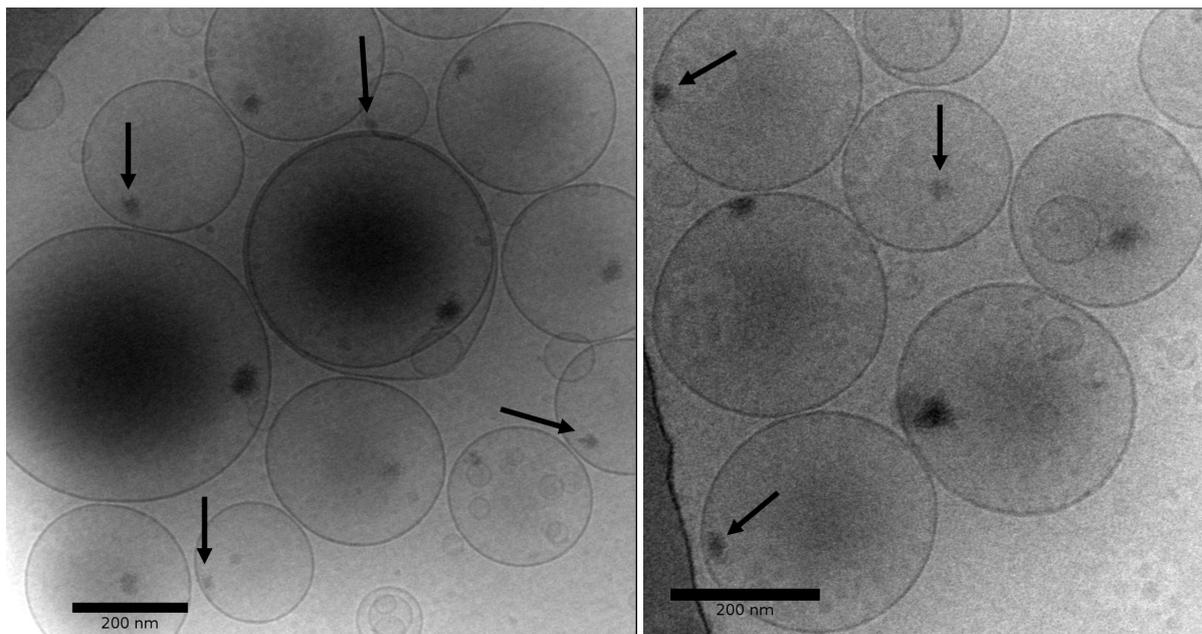
Mithilfe der RVE-Methode wurde der  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex mit einer Ausgangskonzentration von 30 mM unter anaeroben Bedingungen in 10 mM POPC-Liposomen eingeschlossen. Nach der Aufreinigung mittels Dialyse wurde die erhaltene, rosa gefärbte Liposomendispersion an Luft mit 10 V% 25 %-igem  $\text{NH}_3$  versetzt. Hierbei konnte eine gelbliche Verfärbung beobachtet werden. Die so behandelte Dispersion mit potentiell Magnetit-haltigen Liposomen wurde zur Verifizierung ihrer magnetophoretischen Eigenschaften an einem  $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ -Supermagnet unter nicht inerten Bedingungen gelagert. Dabei bildeten sich im Verlauf weniger Stunden gelbliche Aggregate in der Nähe des Supermagneten, die



**Abb. 19:** Aufnahmen von  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen RVE-Liposomen nach 24 h Lagerung an Luft an einem Supermagnet (Pfeil, linke Aufnahme); Aggregationen auf der dem Magnet zugewandten Seite (s. Ausrichtung des Eppendorf-Gefäßes bei der Lagerung am Magnet und Pfeile)

auf magnetophoretische Partikel oder Liposomen hinweisen (s. Abb. 19). Aufgereinigte Liposomendispersionen wiesen auch ohne Zusatz von  $\text{NH}_3$  bei mehrstündiger Lagerung an Luft kleine gelbliche Aggregationen in der Nähe eines Supermagneten auf. Diese könnten auf die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen durch Luftsauerstoff und die damit verbundene Ausfällung von  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  bei pH 7,4 zurückzuführen sein. Zur Klärung der beobachteten Phänomene wurden die potenziellen Einflussfaktoren bei der Bildung magnetophoretischer Liposomen - pH-Wert, Anwesenheit von Luftsauerstoff und äußeres Magnetfeld - systematisch untersucht.

In Vergleichsuntersuchungen wurde mit der FHE-Methode ebenfalls eine 30 mM Lösung des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes in 10 mM POPC-Liposomen eingeschlossen. Nach der Aufreinigung der Liposomendispersion erfolgte die Zugabe von 10 V% 25 %-igem  $\text{NH}_3$ , die allerdings zu keiner sichtbaren Farbänderung der zuvor farblosen Dispersion führte. Auch während der mehrtägigen Lagerung der mit  $\text{NH}_3$  inkubierten Liposomendispersionen an einem Supermagneten konnten keine Aggregationen beobachtet werden.

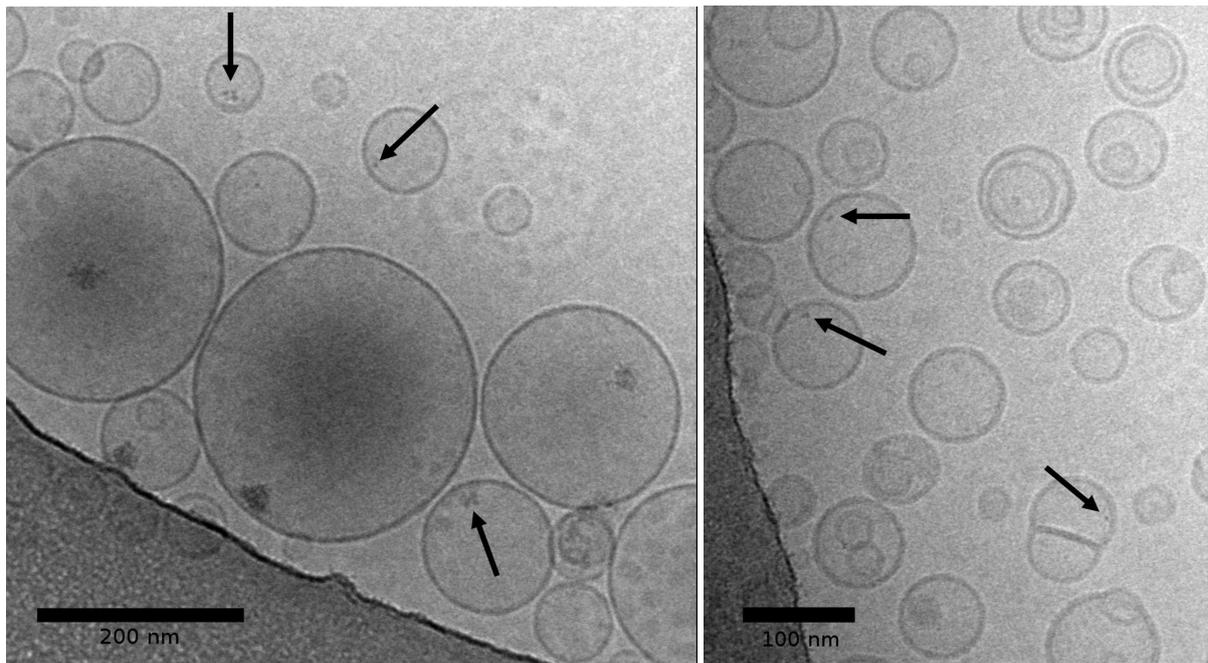


**Abb. 20:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten RVE-Liposomen nach Inkubation mit 25 %-igem  $\text{NH}_3$  und zwei Tagen Lagerung an Luft; interne Aggregate in fast allen Liposomen zu erkennen (Pfeile)

### Untersuchungen von Liposomen mit $\text{Fe}_3\text{O}_4$

In PCS-Untersuchungen erwiesen sich die hergestellten FHE- und RVE-Liposomen unabhängig von der Zugabe von  $\text{NH}_3$  als stabil. Obgleich insbesondere die RVE-Liposomen bereits nach der Herstellung einen  $\text{PDI} > 0,35$  aufwiesen, veränderten sich die PCS-Daten der inkubierten, homogenisierten Dispersionen im Verlauf von 8 Tagen nicht. Indes konnte in weiteren PCS-Untersuchungen festgestellt werden, dass sich im klaren Teil der am Supermagneten gelagerten Dispersion Vesikel mit einem kleineren Z-Average und einem kleineren PDI befanden. Nach dem Homogenisieren der Probe wurde mittels PCS wieder ein den Ausgangswerten vor der Inkubation entsprechender Z-Average und PDI detektiert. Dies deutet darauf hin, dass sich kleinere Vesikel vergleichsweise langsamer oder gar nicht gerichtet im angelegten Magnetfeld bewegen. Für die Stärke der Anziehung der Magnetoliposomen durch das angelegte Magnetfeld spielt wahrscheinlich auch die Größe intravesikulärer Magnetit-Niederschläge eine Rolle.

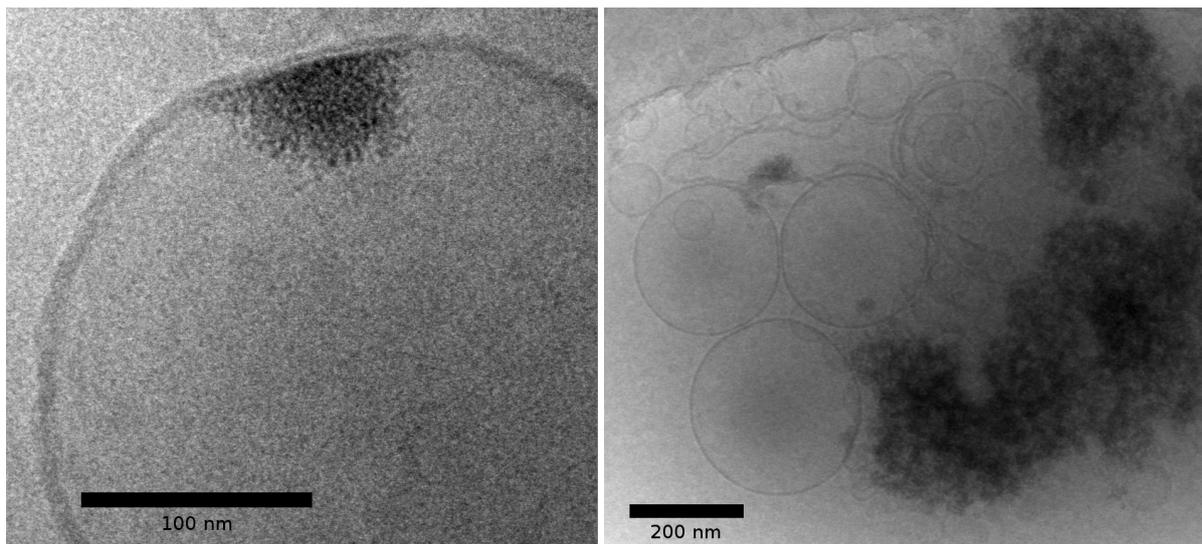
FHE-Liposomen mit einem mittleren Durchmesser von ca. 100 nm und einem PDI von ca. 0,1 wurden ebenfalls mit 25 %-igem  $\text{NH}_3$  inkubiert und anschließend an Luft gelagert. Dabei konnte keine Änderung des Z-Average über einen Zeitraum von 7 Tagen



**Abb. 21:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten RVE-Liposomen nach Inkubation mit 25 %-igem  $\text{NH}_3$  und zwei Tagen Lagerung an Luft; interne Aggregate bei Vesikeln  $< 150$  nm kaum zu erkennen (s. Pfeile)

detektiert werden. Lediglich der PDI erhöhte sich in diesem Zeitraum geringfügig, blieb jedoch stets unter einem Wert von 0,2.

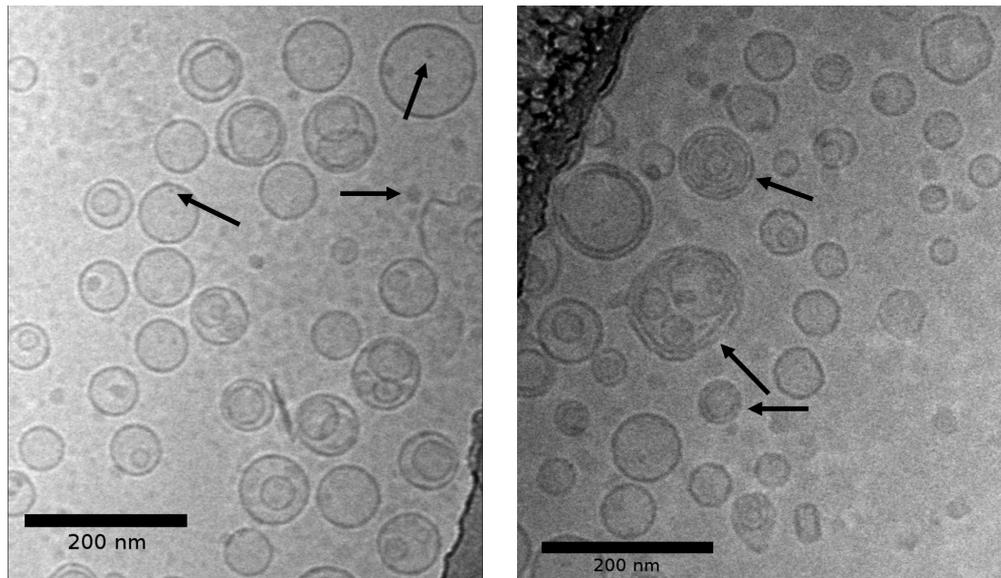
Zur Visualisierung der Morphologie der präparierten Liposomen erfolgten Cryo-TEM-Untersuchungen, bei denen ebenfalls nach intravesikulären Magnetit-Partikeln gesucht wurde. Es zeigte sich, dass RVE-Liposomen zum größten Teil unilamellar vorliegen. Mehr als 90 % der RVE-Liposomen mit einem Durchmesser über 150 nm wiesen nach der Inkubation mit  $\text{NH}_3$  kleine, eindeutig intravesikuläre Aggregate auf (s. Abb. 20). Bei kleineren RVE-Liposomen konnten interne Aggregate gar nicht oder nicht mit Sicherheit auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert werden (s. Abb. 21). RVE-Liposomen mit Größen über 200 nm, die lediglich an Luft gelagert wurden, wiesen ebenfalls in mehr als 50 % der Vesikel interne Niederschläge auf. Folglich ist die Anwesenheit von Luftsauerstoff für die Ausbildung interner Niederschläge notwendig, denn in inert gelagerten Proben konnten keine derartigen Niederschläge detektiert werden. Die Inkubation mit  $\text{NH}_3$  bewirkt einen höheren Anteil an intravesikulären Niederschlägen. Die Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes scheint ohne Einfluss auf die Ausbildung interner Niederschläge zu sein. Ein Magnetfeld bewirkt hingegen eine Separierung von „be-



**Abb. 22:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten RVE-Liposomen nach Inkubation mit 25 %-igem  $\text{NH}_3$  und zwei Tagen Lagerung an Luft; links (a): feingranulärer, die innere Membran deformierender Niederschlag und rechts (b): externe Aggregate neben Liposomen mit internen Aggregaten

„unbeladenen“ und „beladenen“ Vesikeln, was auch durch PCS-Daten von RVE-Liposomen bestätigt wird. Die beobachteten internen Aggregate bestehen aus vielen kleinen NP mit einer Größe von ca. 4 nm, die sich diffus an der inneren Vesikelmembran zusammenlagern (s. Abb. 22a). Bei den Cryo-TEM-Untersuchungen konnten ferner sehr vereinzelt extravesikuläre dunkle Aggregate entdeckt werden (s. Abb. 22b), die womöglich durch das Kollabieren von Liposomen freigesetzt wurden.

Ein ganz anderes Bild bot sich bei den Cryo-TEM-Untersuchungen von 100 nm FHE-Liposomen. Selbst bei der Lagerung an Luftsauerstoff und Zusatz von  $\text{NH}_3$  konnten keine internen Präzipitate mit Sicherheit detektiert werden. Dies kann zum einen an der geringen Größe der Liposomen liegen, denn auch im Fall von kleineren RVE-Liposomen konnten keine internen Aggregate sicher identifiziert werden. Zum anderen weisen die Mikrographen der FHE-Liposomen einen störenden Untergrund auf, der eine Identifizierung von internen Aggregaten erschwert (s. Abb. 23a). Generell konnte eine Tendenz der Vesikel zur Oligolamellarität beobachtet werden. Vereinzelt wurden zudem wie auch bei den RVE-Liposomen dunkle extravesikuläre Aggregate detektiert.



**Abb. 23:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten FHE-Liposomen nach Inkubation mit 25%-igem  $\text{NH}_3$  und 12 Tagen Lagerung an Luft; links (a): keine vom Untergrund deutlich zu unterscheidenden internen Aggregate und rechts (b): Anteil oligolamellarer FHE-Liposomen

### 2.4.3 Liposomen mit stabilisierten Magnetit-Nanopartikeln

POPC-Liposomen wurden auf ihre Eignung zum Einschluss von mit TREG stabilisierten Magnetit-NP exemplarisch untersucht. Nach der erfolgreichen Herstellung von Magnetit-NP mit einer Größe von 4 - 8,5 nm erfolgten zunächst pH-abhängige Stabilitätsuntersuchungen von wässrigen Magnetit-NP-Suspensionen (s. Kapitel 3.6.2). Es zeigte sich, dass solche Suspensionen in  $\text{H}_2\text{O}$  bei pH 3 für mehrere Wochen stabil sind und keinerlei Sedimentationstendenz aufweisen.

Eine so präparierte 0,1 mg/ml Magnetit-NP-Suspension kam bei der Hydratisierung eines POPC-Films nach der FHE-Methode (vgl. S. 159) zum Einsatz. Es wurde analog zur Herstellung  $\text{Fe}^{2+}$ -haltiger Liposomen ein POPC-Film erzeugt und mit der Magnetit-Suspension intensiv geschüttelt. Die erhaltenen Liposomen wurden durch Extrusion auf eine mittlere Größe von 100 nm gebracht, wie mittels PCS-Messungen bestätigt werden konnte. Zur Aufreinigung der Liposomen erfolgte eine Größenausschlusschromatographie [57, 80]. Diese Aufreinigungsmethode hatte sich in vorangegangenen Tests zur Abtrennung von nicht verkapselten Magnetit-NP als geeignet erwiesen.

Die Lagerung der aufgereinigten Liposomen an einem Supermagneten ließ visuell kei-

nerlei Aggregation in der Nähe des Magneten erkennen. In Cryo-TEM-Untersuchungen solcher Dispersionen konnten unilamellare Liposomen detektiert werden, die jedoch ausnahmslos ohne assoziierte Magnetit-NP vorlagen.

Der Versuch, Magnetit-NP auf diesem Wege in FHE-Liposomen einzuschließen, führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Modifikationen der FHE oder weitere, in der Literatur beschriebene Methoden wie Einsatz von Ultraschall oder RVE könnten in zukünftigen Experimenten zur erfolgreichen Verkapselung von Magnetit-NP in Liposomen führen.

### 2.4.4 Diskussion - Geeignete Zugänge zu Magnetoliposomen

Von den beiden untersuchten Ansätzen zur Generierung von Magnetoliposomen erwies sich nur die Methode des sukzessiven Einschlusses von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und der anschließenden Ausfällung von  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  als geeignet. Der Ansatz, TREG-stabilisierte Magnetit-NP direkt in POPC-Liposomen mittels FHE einzuschließen, führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Dies könnte an dem für die Magnetit-NP verwendeten sterischen Stabilisator TREG liegen, der einen Einschluss der NP in Liposomen verhindert. Schließlich konnten bereits Magnetit-NP in Liposomen eingeschlossen werden [57, 80]. Jedoch wurde dabei nicht die FHE-Methode sondern Ultraschall bzw. die RVE-Methode eingesetzt. Somit könnte die FHE-Methode u.U. auch für diesen Zweck ungeeignet sein. Allerdings wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit zu den PB-PEO-Polymersomen nur die FHE auf ihre Eignung hin untersucht. In Folgeexperimenten könnten auch alternative Präparationsmethoden für Liposomen näher charakterisiert sowie alternative Zugänge zu Magnetit-NP untersucht werden.

Die Erzeugung von Magnetoliposomen über den sukzessiven Einschluss von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mittels RVE und anschließender Ausfällung ließ sich auch visuell durch die Lagerung an einem Supermagnet verfolgen. Es erwies sich als entscheidend, dass die Proben an Luftsauerstoff gelagert wurden. Dies ist offensichtlich, da  $\frac{2}{3}$  der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen oxidiert werden müssen, damit überhaupt Magnetit aus dem Gemisch von Fe(II)- und Fe(III)-hydroxid entstehen kann. Die Einwirkung von Luftsauerstoff zur Bildung von Magnetit ist in diesem Fall hinreichend, da die Präparationsbedingungen der Liposomen einen internen pH-Wert von 7,4 erwarten lassen. Ein weiterer Faktor ist die Zugabe einer Base, die die Bildung von Magnetit lediglich vorantreibt und zu einem höheren Anteil an intravesikulären Niederschlägen führt. In vergleichbaren Studien erwies sich die Zugabe einer Base zu  $\text{Fe}^{2+}$ -/ $\text{Fe}^{3+}$ -haltigen Liposomen hingegen als zwingend notwendig, da

## 2 Eisenhaltige Phospholipidvesikel (Liposomen)

bei der Liposomenpräparation eine saure Lösung eingeschlossen wurde. Darum muss der pH-Wert zur Hydroxid-Fällung durch Inkubation mit einer Base erhöht werden. Somit ist der hier verwendete Ansatz des inerten Einschlusses von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Liposomen im leicht alkalischen zwar aufwändiger, indes kann die Bildung von intravesikulärem Magnetit durch das bloße Lagern an Luft initiiert werden.

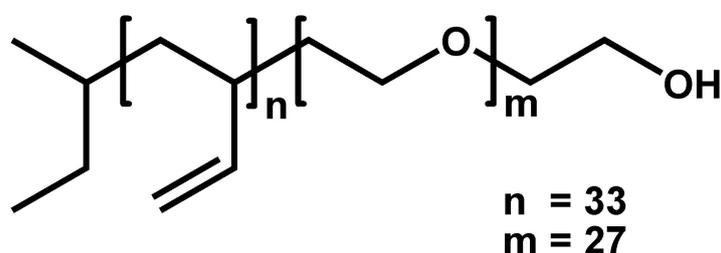
PCS-Untersuchungen zeigten zudem, dass die Lagerung von Liposomendispersionen an einem Supermagneten prinzipiell zur Trennung von größeren, magnetophoretischen Vesikeln von kleineren Vesikeln geeignet ist. Dies kann in Zusammenhang mit der Größe der intern gebildeten magnetischen Partikel gebracht werden. Je größer die intravesikulären Magnetit-Niederschläge sind, desto stärker werden sie vom Magnetfeld angezogen. Damit dürfte eine gerichtete Bewegung größerer Vesikel einhergehen, während kleinere Vesikel sich eher diffusionskontrolliert bewegen.

Eine weitere erstaunliche Erkenntnis war, dass sich bei 100 nm FHE-Liposomen in Cryo-TEM-Untersuchungen keine intravesikulären Aggregate visualisieren ließen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass auch bei RVE-Liposomen nur Vesikel  $> 150$  nm erkennbare interne Aggregate aufweisen. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtungen liefert die jeweilige Anzahl an eingeschlossenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen. Dieser Wert kann mithilfe der Quantifizierung des internen  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalts in den jeweiligen Ansätzen ermittelt werden. Anhand eines Beispiels wird deutlich, wie unterschiedlich die Anzahl interner  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen sein kann: 100 nm FHE-Liposomen mit einer internen Konzentration von 8 mM enthalten durchschnittlich lediglich ca. 2500  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen. 200 nm RVE-Liposomen mit einer internen  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von 14 mM enthalten im Durchschnitt ca. 35300  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, während 100 nm RVE-Liposomen desselben Ansatzes durchschnittlich nur ca. 4400  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen enthalten. Diese Abschätzung verdeutlicht, warum größere Vesikel deutlich größere interne Aggregate aufweisen können und die internen Aggregate von kleineren Vesikeln kaum nachweisbar sind. Dies hängt auch mit der Auflösungsgrenze der Cryo-TEM zusammen, die bei ca. 3 nm liegt. Somit können nur größere Aggregate von NP dieser Größe (s. Abb. 22a) deutlich identifizierbar abgebildet werden.

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

#### 3.1 Vorbemerkungen

Ausgehend von den Erfahrungen zur Herstellung  $\text{Fe}^{2+}$ -haltiger Liposomen wurden in analoger Herangehensweise auch Polymervesikel, so genannte Polymersomen, untersucht, die aus dem amphiphilen block-Copolymer 1,2-Polybutadien-polyethylenoxid (fortan mit PB-PEO bezeichnet) aufgebaut sind (s. Abb. 24). Für Vesikelmembranen des ungeladenen PB-PEO kann, anders als für Membranen von zwitterionischen Phospholipiden wie POPC [64], eine geringe elektrostatische Wechselwirkung mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen bzw. dem  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex erwartet werden. Dies sollte zum einen die Stabilität von  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen erhöhen. Zum anderen geht der deutlich schwächer ausgeprägte amphiphile Charakter des PB-PEO mit einer wesentlich geringeren elektrostatischen Abstoßung der PB-PEO-Polymersomen untereinander einher. Aus diesem Grund können Polymersomen nur bei vergleichsweise geringen PB-PEO-Konzentrationen von maximal 1,6 mM (vgl. [82]) präpariert werden. Bei höheren Konzentrationen treten Aggregationen auf. POPC-Liposomen können hingegen mit Lipidkonzentrationen von über 10 mM hergestellt werden [76].



**Abb. 24:** Struktur des eingesetzten 1,2-Polybutadien-polyethylenoxid (PB-PEO) block-Copolymers mit der Anzahl der Monomereinheiten des jeweiligen Polymerblocks

Analog zu den POPC-Liposomen wurden verschiedene Herstellungsmethoden hinsichtlich ihrer Eignung zur Erzeugung von PB-PEO-Polymersomen getestet. Dabei zeigte sich, dass mittels RVE-Methode keine Polymersomen erzeugt werden konnten. Mittels der FHE-Methode gelang es indes, Polymersomen zu präparieren, so dass ausschließlich die FHE-Methode bei der Herstellung von PB-PEO-Polymersomen zum Einsatz kam.

## 3.2 Einschluss von Fe<sup>2+</sup>-Ionen in Polymersomen

In Analogie zu den Untersuchungen von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Liposomen wurde in 1,6 mM PB-PEO-Polymersomen eine 60 mM Lösung des Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplexes in TRIS-HCl-Puffer mittels FHE eingeschlossen. Die so präparierten Polymersomen konnten durch Extrusion auf Größen von 100 - 200 nm eingestellt werden. Ohne Extrusion wiesen Polymersomendispersionen eine sehr breite Größenverteilung von 60 nm bis zu einigen Mikrometern auf. Folglich konnte die Lichtmikroskopie als zusätzliche Charakterisierungsmethode für Polymersomen mit Größen über 1  $\mu\text{m}$  zum Einsatz kommen. Die Aufreinigung von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen erfolgte üblicherweise mittels Dialyse, wobei EDTA zur effektiven Abtrennung von Fe<sup>2+</sup>-Ionen zugesetzt wurde. Bei der Dialyse konnte auf einen osmotischen Ausgleich durch NaCl verzichtet werden, da die Polymersomenmembranen sich trotz des wirkenden osmotischen Drucks als hinreichend stabil erwiesen. Aufgereinigte Polymersomendispersionen waren schwach rosa gefärbt und wiesen bei mehrwöchiger inerter Lagerung keine Tendenz zur Bildung von Aggregaten auf.

### 3.2.1 Charakterisierung von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen

#### Dynamische Lichtstreuung

PCS-Untersuchungen von nicht extrudierten, Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen ergaben, dass Polymersomen mit einer großen Vesikelgrößen-Verteilungsbreite ( $\text{PDI} > 0,4$ ) vorliegen. Fe<sup>2+</sup>-haltige Polymersomen konnten hingegen bei sukzessiver Extrusion durch zunächst eine 200 nm und dann eine 100 nm Porenfiltermembran reproduzierbar auf einen Z-Average von 130 - 140 nm mit einem  $\text{PDI} < 0,17$  eingestellt werden.

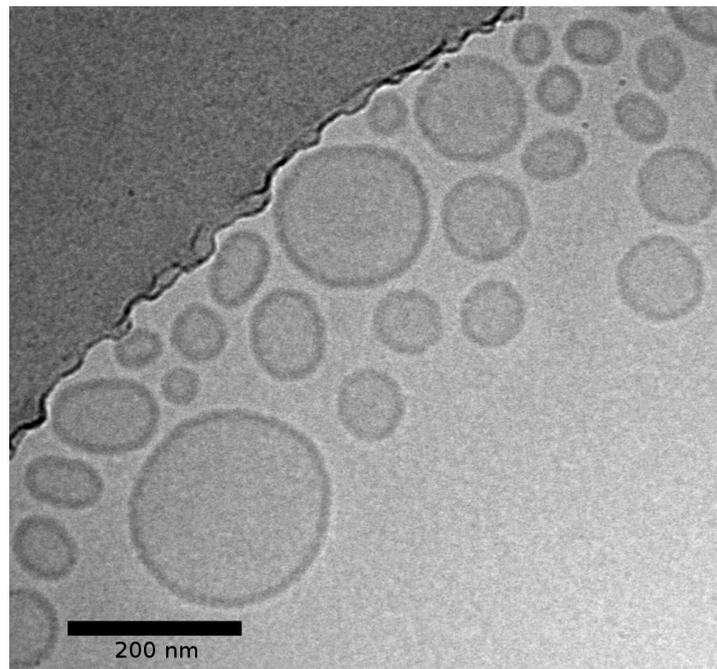
#### Licht- und Elektronenmikroskopie

Nicht extrudierte, aufgereinigte Fe<sup>2+</sup>-haltige Polymersomendispersionen wurden mittels Lichtmikroskopie untersucht. Dabei konnten auf einer repräsentativen Aufnahme (Abb. 25) Vesikel in einem Größenbereich von 1,2 - 2,1  $\mu\text{m}$  detektiert werden. Die lichtmikroskopische Beobachtung der Polymersomendispersion belegt somit die Bildung von stabilen Vesikeln mit Größen von über einem Mikrometer. Genauere Aussagen über die Morphologie und Lamellarität der Vesikel sind mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht möglich.

Mittels Cryo-TEM kann hingegen die Morphologie von Polymersomen näher untersucht



**Abb. 25:** Lichtmikroskopische Aufnahme (100-fache Vergrößerung) einer mittels GPC aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersion; Größe ausgewählter Vesikel:  $2\ \mu\text{m}$  (a),  $2,1\ \mu\text{m}$  (b) und  $1,7\ \mu\text{m}$  bzw.  $1,2\ \mu\text{m}$  (c)



**Abb. 26:** Cryo-TEM-Aufnahme von extrudierten Polymersomen mit eingeschlossenem TRIS-Puffer

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

werden. Hierzu eignen sich extrudierte Polymersomen, da mit der Cryo-TEM nur Strukturen  $< 500$  nm untersucht werden können. Auf einer repräsentativen Aufnahme ist zu erkennen, dass extrudierte PB-PEO-Polymersomen als unilamellare Vesikel mit einer ca. 12 nm dicken Membran vorliegen (Abb. 26). Die Polymersomenmembran ist somit ca. dreimal so dick wie die von unilamellaren POPC-Liposomen.

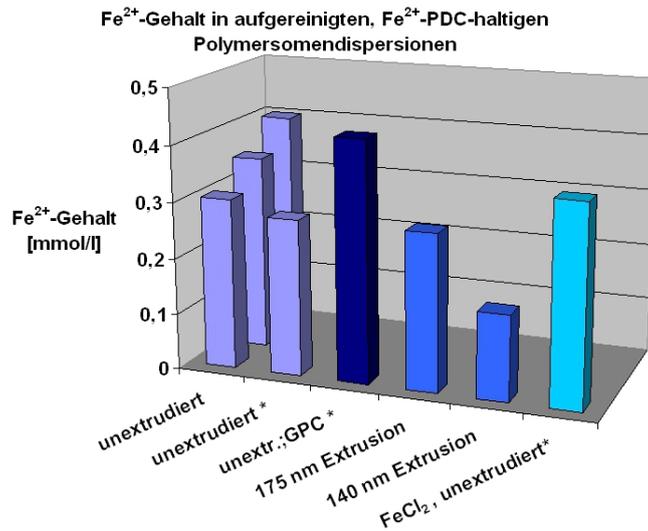
#### **Bestimmung des Eisengehalts von Polymersomendispersionen**

Zur Bestimmung des Gehalts von in Polymersomen eingeschlossenem Eisen wurde die spektrophotometrische Bestimmung mittels 1,10-Phenanthrolin eingesetzt. Diese bereits bei der Bestimmung des Eisengehalts in Liposomen etablierte Methode konnte auf die Bestimmung des Eisengehalts in Polymersomen übertragen werden. In einem ersten Schritt muss die Polymersomenmembran aufgelöst werden, um eingeschlossene  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen freizusetzen. Aufgrund des abweichenden amphiphilen Charakters des PB-PEO können Polymersomen nicht wie Liposomen durch Zusatz von TRITON X 100 unter Micellbildung aufgelöst werden. Entsprechende Tests verliefen negativ. Hingegen werden Polymersomen durch Zusatz von Tetrahydrofuran (THF) vollständig zerstört, was mikroskopische Untersuchungen belegten. Da nach dem Auflösen der Polymersomen die in der Lösung verbleibende Matrix bei der Eisenquantifizierung stört, erfolgte die Eisenbestimmung in Polymersomendispersionen mit der Standard-Additions-Methode. Diese Methode, die auch schon Anwendung bei der Analyse eisenhaltiger Liposomen gefunden hat, liefert Ergebnisse mit einer nur sehr geringen Verfahrensstandardabweichung von unter 5 %.

Mit der FHE-Methode wurden mehrfach Polymersomendispersionen mit einer 60 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Lösung in TRIS-HCl-Puffer hergestellt und nach der Aufreinigung mittels Dialyse der  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt spektrophotometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt.

Es wurde ein mittlerer  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt von 0,35 mM in dialysierten Polymersomendispersionen erhalten. Dieser Wert wurde auch durch eine unabhängige Bestimmung mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (FAAS) bestätigt. Die FAAS, bei der zunächst eine Siebenpunkt-Kalibration mit einem Eisenstandard erfolgte, diente dabei zur Verifizierung der Richtigkeit der spektrophotometrischen Methode.

Zu Vergleichszwecken wurde des Weiteren eine mittels GPC aufgereinigte,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltige Polymersomendispersion untersucht. Bei dieser Untersuchung kann der 100%-



**Abb. 27:** Spektrophotometrisch ermittelter  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt in aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomendispersionen mit einer Startkonzentration von 60 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex in TRIS-HCl-Puffer; Einfluss von Aufreinigungsmethode (GPC), Extrusion und eingesetzter  $\text{Fe}^{2+}$ -Spezies auf den  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt aufgereinigter Polymersomendispersionen; \* - Eisenbestimmung mittels FAAS

Wert des Eiseneinschlusses direkt nach der Generierung der Vesikeldispersion bestimmt werden, da die rasche Aufreinigung mittels GPC nur wenige Minuten dauert. Bei der Dialyse hingegen, die mehrere Stunden dauert, kann ein Verlust von verkapseltem  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex aus Polymersomen mit undichter Membran auftreten. Die mittels GPC aufgereinigte Polymersomendispersion wies einen  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt von 0,43 mM auf. Dieser Wert liegt am oberen Ende des Ergebnisbereichs der dialysierten Polymersomendispersionen, so dass der Verlust von verkapseltem  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex aus Polymersomen während der Dialyse gegen TRIS-HCl-Puffer vernachlässigbar scheint.

Weiterhin wurde der Einfluss der Extrusion auf den  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt von dialysierten Polymersomendispersionen untersucht. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit abnehmender Größe der Vesikel ein geringerer intravesikulärer  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt resultiert. Interessant ist, dass bei der Extrusion durch eine 200 nm Filtermembran, bei der Polymersomen mit einer mittleren Größe von 175 nm mit einem PDI = 0,161 erhalten wurden, nur eine geringe Abnahme des  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalts zu beobachten ist. Hingegen halbiert sich der  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt bei der anschließenden 100 nm Extrusion, bei der Polymersomen mit einer mittleren Größe von 140 nm (PDI = 0,138) generiert wurden. Dieser Trend kann damit erklärt werden, dass durch die Verkleinerung der Vesikel zwar die Gesamtoberfläche

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

konstant bleibt, aber das eingeschlossene Volumen und damit die eingeschlossene  $\text{Fe}^{2+}$ -Menge abnimmt.

Eine Startkonzentration von 60 mM resultiert in einem  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt von maximal 0,4 mM nach der Aufreinigung. Dies bedeutet, dass 0,7 % der eingesetzten  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Polymersomen eingeschlossen werden. Mit dem ermittelten  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt in Polymersomen kann indes keine praktische Einschlusseffizienz analog zu POPC-Liposomen berechnet werden, da der Platzbedarf eines einzelnen PB-PEO-Moleküls in der Polymersomenmembran nicht bekannt ist.

Berücksichtigt man die um den Faktor sieben geringere Konzentration des Amphiphils PB-PEO (1,6 mM) im Vergleich zu 10 mM FHE-POPC-Liposomen, so sind die erzielten Einschussraten in Polymersomendispersionen deutlich höher als bei FHE-POPC-Liposomen. Schließlich können in 10 mM FHE-POPC-Liposomen nur maximal 1,3 % der eingesetzten  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen eingeschlossen werden (s. S. 29). Dies spiegelt auch die Verwendung der Einschluss-Einheit  $\frac{\mu\text{molFe}^{2+}}{\mu\text{molLipid}}$  wieder, die einen hinsichtlich der Lipidmenge normierten Einschluss-Wert angibt. Für PB-PEO ergibt sich ein Einschluss von  $0,25 \frac{\mu\text{molFe}^{2+}}{\mu\text{molLipid}}$  und für POPC ein Einschluss von maximal lediglich  $0,079 \frac{\mu\text{molFe}^{2+}}{\mu\text{molLipid}}$ . Folglich lassen sich in PB-PEO-Polymersomen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen effizienter als in POPC-Liposomen verkapseln, allerdings nur bei relativ geringen Lipidkonzentrationen.

In einem Vergleichsexperiment wurden Polymersomendispersionen mit einer 60 mM  $\text{FeCl}_2$ -Lösung hergestellt und mit zwei Dialyseschritten aufgereinigt. Solche Polymersomendispersionen wiesen einen  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt von maximal 0,36 mM (mit FAAS bestimmt) auf, was vergleichbar mit dem durchschnittlichen Wert für Ansätze mit 60 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex (s. Abb. 27) ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Einschussrate von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in PB-PEO-Polymersomen nicht durch den Einsatz des abschirmenden PDC-Liganden beeinflusst wird.

In späteren Experimenten wurden zudem Polymerfilme mit einer 500 mM  $\text{FeCl}_2$ -Lösung, d.h. mit einer mehr als achtfach höheren  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration, in TRIS-HCl-Puffer hydratisiert. Für REM-ESMA-Untersuchungen (ESMA - Elektronenstrahl-Mikroanalyse) wurden diese Dispersionen mit mindestens zwei zusätzlichen Dialyseschritten gegen  $\text{H}_2\text{O}$  aufgereinigt, um externes  $\text{FeCl}_2$  bzw. den Puffer vollständig abzutrennen. Durch den höheren osmotischen Druck, sowohl durch eine höhere interne  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration als auch durch den Einsatz von  $\text{H}_2\text{O}$  als Dialysemedium, könnte ein größerer Anteil von Polymervesikeln undicht werden. Darauf deuten zumindest die Ergebnisse der Eisenquantifizierung solcher Polymersomendispersionen hin. Diese wiesen nach einer Dialyse

in nur zwei Schritten, bei der nur noch eine extravasikuläre Eisenkonzentration von ca. 0,06 mM vorliegt, einen im Vergleich achtfach höheren Gehalt an Eisen von  $2,3 \pm 0,3$  mM auf. Durch die zwei zusätzlichen Dialyseschritte gegen  $\text{H}_2\text{O}$  sank der Eisengehalt in der Polymersomendispersion deutlich auf lediglich 0,42 mM. Dieser Wert liegt nur noch geringfügig über dem oben aufgeführten Wert für aufgereinigte Polymersomendispersionen mit einer Startkonzentration von 60 mM  $\text{FeCl}_2$ .

#### 3.2.2 Diskussion - $\text{Fe}^{2+}$ -haltige Polymersomen

PB-PEO-Polymersomen eignen sich zum Einschluss von 60 mM  $\text{FeCl}_2$ - bzw.  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösungen. Die mittels FHE hergestellten 1,6 mM PB-PEO-Dispersionen wiesen Polymersomen bis zu einer Größe von ca. 2  $\mu\text{m}$  auf, wie lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten. Obwohl unextrudierte Polymersomendispersionen eine sehr breite Größenverteilung aufwiesen, waren sie für mehrere Wochen stabil. Der Eisengehalt in aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen konnte mit 1,10-Phenanthrolin analog zu POPC-Liposomen, allerdings mit einer modifizierten Variante, bestimmt werden. Es wurden  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalte von bis zu 0,4 mM bestimmt, was durch eine unabhängige Eisenbestimmung mittels FAAS abgesichert werden konnte. Der ermittelte Einschluss von ca. 0,7 % der eingesetzten Menge an Eisen ist vergleichbar mit den bekannten Werten für die FHE [76]. Durch zusätzliche Extrusion von  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen auf unter 200 nm sinkt der Eisengehalt nochmals deutlich.

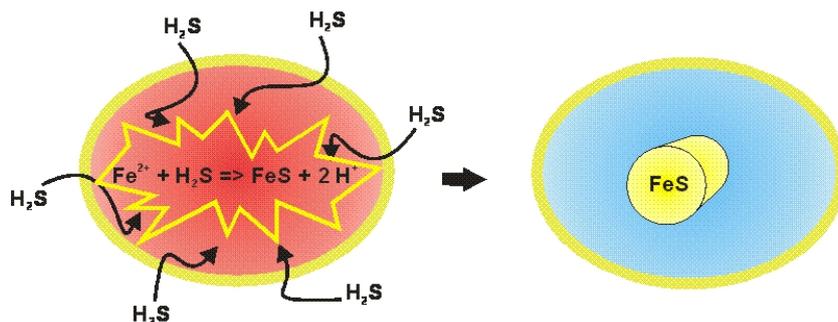
PB-PEO-Polymersomen weisen zudem vergleichbare Einschlussraten für  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösungen sowohl mit als auch ohne den Stabilisator PDC auf. Dies deutet auf eine geringe Wechselwirkung des ungeladenen PB-PEO mit ionischen Spezies hin.

Der Einfluss des osmotischen Drucks während der Dialyse zeigte sich eindrucksvoll bei der Aufreinigung von mit 500 mM  $\text{FeCl}_2$ -Lösung hydratisierten Polymersomendispersionen. Die für die ESMA notwendige Abtrennung von externem Puffer durch Dialyse gegen  $\text{H}_2\text{O}$  reduzierte den Eisengehalt in den so aufgereinigten Vesikeldispersionen auf lediglich ca. 0,4 mM. Die Dialyse weist also Nachteile für die Aufreinigung von Polymersomendispersionen mit einer so hohen internen Eisenkonzentration auf. Dennoch stellt auch die GPC in diesem Fall aufgrund der auftretenden Verdünnung der Polymersomendispersionen keine brauchbare Alternative zur Dialyse dar.

### 3.3 Fällung von FeS in Polymersomen

#### 3.3.1 Herstellung und Stabilität von FeS-haltigen Polymersomen

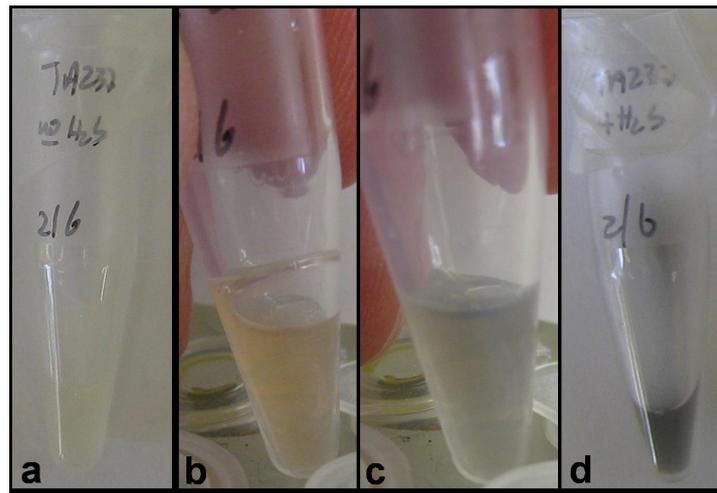
Aufgereinigte,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltige Polymersomendispersionen wurden zur Ausfällung von intravesikulärem FeS mit  $\text{H}_2\text{S}$  versetzt (s. Abb. 28). Eine Variante dafür ist die Zugabe eines  $\text{H}_2\text{S}$ -gesättigten TRIS-HCl-Puffers. Alternativ kann  $\text{H}_2\text{S}$ -Gas mittels Argon-Strom in die Polymersomendispersion eingeleitet werden. Es konnte jeweils eine deutlich erkennbare dunkle Verfärbung der rosa gefärbten Dispersionen insbesondere bei Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$ -Gas innerhalb von 10 - 30 Sekunden beobachtet werden. Bei den erhaltenen, grau gefärbten Dispersionen ließ sich trotz inerter Lagerung schon nach einem Tag ein deutlicher Rückgang der Verfärbung erkennen, und die Dispersionen wiesen wieder eine rosa Färbung auf. Mit einer 500 mM oder 1000 mM  $\text{FeCl}_2$ -Lösung hergestellte, aufgereinigte Polymersomendispersionen verfärbten sich bei der Inkubation mit gasförmigem  $\text{H}_2\text{S}$  zunächst orange und dann rasch schwarz (s. Abb. 29). Solche Dispersionen blieben bei inerter Lagerung bis zu fünf Wochen lang dunkel verfärbt.



**Abb. 28:** Prinzip der Generierung von FeS in aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$

In Polymersomendispersionen, die sich während der inerten Lagerung entfärbt hatten, konnte unabhängig von der eingesetzten  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration durch erneute Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  abermals eine dunkle Verfärbung induziert werden. Allerdings war auch diese dunkle Verfärbung nur wenige Stunden bis zwei Tage stabil. Mögliche Ursachen für die beobachtete Reversibilität der FeS-Fällungsreaktion wurden in Folgeexperimenten noch eingehender untersucht (s. Kapitel 3.3.4).

Des Weiteren wurde bei praktisch allen durch die Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  anhaltend dunkel verfärbten Polymersomendispersionen die Bildung geringer Mengen eines weißen Rückstands nach 24 - 72 Stunden beobachtet. Bei Proben, die sich alsbald nach der dunklen



**Abb. 29:** Verfärbung einer aufgereinigten,  $\text{FeCl}_2$ -haltigen Polymersomendispersion (Startkonzentration: 500 mM  $\text{FeCl}_2$ ) im Verlauf der Begasung mit  $\text{H}_2\text{S}$  von anfänglich farblos (a) über orange (b) und grau (c) bis schwarz (d)

Verfärbung wieder entfärbt hatten, bildete sich kein solcher Rückstand. Zudem wurde eine raschere Bildung des weißen Rückstands bei Lagerung an Luft im Vergleich zu inert gelagerten Proben beobachtet. Eine Analyse des mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschenen weißen Rückstands mittels Massenspektrometrie (Elektrospray-Ionisation) und der Vergleich mit einem Referenz-Massenspektrum zeigten, dass sich eindeutig Schwefel  $\text{S}_8$  im Rückstand befindet. Dies belegen der Molpeak bei  $m/z = 264$  und das für  $\text{S}_8$  charakteristische Fragmentierungsmuster (s. Abb. 71, S. 183 im Anhang). Die aufgenommenen Massenspektren geben indes keine Anhaltspunkte dafür, dass sich auch PB-PEO, Zersetzungsprodukte davon oder andere organische Substanzen in dem weißen Rückstand befinden. Der Schwefel in der Probe ist höchstwahrscheinlich das Resultat einer Oxidation von  $\text{H}_2\text{S}$  in den präparierten Dispersionen. Die Oxidation von  $\text{H}_2\text{S}$  könnte durch nicht zu eliminierende Spuren von Luftsauerstoff und Lagerung an Licht [83] oder aber durch  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen [84] erfolgen.

Die Stabilität von PB-PEO-Polymersomen gegenüber FeS wurde analog zu POPC-Liposomen in Vesikelstabilitätstests in Zusammenarbeit mit K. Rüdell (Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie) untersucht. Dazu wurde ein PB-PEO-Polymerfilm mit TRIS-HCl-Puffer hydratisiert, die erhaltene Dispersion auf Partikel mit einem Durchmesser von ca. 140 nm extrudiert und anschließend mit einer 5 mM FeS-Suspension in TRIS-HCl-Puffer versetzt. Die zeitliche Stabilität der PB-PEO-Polymersomen wurde

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

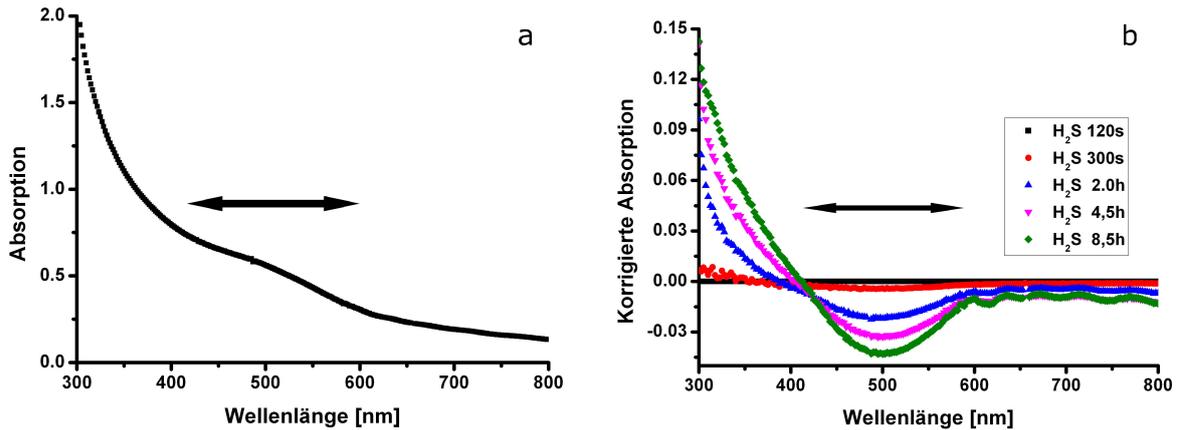
mittels PCS verfolgt. Dabei zeigte sich, dass PB-PEO-Polymersomen mehr als 48 Stunden in Gegenwart von FeS-Partikeln stabil sind. Die PCS-Daten belegen, dass sich die mittlere Größe der Polymersomen praktisch nicht verändert, wohingegen eine Zunahme des PDI von 0,124 auf 0,242 zu beobachten ist. Begleitende Cryo-TEM-Untersuchungen der Proben zeigten, dass sich PB-PEO-Polymersomen in Gegenwart von FeS-Partikeln zwar leicht in der Form hin zu Ellipsoiden, hingegen nicht in der Größe verändern.

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde die Größenstabilität von mit 60 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Lösung hergestellten, extrudierten Polymersomendispersionen nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S untersucht. Nach der Aufreinigung wurden die Polymersomen (Z-Average: 138,4 nm mit PDI = 0,127) zum einen mit H<sub>2</sub>S-gesättigtem TRIS-HCl-Puffer und zum anderen direkt mit H<sub>2</sub>S-Gas behandelt. Dabei veränderte sich im ersten Fall der Z-Average und PDI nach der Inkubation praktisch nicht, während im Fall der Inkubation mit gasförmigem H<sub>2</sub>S zunächst ein Anstieg des Z-Average auf 211,2 nm und des PDI auf 0,229 gemessen wurde. Gleichwohl wies diese Dispersion bei PCS-Messungen nach fünf Tagen wieder vergleichbare Parameter wie vor der Inkubation auf. Auch die anders inkubierte und die nicht inkubierte Dispersion wiesen nach 5 Tagen einen vergleichbaren Z-Average und PDI auf. Die reversible Veränderung von Z-Average und PDI in der mit gasförmigem H<sub>2</sub>S inkubierten Probe könnte zum einen auf eine Reversibilität der FeS-Fällung hindeuten (s. Kapitel 3.3.4). Andererseits ist es auch möglich, dass in der Dispersion noch vorhandene kleine H<sub>2</sub>S-Gasblasen zunächst die Messung beeinflussen. Solche Gasblasen hätten sich indes nach mehreren Tagen vermutlich aufgelöst.

#### 3.3.2 Spektroskopische Verfolgung der Bildung von FeS in Polymersomen

Zur spektroskopischen Verfolgung der Vorgänge bei der Reaktion des intravesikulären Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplexes mit zugesetztem H<sub>2</sub>S erfolgten UV/Vis-Untersuchungen. Da bei der Inkubation mit H<sub>2</sub>S-Gas schon nach weniger als 30 Sekunden keine Farbänderung der Dispersion mehr erkennbar war, musste H<sub>2</sub>S in „verdünnter“ Form eingesetzt werden, um den Prozess der FeS-Fällung zu verlangsamen und ihn angemessen mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgen zu können. Dies konnte durch den Einsatz einer 25 mM H<sub>2</sub>S-Lösung in TRIS-HCl-Puffer bewerkstelligt werden.

Da Polymersomen einfallendes Licht intensiv streuen, weist das UV/Vis-Spektrum von aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-haltigen Polymersomendispersionen eine charakteristische Streulichtkurve über den gesamten Messbereich auf. Die Streulichtkurve über-



**Abb. 30:** (a): UV/Vis-Spektrum von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomen und (b): dessen zeitliche Veränderung nach Inkubation mit 25 mM  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung in TRIS-HCl-Puffer (b); Indizierung der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex durch Pfeile

lagert sich dabei mit der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex, welche bei Wellenlängen von 420 - 600 nm detektiert wird (s. Abb. 30a).

Der zeitliche Verlauf der Inkubation von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Polymersomen mit einer TRIS-HCl-Pufferlösung mit 25 mM gelösten  $\text{H}_2\text{S}$  wurde UV/Vis-spektroskopisch verfolgt, beginnend beim frühestmöglichen Zeitpunkt  $t_0$ , 120 Sekunden nach dem Mischen der Dispersionen. Um den störenden Einfluss der Lichtstreuung durch die Polymersomen zu eliminieren, wurde von den aufgenommenen Spektren das Ausgangsspektrum zum Zeitpunkt  $t_0$  subtrahiert (Abb. 30b). Die erhaltenen Graphen zeigen deutlich, dass sich im Verlauf der Inkubation die Absorption genau im Bereich der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes kontinuierlich verringert. Dies ist auf die Verringerung der verfügbaren  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration durch Ausfällung zurückzuführen. Gleichzeitig steigt die Absorption im Wellenlängenbereich unter 400 nm. Dies kann der Bildung von Partikeln bzw. Aggregaten zugeschrieben werden und ist ein Indiz für die Bildung von FeS-Aggregaten. Die Beschreibung der auftretenden Effekte ist nur phänomenologisch, da hier die FeS-Fällungsreaktion sichtbar verlangsamt im Vergleich zur Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$ -Gas auftritt. Es wird diskutiert, dass die Geschwindigkeit der intravesikulären Metallsulfid-Fällungsreaktion abhängig von der Menge des in die Dispersion eingebrachten Fällungsreagenz  $\text{H}_2\text{S}$  ist [20]. Allerdings zeigten neuere Untersuchungen, dass die Permeation von  $\text{H}_2\text{S}$  ins Vesikelinnere nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fällungsreaktion ist [18]. Vielmehr scheint die Geschwindigkeit der intravesi-

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

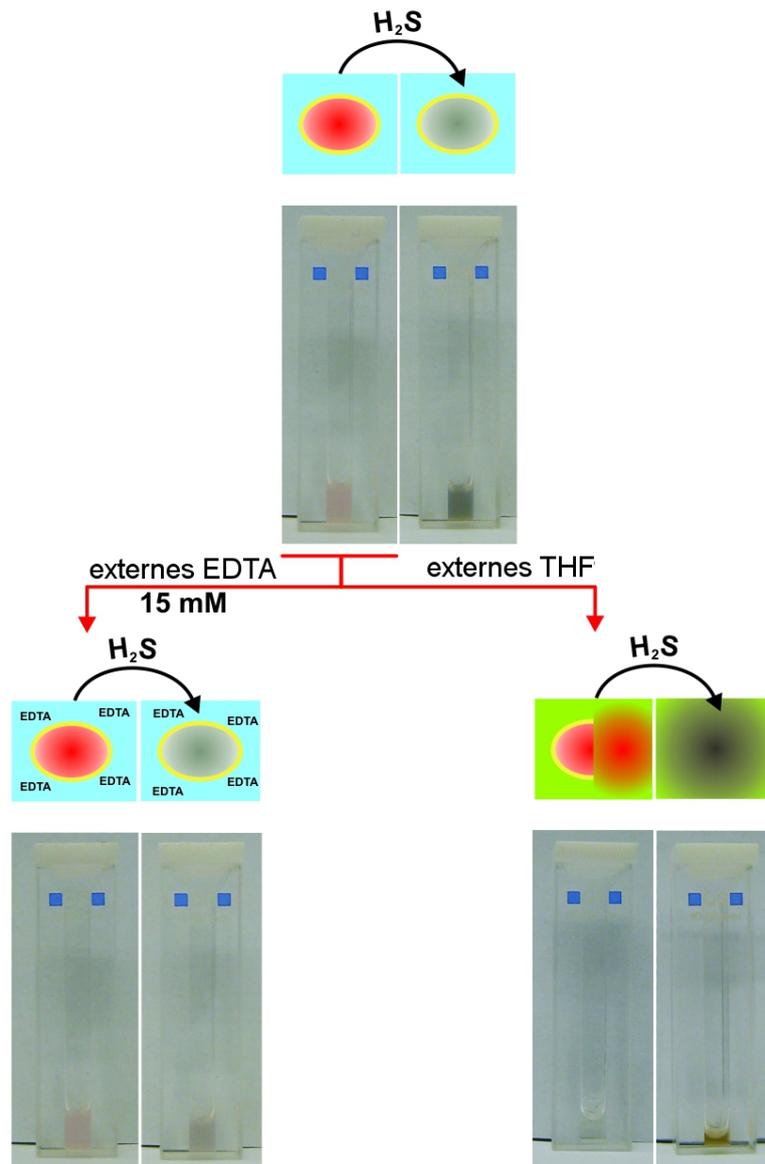
kulären Bildung von Metallsulfiden, betrachtet am Beispiel von CdS, durch komplexere Interaktionen von sulfidischen Spezies mit anderen Komponenten des Vesikelinneren bzw. der -membran bestimmt zu sein [18].

#### 3.3.3 Lokalisierung des FeS-Niederschlags in Polymersomen

##### Makroskopische Untersuchungen

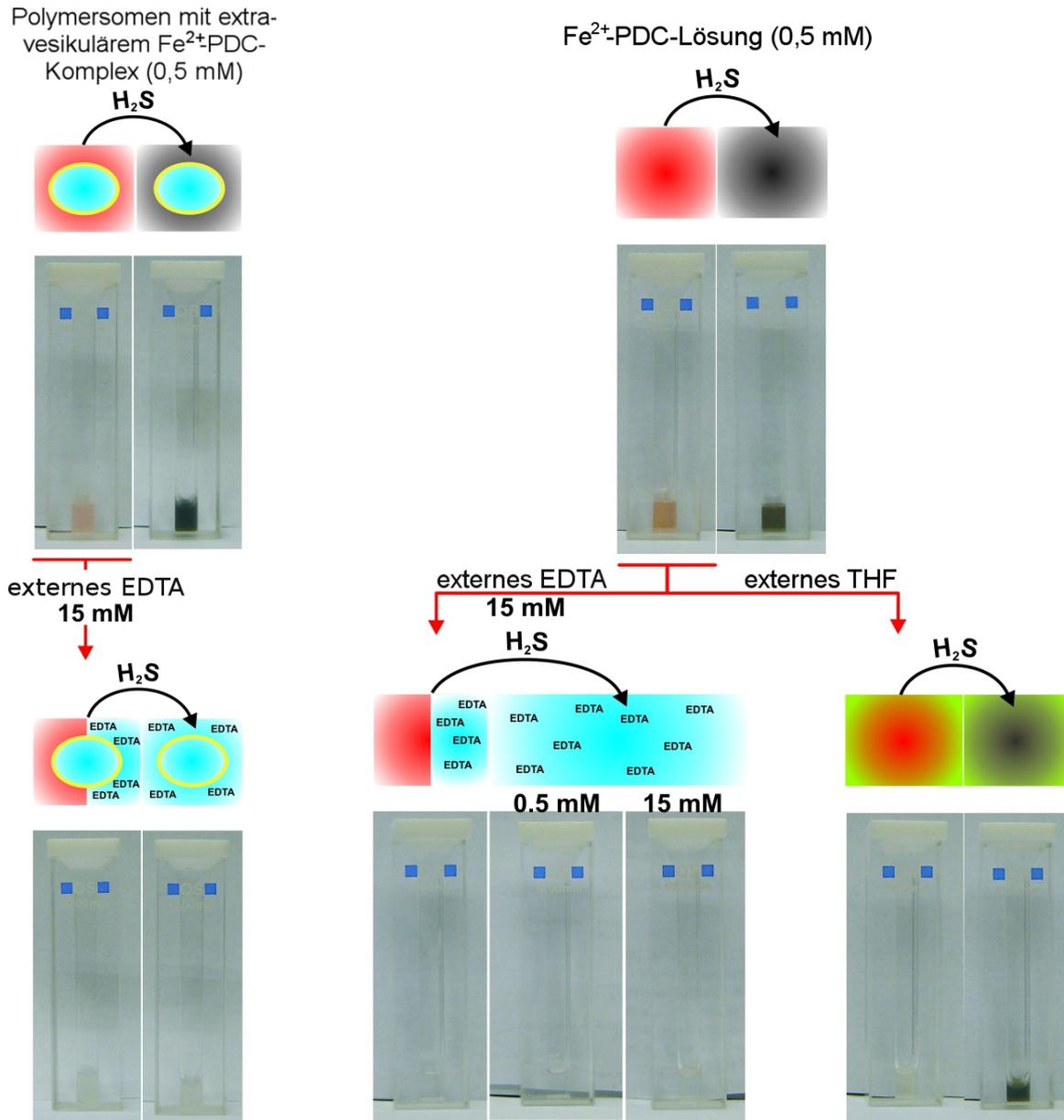
Um abzusichern, dass der beobachtete Prozess der FeS-Fällung auch tatsächlich im Inneren von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymervesikeln abläuft, wurden geeignete Versuchsserien durchgeführt und photographisch dokumentiert (s. Abb. 31 und 32). In aufgereinigten, leicht rosa gefärbten, Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-haltigen Polymersomendispersionen mit einem Fe<sup>2+</sup>-Gehalt von ca. 0,35 mM geht die FeS-Fällung durch Inkubation mit H<sub>2</sub>S, selbst in Gegenwart eines 30-fachen Überschusses (15 mM) an externem EDTA, vonstatten (s. Abb. 31). Leere Polymersomen mit extern zugesetzter 0,5 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-Lösung verfärbten sich zwar bei Inkubation mit H<sub>2</sub>S ebenfalls dunkel (s. Abb. 32, links oben). Indes verschwindet die rötliche Färbung der Dispersion bei Zusatz eines EDTA-Überschusses und eine dunkle Verfärbung bei Inkubation mit H<sub>2</sub>S kann nicht mehr beobachtet werden (s. Abb. 32, links unten). Somit muss die beobachtete Fällungsreaktion in aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen intravesikulär ablaufen. Die inhibierende Wirkung von EDTA auf die FeS-Fällung konnte auch in Abwesenheit von Vesikeln eindrucksvoll belegt werden (s. Abb. 32, rechts). Bereits die Zugabe einer äquimolaren Menge an EDTA genügt, um die Fällung von FeS aus einer 0,5 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-Lösung durch Inkubation mit H<sub>2</sub>S zu verhindern.

Durch Zusatz von THF werden Fe<sup>2+</sup>-haltige Polymersomen in der Dispersion zerstört. Eine, wenngleich deutlich abgeschwächte, farbliche Veränderung der entstandenen Lösung bei der Inkubation mit H<sub>2</sub>S ist dennoch weiterhin zu beobachten (s. Abb. 31, rechts). Wird vor dem Mischen mit THF eine bezüglich der Fe<sup>2+</sup>-Ionen äquimolare Menge EDTA zugesetzt, kann keine Verfärbung der Lösung bei Inkubation mit H<sub>2</sub>S beobachtet werden. Dies belegt zusätzlich, dass die FeS-Fällung innerhalb der Polymersomen abläuft.

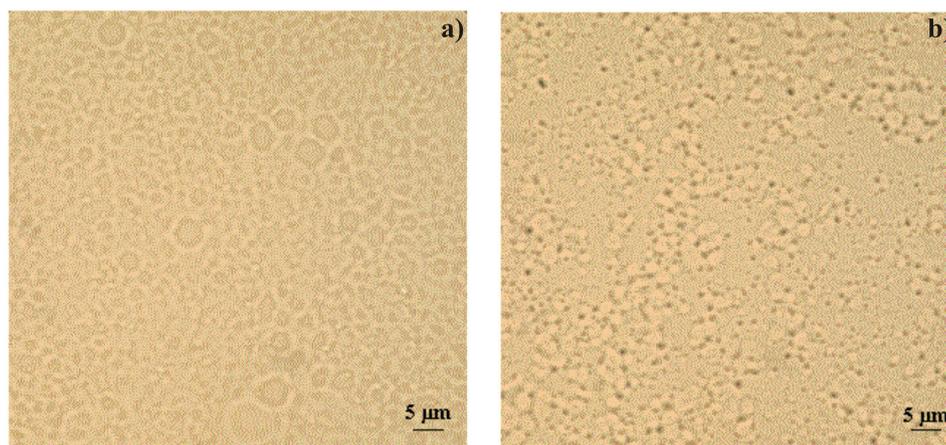
Polymersomen mit intravesikulärem Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex

**Abb. 31:** Versuchsschema zum Nachweis der intravesikulären FeS-Fällung in aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-haltigen PB-PEO-Polymersomen bei Inkubation mit H<sub>2</sub>S-Gas (oben); Startkonzentration: 60 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex; Kontrolle (links unten): FeS-Fällung auch bei Gegenwart eines 30-fachen Überschusses an externem EDTA zu beobachten; unten rechts: Solubilisierung von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen mit THF lässt eine Reaktion von Fe<sup>2+</sup>-Ionen mit H<sub>2</sub>S immer noch zu (nach [53])

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)



**Abb. 32:** Versuchsschemata zur Verdeutlichung des inhibierenden Einflusses von EDTA auf die FeS-Fällung; oben: FeS-Fällung aus einer 0,5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösung ohne (rechts) sowie in Gegenwart von 1,6 mM pufferhaltigen PB-PEO-Polymersomen (links) in Abwesenheit von EDTA beobachtbar; unten links und Mitte: generelle Inhibition der FeS-Fällung aus einer  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösung bei Zusatz eines EDTA-Überschusses; unten rechts: Zusatz von THF zu einer 0,5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösung verhindert FeS-Fällungsreaktion bei Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$ -Gas nicht (nach [53])

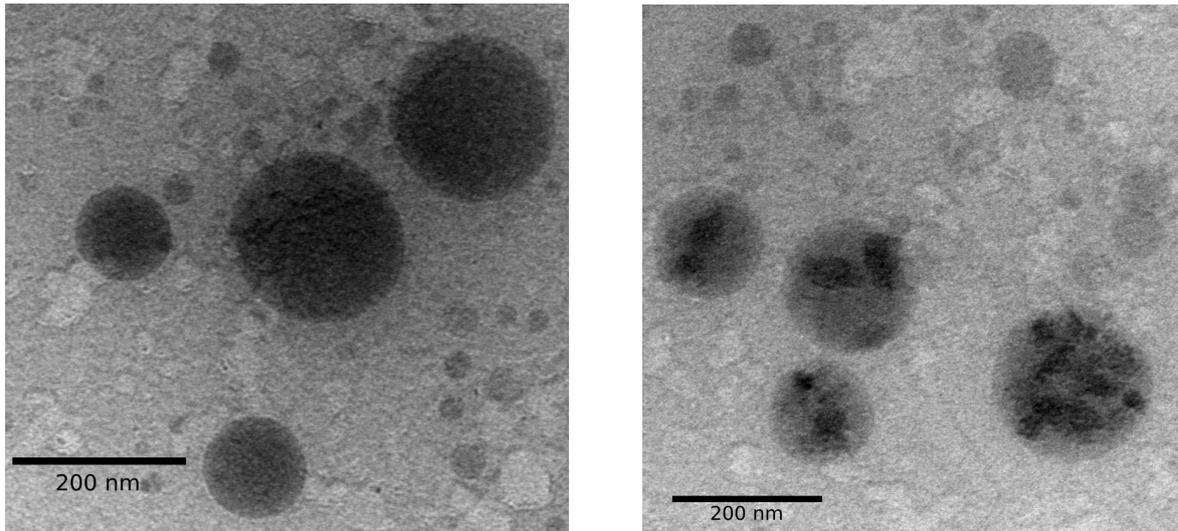


**Abb. 33:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomen vor (a) und nach (b) der Inkubation mit 25 mM  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung in TRIS-HCl-Puffer; Fixierung der Vesikel auf dem Objektträger mit Poly-*L*-Lysin

#### Lichtmikroskopische Untersuchungen

Ergänzend zum makroskopischen Nachweis der intravesikulären FeS-Fällung sollte in mikroskopischen Untersuchungen die FeS-Fällung in diskreten Vesikeln visualisiert werden. Da sich in unextrudierten Polymersomendispersionen auch Vesikel mit einem Durchmesser im einstelligen Mikrometerbereich befinden, erfolgten zunächst lichtmikroskopische Untersuchungen. Für die Untersuchungen wurden aufgereinigte,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltige Polymersomendispersionen vor und nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  mittels Lichtmikroskopie (Durchlicht) charakterisiert. Dazu wurden die Polymersomen auf einem Objektträger mit Poly-*L*-Lysin fixiert.

Repräsentative Aufnahmen dieser Untersuchungen zeigen, dass sich vor der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  nur Vesikel ohne erkennbare dunkle Schatten in der Probe befinden (Abb. 33a). In der mit  $\text{H}_2\text{S}$  inkubierten Probe weist indes eine Vielzahl von Vesikeln eindeutig erkennbare dunkle Niederschläge auf (Abb. 33b). Die genaue Lokalisierung der dunklen Niederschläge kann gleichwohl nicht ermittelt werden, da die vesikulären Strukturen nicht mehr klar voneinander abgegrenzt vorliegen. Dennoch zeigen die dunklen Aggregate eine mögliche Ursache für die dunkle Verfärbung von mit  $\text{H}_2\text{S}$  inkubierten Polymersomendispersionen.



**Abb. 34:** TEM-Aufnahmen einer eingetrockneten Probe aufgereinigter,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltiger Polymersomen nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$

#### Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Ergänzend zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden verschiedene elektronenmikroskopische Methoden hinsichtlich ihrer Eignung zur Visualisierung und zum Nachweis der intravesikulären  $\text{FeS}$ -Fällung in diskreten Vesikeln getestet. Hierbei war die Herausforderung groß, die Probenpräparation unter inerten Bedingungen zu bewerkstelligen. Dies ist von enormer Bedeutung, da die zu erwartenden  $\text{FeS}$ -Aggregate im Nanometerbereich und aufgrund der großen Oberfläche besonders oxidationsempfindlich sind [85]. Bei TEM-Untersuchungen sollten sich eisenhaltige Aggregate aufgrund der höheren Ordnungszahl von Eisen im Vergleich zu den konstituierenden Elementen des PB-PEO Kohlen-, Sauer- und Wasserstoff deutlich durch ihren dunklen Kontrast von ihrer Umgebung abzeichnen.

#### TEM-Untersuchungen

In TEM-Untersuchungen wurden aufgereinigte,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltige Polymersomen vor und nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  charakterisiert. Die Proben wurden auf einem Grid aufgetragen, eingetrocknet und nach einem ggf. notwendigen Waschschrift mit  $\text{H}_2\text{O}$  untersucht. Mit dieser Methode wurden indes nur mäßig aussagekräftige und zudem schlecht reproduzierbare Ergebnisse erhalten. In mehreren Proben, die zuvor mit  $\text{H}_2\text{S}$  inkubiert wurden, konnten dunkel kontrastierte Vesikel als dominierende Spezies neben

vereinzelt auffindbaren Vesikeln mit deutlich erkennbaren dunklen, vermutlich internen Aggregaten beobachtet werden (s. Abb. 34). Dabei kann der dunkle Kontrast von großen Vesikeln auf das große interne Volumen zurückgeführt werden, das den Elektronenstrahl beim Durchgang stärker schwächt als der intravesikuläre Raum kleiner Vesikel (s. Abb. 34 links). Dieser Effekt bewirkt, dass große Vesikel mit dunklerem Kontrast erscheinen als kleinere Vesikel. Die beobachteten dunklen Aggregate scheinen intravesikulär zu sein, konnten aber im Verlauf der TEM-Untersuchungen nicht näher charakterisiert werden. Es fällt außerdem auf, dass alle Vesikel  $< 100$  nm keine erkennbaren intravesikulären Aggregate und auch größere Vesikel nur selten interne Aggregate aufweisen.

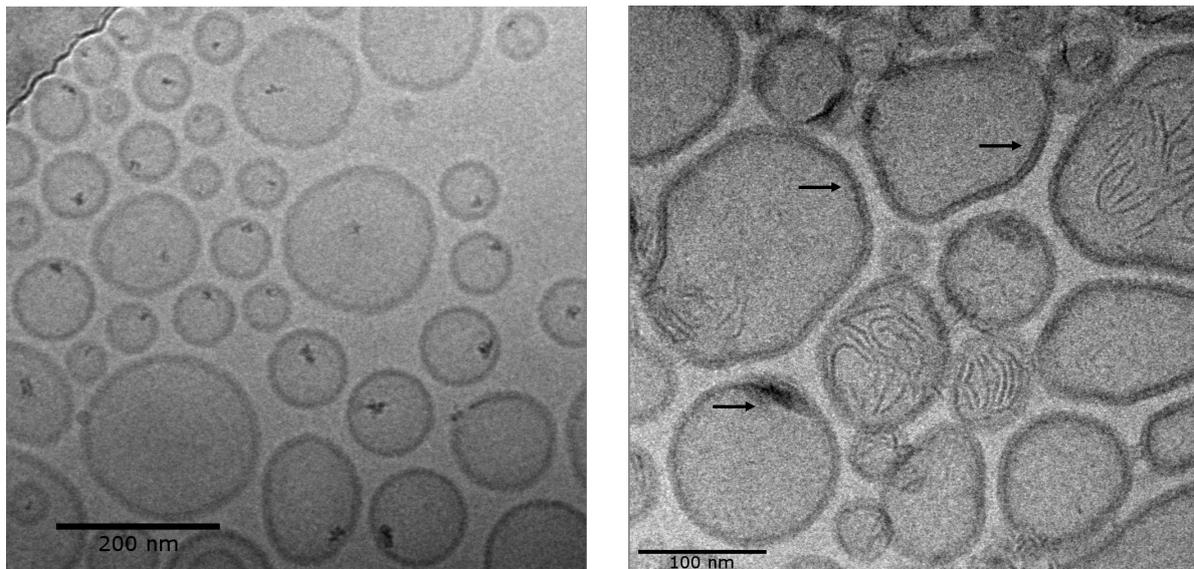
Um die auftretende FeS-Fällungsreaktion auch in diskreten Vesikeln nachweisen zu können, müssen die gebildeten Aggregate hinreichend groß sein. Da dies bei den zuerst präparierten Proben nicht der Fall war, könnte eine Erhöhung der Menge an intravesikulären  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zur Bildung von potenziell größeren und damit detektierbaren FeS-Niederschlägen führen. Darum wurden in Folgeexperimenten zum einen Vesikel mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich mittels REM-EDX zur Detektion und zur Elementanalyse von potenziellen FeS-Aggregaten untersucht. Zum anderen wurden Vesikeldispersionen mit höheren  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen (500 mM  $\text{FeCl}_2$ ) hergestellt und nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  mittels Cryo-TEM charakterisiert.

#### Cryo-TEM-Untersuchungen

Für höhere intravesikuläre Eisengehalte wurden Polymersomen mit einer 500 mM  $\text{FeCl}_2$ -Lösung hydratisiert und mittels Dialyse aufgereinigt. PDC kam als Stabilisator nicht zum Einsatz, da PDC mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen einen kristallinen Feststoff bei  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen über 60 mM bildet. Ohne Stabilisator konnte die Bildung von  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ -Niederschlägen allerdings nicht ausgeschlossen werden, denn es wurde bei einem pH-Wert von 7,4 gearbeitet (vgl. Kapitel 2.2). Die Bildung von  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ -Niederschlägen ist jedoch unproblematisch aufgrund der Tatsache, dass sich aus  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  durch die Reaktion mit Schwefelwasserstoff FeS bildet, wie Vergleichsexperimente zeigten. Die Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen Löslichkeitsprodukten von FeS und  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ , wobei FeS das niedrigere Löslichkeitsprodukt aufweist [63].

$\text{FeCl}_2$ -haltige Polymersomen wurden nach der inerten Präparation mit  $\text{H}_2\text{S}$  inkubiert, wobei eine dunkle Verfärbung beobachtet werden konnte (s. Abb. 29). In anschließenden Cryo-TEM-Untersuchungen wurden Proben vor sowie nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)



**Abb. 35:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten, 500 mM FeCl<sub>2</sub>-haltigen Polymersomen vor (links) und nach (rechts) der Inkubation mit H<sub>2</sub>S

untersucht. Es zeigte sich, dass sich bei der Hydratisierung ausschließlich unilamellare Vesikel gebildet hatten. Zudem weisen deutlich über 50 % der Polymersomen in der nicht inkubierten Probe eindeutig intravesikuläre Aggregate auf (s. Abb. 35 links). Der dunkle Kontrast weist auf eisenhaltige Aggregate hin. Diese sind vermutlich Zusammenballungen von Fe(OH)<sub>2</sub>-Niederschlägen, da in dem Experiment kein stabilisierender Ligand wie PDC eingesetzt wurde.

Durch die Inkubation mit H<sub>2</sub>S konnte eine dunkle Verfärbung der Dispersion makroskopisch beobachtet werden. Indessen ließen sich bei den Cryo-TEM-Untersuchungen nur in wenigen Fällen erkennbare intravesikuläre Aggregate detektieren. Die bei nicht inkubierten Proben beobachteten Aggregate waren komplett verschwunden. Dafür wiesen wenige Vesikel kompakte, membran-assoziierte dunkle Aggregate auf (s. Abb. 35 rechts). Außerdem konnte eine schwache, dunkle Verfärbung von Polymersomenmembranen beobachtet werden, die auf winzige FeS-Aggregate zurückzuführen sein könnte (s. Pfeile in Abb. 35 rechts). Mehrere Polymersomen weisen außerdem klar erkennbare Deformationen auf und sind überdies nicht mehr sphärisch (vgl. bb. 35 links). Polymersomen vor der Inkubation mit H<sub>2</sub>S waren hingegen nahezu einheitlich sphärisch. Häufig waren zudem fadenartige Strukturen zu erkennen, die auf eine Veränderung der Polymermembran und die Ausbildung anderer Packungsstrukturen des PB-PEO hindeuten (s. Abb. 35 rechts). Solche Strukturen wurden in einigen Fällen auch in anderen Proben beobachtet, für die

eine ältere PB-PEO-Charge verwendet wurde. Die Inkubation mit H<sub>2</sub>S verändert also offensichtlich bei einem Teil der Polymersomen die Form und hat auch einen gewissen Einfluss auf die Stabilität des PB-PEO (Auftreten anderer Packungsstrukturen).

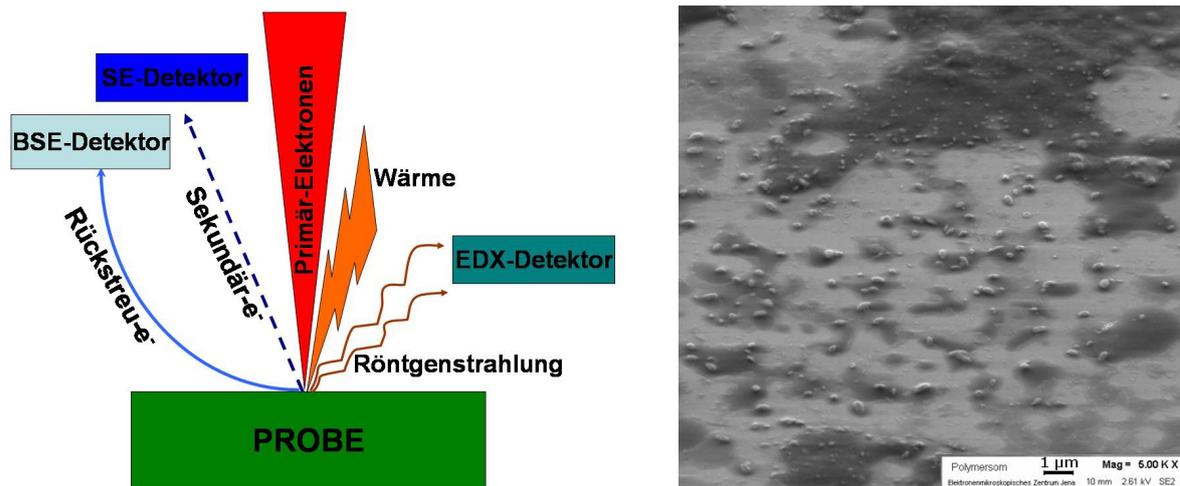
Durch die Erhöhung des Eisengehalts in Polymersomen konnten somit zwar Hinweise auf die Bildung von FeS-Aggregaten in Form kleiner, membranständiger Aggregate gefunden werden. Gleichwohl scheinen sich keine diskreten FeS-Partikel zu bilden, die groß genug sind, um eindeutig mittels Cryo-TEM detektiert zu werden. Die Schwierigkeit, intravesikulär gebildete Metallsulfide mittels Elektronenmikroskopie zu detektieren, wird auch in der Literatur [19] beschrieben. Dort wird vermutet, dass sich die gebildeten Metallsulfidpartikel von wenigen Nanometern Größe als dünne Schicht an der inneren Vesikeloberfläche ablagern [19].

#### **REM-EDX-Untersuchungen eingetrockneter Proben**

Zur Untersuchung von aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen mit Größen im Mikrometerbereich erfolgten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen. Die Wechselwirkung des Elektronstrahls mit der Probe führt zur Freisetzung von Elektronen und von Röntgenstrahlung aus der Probe. Diese freigesetzten Elektronen sowie charakteristische Röntgenstrahlung aus der Probe können Aufschluss über die Art und die Lokalisierung von Elementen in der Probe geben. Eine Auswahl der an der Probenoberfläche generierten Elektronen und der elektromagnetischen Strahlung samt der notwendigen Detektoren zur Analyse derselben ist in Abb. 36 dargestellt. Der auf die eingetrocknete Probe treffende Primärelektronenstrahl generiert bei ausreichender Leitfähigkeit der Probe u.a. Sekundärelektronen (SE), die aus einer Tiefe von ca. 1 - 10 nm unter der Probenoberfläche stammen [86] und somit Auskunft über die Topographie der Probe geben können. Zudem können so genannte Rückstreuелеktronen (BSE), die aus einer Tiefe von ca. 10 - 1000 nm stammen [86] und somit eine Tiefeninformation geben, mit einem geeigneten Detektor registriert werden. Schließlich können die in der Probe enthaltenen Elemente anhand der charakteristischen Röntgenstrahlung, die bei der Wechselwirkung der Atome mit primären oder sekundären Elektronen freigesetzt wird, mithilfe eines EDX-Detektors identifiziert werden [86].

Zunächst musste eine geeignete Präparation für die REM-Untersuchungen gefunden werden. Als optimal erwies sich die modifizierte Aufreinigung von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen mit einem zusätzlichen Dialyseschritt gegen destilliertes H<sub>2</sub>O. Nach

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

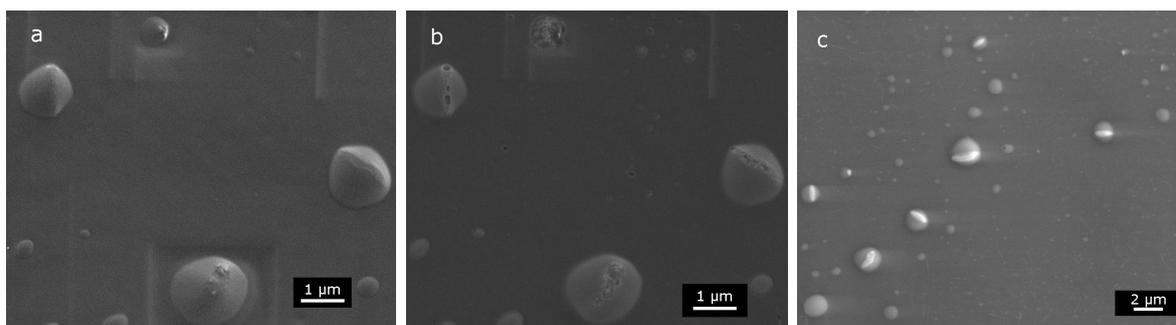


**Abb. 36:** Vereinfachte Darstellung der möglichen Detektionsmöglichkeiten bei der Rasterelektronenmikroskopie REM (links) und REM-Aufnahme (SE-Detektor) von aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-PDC-haltigen Polymersomen nach Inkubation mit H<sub>2</sub>S (rechts)

einer ggf. erfolgten Inkubation mit H<sub>2</sub>S wurden 10 µl der Probe auf einen Silizium-Wafer aufgetragen. Nach dem Eintrocknen war kein zusätzlicher Waschschrift mit destilliertem H<sub>2</sub>O zur Abtrennung von externem Puffer notwendig. Ein solcher Waschschrift erwies sich als unpraktikabel. Eine REM-Aufnahme einer so präparierten Polymersomenprobe mit SE-Detektor ist in Abb. 36, rechts zu sehen. Es sind diskrete Vesikel mit einer Größe von einigen Hundert Nanometern zu erkennen.

Um Aussagen zur Lokalisierung des gebildeten FeS-Niederschlags in diskreten Vesikeln zu erhalten, wurden aufgereinigte, Fe<sup>2+</sup>-haltige Polymersomendispersionen mit H<sub>2</sub>S inkubiert. Nach der Präparation auf einem Siliziumwafer wurden die Proben mit einem SE-Detektor bei unterschiedlichen Anregungsenergien untersucht, um die Oberfläche bzw. das Innere der präparierten Polymersomen zu charakterisieren. „Schwere“ Elemente mit höherer Ordnungszahl wie Eisen weisen dabei einen helleren Kontrast im Vergleich zu „leichten“ Elementen wie Kohlenstoff und Sauerstoff auf [86].

Bei niedrigen Anregungsenergien des Primärelektronenstrahls von 0,8 - 2 keV sind mit dem SE-Detektor keine hellen Kontraste zu erkennen (Abb. 37a, b). Folglich sind keine schweren Elemente, d.h. kein Eisen, in und auf der Membran vorhanden. Hingegen ist eine Art Ausbeulung der Vesikelmembran, die auf einen internen Niederschlag hinweist, in Abb. 37a deutlich sichtbar. Bei einer höheren Anregungsenergie von 7 keV, bei der auch ein Teil des Vesikelinneren mit angeregt wird [86], sind weiße Bereiche in einigen Vesikeln



**Abb. 37:** REM-Aufnahme (SE-Detektor) von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-haltigen Polymersomen nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  bei Anregungsenergien von 0,8 keV (a), 2 keV (b) und 7 keV (c)

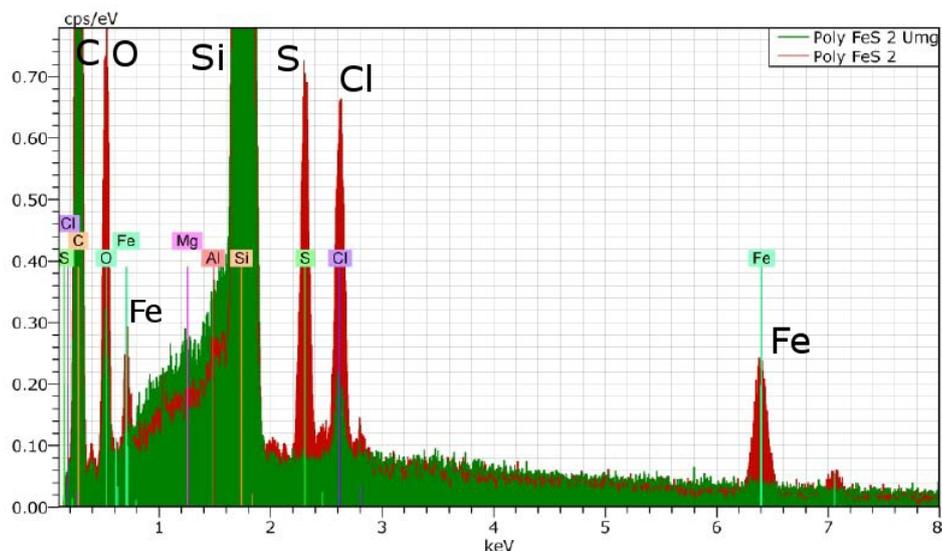
keln sichtbar (Abb. 37c), die die Anwesenheit von Elementen mit höherer Ordnungszahl beweisen. Aufnahmen derselben Probe mit einem BSE-Detektor, der eine Information über das Vesikelinnere liefert, zeigen vergleichbare helle Bereiche in Vesikeln.

Die Ergebnisse bei verschiedenen Anregungsenergien (SE-Detektor) und die Untersuchung mit BSE-Detektor weisen folglich auf eine intravesikuläre Bildung eines Niederschlags mit einem schweren Element hin. Da Eisen das Element mit der mit Abstand höchsten Ordnungszahl in der Probe ist, sollte der Niederschlag eisenhaltig sein.

Um die potenzielle Zusammensetzung des Niederschlags zu ermitteln, erfolgten an identisch präparierten Proben (einer aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersion nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$ ) REM-EDX-Untersuchungen. Mittels REM-EDX können die in einem definierten Probenareal vorliegenden Elemente anhand ihrer charakteristischen Röntgenstrahlung identifiziert werden [86]. Es konnte eindeutig das Vesikel-assoziierte Vorliegen von Fe und S anhand der K-Linien im EDX-Spektrum bestätigt werden (Abb. 38, rote Linie). Bei Vergleichsmessungen in der Umgebung von diskreten Vesikeln konnten weder Fe noch S detektiert werden (Abb. 38). Zudem konnten die in der Probe ebenfalls vorliegenden Elemente C, O und Cl sowie Si vom Probenträger detektiert werden.

Die vesikel-assoziierte Colokalisation von Fe und S ist ein weiterer Beleg für die intravesikuläre FeS-Fällung, da in die Probe eingebrachtes  $\text{H}_2\text{S}$  die einzige Schwefelquelle ist. Indessen würde  $\text{H}_2\text{S}$ , falls es keinen FeS-Niederschlag bildet, beim Eintrocknen aus der Dispersion hinausdiffundieren und nicht mehr mit EDX nachweisbar sein.

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)



**Abb. 38:** REM-EDX-Spektrum von aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen (Startkonzentration: 60 mM  $\text{FeCl}_2$ ) nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  (rot) und deren Umgebung (grün); Zuordnung der Peaks zu K-Linien der Elemente (sowie zusätzlich L-Linien von Fe) in der Probe und dem Probenträger

#### 3.3.4 Reversibilität der FeS-Fällungsreaktion in Polymersomen

Die in aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen beobachtete dunkle Verfärbung bei der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  erwies sich als zeitlich nicht stabil. Das Verschwinden der dunklen Verfärbung kann verschiedene Ursachen haben. Eine erste Möglichkeit ist die Oxidation der gebildeten, sehr oxidationsempfindlichen FeS-Partikel durch Luftsauerstoff. Diese Möglichkeit ist unwahrscheinlich, da begaste Proben unter inerten Bedingungen präpariert und gelagert wurden. Als zweites ist denkbar, dass Vesikel mit intern gebildetem FeS während der Lagerung undicht werden und extern vorhandenes EDTA in die Vesikel eindringt. Dies könnte zur Auflösung von vorhandenen FeS-NP in Polymersomen führen. Auch diese Erklärung ist unwahrscheinlich, da eine wiederholte Inkubation entfärbter Polymersomendispersionen mit  $\text{H}_2\text{S}$  erneut eine dunkle Verfärbung induziert. Würden  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Form eines EDTA-Komplexes vorliegen, würde keine FeS-Fällung stattfinden. Eine dritte Erklärung erscheint plausibler. So könnten sich gebildete FeS-Partikel aufgrund abnehmender  $\text{H}_2\text{S}$ - und damit  $\text{S}^{2-}$ -Konzentration in der Polymersomendispersion wieder auflösen, da das FeS-Fällungsgleichgewicht (s. Reaktion 2) wieder auf die linke Seite verschoben wird. Bei der Lagerung in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{S}$  könnte dies die Ursache für das Verschwinden der Verfärbung darstellen.



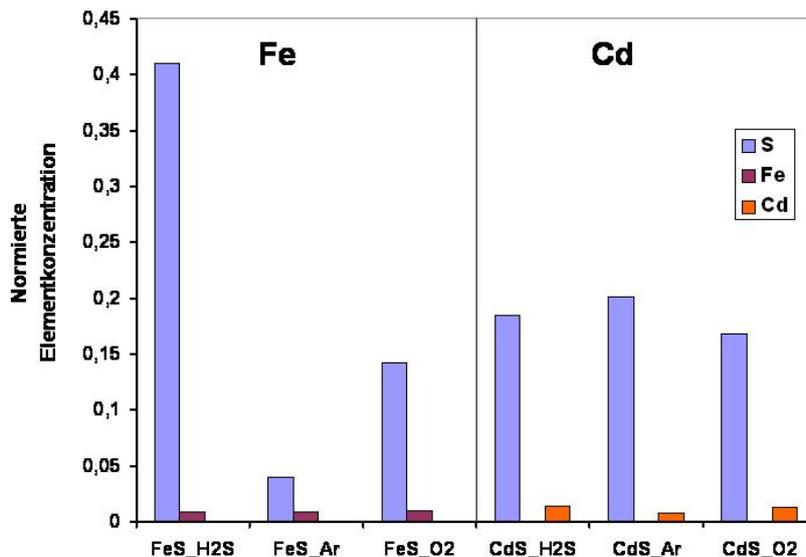
Denn beim Einschluss einer 60 mM Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex-Lösung in Polymersomen erfolgte der Rückgang der bei der H<sub>2</sub>S-Inkubation beobachteten dunklen Verfärbung schon innerhalb von 24 Stunden. Der Rückgang wurde trotz Lagerung unter Argon beobachtet. Erfolgte hingegen nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S die Lagerung unter einer inerten H<sub>2</sub>S-Atmosphäre, blieb eine dunkle Verfärbung deutlich länger bestehen. Unter diesen Bedingungen blieben mit einer 60 mM FeCl<sub>2</sub>-Lösung hydratisierte und anschließend aufgereinigte Polymersomen mehr als neun Wochen lang nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S dunkel verfärbt.

Bei Einsatz von deutlich höheren Fe<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 500 mM blieb die auftretende dunkle Verfärbung auch bei Lagerung unter Argon deutlich länger für eine oder mehrere Wochen bestehen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die Bildung von mehr oder auch größeren FeS-Partikeln sein.

In ergänzenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich die phänomenologisch beschriebene Reversibilität der FeS-Fällung auch mittels REM-EDX belegen lässt. Von der Annahme ausgehend, dass sich gebildetes FeS bei abnehmender H<sub>2</sub>S-Konzentration in der Vesikeldispersion wieder auflöst, wurden in Vergleichsexperimenten CdS-haltige Polymersomen unter analogen Bedingungen hergestellt. CdS weist ein im Vergleich zu FeS um mehr als acht Größenordnungen niedrigeres Löslichkeitsprodukt von  $K_L = 10^{-27} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$  auf [63] und ist somit deutlich schwerlöslicher als FeS. Darum sollten in Polymersomen gebildete CdS-Partikel unter identischen Lagerungsbedingungen signifikant stabiler als FeS-Partikel sein.

Als Analysenmethode zum Vergleich verschiedener Lagerungsbedingungen bot sich die ESMA an. Mit dieser Methode kann der prozentuale Anteil aller vorhandenen Elemente in dem untersuchten Bereich der Probe ermittelt werden. Aus den prozentualen Anteilen der einzelnen Elemente können bei ausreichender Analytenmasse normierte Elementkonzentrationen von Fe, Cd und S bestimmt werden, die dann zum Vergleich verschiedener Proben herangezogen werden können. Um ausreichende Mengen der zu bestimmenden Elemente für die ESMA zu gewährleisten, wurden Polymersomenproben durch intensives Überleiten von Argon zunächst eingengt, um eine höhere Polymersomenkonzentration zu erreichen. Anschließend wurden die aufkonzentrierten Polymersomendispersionen mit H<sub>2</sub>S inkubiert und dann unter Argon-haltiger H<sub>2</sub>S-Atmosphäre, unter Argon-Atmosphäre sowie an Luft gelagert. Mit der Präparation wurden Polymerfilme, nicht

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)



**Abb. 39:** REM-ESMA von FeS-haltigen (links) und CdS-haltigen (rechts) Polymersomen nach 24-stündiger Lagerung unter verschiedenen Bedingungen (unter inerte H<sub>2</sub>S-Atmosphäre, unter Argon sowie an Luft (O<sub>2</sub>)): Darstellung der jeweiligen normierten Elementkonzentration von S, Fe und Cd

diskrete Vesikel, auf dem Probenträger aufgebracht und untersucht, um eine ausreichende Menge der Analyten für eine qualitative EDX-Analyse zu gewährleisten.

Ist die Verringerung der H<sub>2</sub>S-Konzentration in der Polymersomendispersion tatsächlich die Ursache für das Auflösen von FeS-Partikeln, so sollte in der FeS-haltigen Polymersomendispersion die Konzentration von Schwefel (im Vergleich zur Fe-Konzentration) bei Lagerung unter Argon bzw. an Luft deutlich geringer als bei der Lagerung unter H<sub>2</sub>S sein. Für CdS-haltige Polymersomen hingegen sollten die Lagerungsbedingungen wenig Einfluss auf die normierte S-Konzentration in den Proben haben. Die Ergebnisse der REM-EDX-Untersuchungen für Polymersomen, die mit einer Startkonzentration von 60 mM FeCl<sub>2</sub> bzw. CdCl<sub>2</sub> hergestellt wurden und schließlich nach der H<sub>2</sub>S-Inkubation 24 Stunden unter verschiedenen Bedingungen gelagert wurden, sind in Abb. 39 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass FeS-haltige Polymersomen unabhängig von der Lagerung eine nahezu konstante Fe-Konzentration aufweisen. Überdies existiert eine starke Abhängigkeit der S-Konzentration von den Lagerungsbedingungen. So ist die S-Konzentration bei Lagerung unter H<sub>2</sub>S-Atmosphäre mehr als doppelt so hoch wie bei Lagerung an Luft und mehr als achtmal so hoch wie bei Lagerung unter Argon. Der höhere Schwefelge-

halt bei Lagerung an  $O_2$  im Vergleich zur Lagerung unter Argonatmosphäre kann mit der Oxidation von  $H_2S$  zu elementarem Schwefel oder Sulfat durch Luftsauerstoff oder durch unter diesen Bedingungen gebildeten  $Fe^{3+}$ -Ionen [84] erklärt werden. Die Bildung von  $S_8$  aus FeS-haltigen Polymersomendispersionen bei Lagerung an Luft konnte mittels MS belegt werden (s. Kapitel 3.3.1). Die Ergebnisse der REM-EDX für FeS-haltige Polymersomen belegen somit eindeutig die Abnahme der S-Konzentration bei anderen Lagerungsbedingungen als unter  $H_2S$ -Atmosphäre. Die Hypothese, dass die Abnahme der S-Konzentration auch das Auflösen des FeS-Niederschlags zur Folge hat, wird durch die Resultate der REM-EDX-Untersuchungen von CdS-haltigen Polymersomen gestützt. Bei diesen werden bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen fast identische Konzentrationsverhältnisse von Cd zu S erhalten. Lediglich bei der unter Argon gelagerten Probe wurde eine geringfügig niedrigere normierte Cd-Konzentration detektiert. Die Resultate der REM-EDX-Untersuchungen belegen die Koinzidenz der Abnahme der Schwefelkonzentration (vermutlich in Form von  $S^{2-}$ ,  $HS^-$  und  $H_2S$ ) und dem Rückgang der dunklen Verfärbung von FeS-haltigen Polymersomen bei Lagerung in Abwesenheit von  $H_2S$ .

Die Erhöhung der  $H_2S$ -Konzentration in FeS-haltigen Polymersomendispersionen, die sich während der Lagerung entfärbt hatten, führte zu einer erneuten dunklen Verfärbung solcher Proben. Diese Beobachtung und die Ergebnisse der REM-EDX-Untersuchungen belegen, dass der maßgebliche Faktor für die Stabilität des intravesikulär ausgefällten FeS die  $H_2S$ -Konzentration in der Polymersomendispersion ist.

Ein Einfluss der beiden anderen am Beginn des Kapitels angeführten möglichen Ursachen auf die Entfärbung von mit  $H_2S$  begasten,  $Fe^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen konnte nicht bestätigt werden. Schließlich konnte bei der Begasung entfärbter Proben auch in Gegenwart eines Überschusses an extravasikulärem EDTA eine Wiederholung der FeS-Fällungsreaktion beobachtet werden. Folglich müssen die FeS-Fällungsreaktion, die Entfärbung und auch die erneute FeS-Fällung intravesikuläre Vorgänge sein, die durch die  $H_2S$ -Konzentration in der Probe bestimmt werden (vgl. Abb. 31, 32).

Frisch gefälltes, amorphes Eisensulfid weist eine deutlich höhere Reaktivität auf als gealtertes FeS [50, 87]. Von diesem Befund ausgehend wurde untersucht, ob sich die Lagerung von FeS-haltigen Polymersomendispersionen bei erhöhter Temperatur positiv auf die Stabilität des FeS-Niederschlags auswirkt. Durch die erhöhte Temperatur werden Kristallisationsprozesse ausgelöst, wie sich in Vergleichsexperimenten zeigte. Die Tests bei verschiedenen Temperaturen waren auch in Hinblick auf die Charakterisierung der thermischen Stabilität von Polymersomen wichtig, da die Reaktion von FeS und  $H_2S$

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

in Vesikeln bei erhöhten Temperaturen untersucht werden sollte. Es zeigte sich, dass FeS-haltige Polymersomendispersionen mehr als fünf Stunden bei Temperaturen von 85°C unter H<sub>2</sub>S-Atmosphäre stabil waren. Bei deutlich längeren Lagerungszeiten traten größere Aggregate in der Dispersion auf. Im Verlauf der Lagerung bei 60°C wurde das Auftreten von Aggregaten erst nach mehr als 24 Stunden beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass FeS-haltige Polymersomen nicht ausreichend stabil für die von *Drobner et al.* [50] verwendeten Reaktionszeiten und -temperaturen (14 Tage bei 100°C) für die Reaktion von FeS und H<sub>2</sub>S sind. Dennoch sollten die intravesikulären FeS-Partikel aufgrund des sehr großen Oberfläche-Volumen-Verhältnisses eine hohe Reaktivität aufweisen (vgl. [88]). Somit könnte auch schon bei 60 - 80 °C eine Umsetzung des gebildeten FeS in Polymersomen mit H<sub>2</sub>S erfolgen.

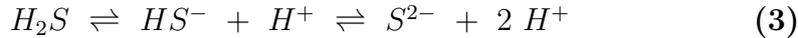
Auch bei erhöhter Temperatur von 60°C bis 85°C gelagerte FeS-haltige Polymersomen konnten nach der Entfärbung durch erneute Inkubation mit H<sub>2</sub>S wieder dunkel verfärbt werden.

#### 3.3.5 Diskussion - FeS-haltige Polymersomen

Vesikelstabilitätstests von leeren, extrudierten Polymersomen in Gegenwart von FeS zeigten, dass Polymersomen länger als 48 Stunden stabil gegenüber FeS sind. Während der mittlere Durchmesser konstant blieb, konnte eine Zunahme des PDI sowie in Cryo-TEM-Untersuchungen eine Veränderung der Form der Polymersomen hin zu mehr ellipsoiden Vesikeln beobachtet werden. Es wurden indes keine aggregierten Vesikel visuell oder bei Cryo-TEM-Aufnahmen beobachtet. Bei der Generierung von FeS in extrudierten, Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen wurde zwar eine Größenzunahme mittels PCS festgestellt. Allerdings wiesen die fraglichen Polymersomendispersionen nach fünf Tagen wieder dieselbe mittlere Vesikelgröße wie vor der Inkubation mit H<sub>2</sub>S auf. Da unter den Lagerungsbedingungen keinerlei Sedimentation beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass Polymersomen auch mit intravesikulärem FeS stabil sind. Die beobachtete Größenzunahme kann auf die Anwesenheit von H<sub>2</sub>S-Gasbläschen zurückzuführen sein, die sich nach fünf Tagen aufgelöst hätten.

Zur Ausfällung von intravesikulärem FeS in aufgereinigten, Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen eignen sich sowohl eine H<sub>2</sub>S-haltige Pufferlösung als auch gasförmiges H<sub>2</sub>S. Letzteres bewirkt eine deutlich raschere und intensivere Dunkelfärbung der inkubierten Proben. Dies liegt u.a. daran, dass das ungeladene H<sub>2</sub>S-Molekül die Spezies mit der höchsten Mem-

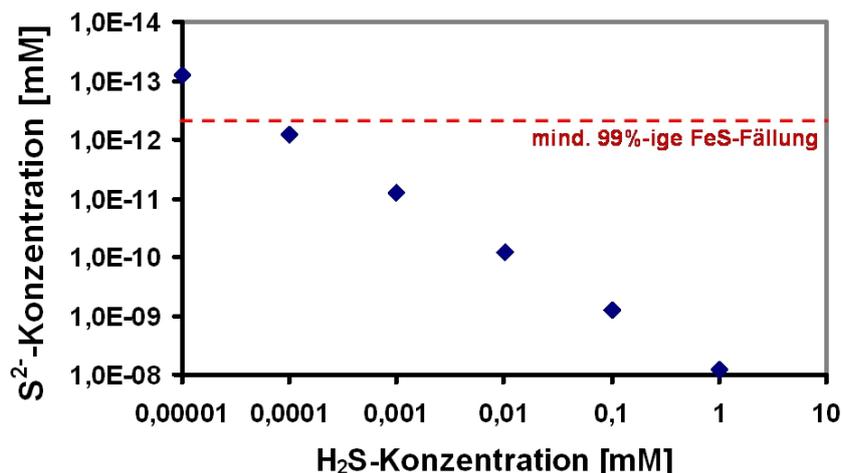
branpermeabilität [20] unter den ebenfalls im pH-abhängigen Gleichgewicht vorliegenden  $\text{HS}^-$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen ist:



Bei der Begasung mit  $\text{H}_2\text{S}$  erfolgt eine rasche Erhöhung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration ohne Verdünnung der Dispersion. Die beim Mischen einer  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersion mit  $\text{H}_2\text{S}$ -haltiger Pufferlösung unvermeidliche Verdünnung dürfte für die Verlangsamung der FeS-Fällungsreaktion sowie eine visuell schwächere Verfärbung verantwortlich sein. Das intravesikuläre Fällungsreagenz von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ist dennoch das in einer deutlich geringeren Konzentration vorliegende  $\text{S}^{2-}$ -Ion, welches im pH-abhängigen Gleichgewicht mit  $\text{H}_2\text{S}$  steht (s. Reaktion 3). Bei dem im Inneren von  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Vesikeln vorliegenden pH 7,4 beträgt die  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration das  $10^5$ -fache der  $\text{S}^{2-}$ -Konzentration. Damit liegt im Gleichgewicht ein einziges  $\text{S}^{2-}$ -Ion neben ca. 100000  $\text{H}_2\text{S}$ -Molekülen vor. Dennoch sollte die Ausfällung von 99,9 % der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als FeS bei diesem pH-Wert theoretisch schon bei einer intravesikulären  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  erfolgen. Dieser Wert ist mithilfe der  $\text{pK}_\text{S}$ -Werte von  $\text{H}_2\text{S}$  sowie dem Löslichkeitsprodukt von FeS von  $K_L = 10^{-18} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$  [63] ermittelbar. Die Quantifizierung von Eisen in aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen ergab einen Wert von  $0,35 \text{ mM}$  (Abb. 27). Da dieser Wert die  $\text{Fe}^{2+}$ -Gesamtkonzentration in der Vesikeldispersion angibt, das interne Volumen aber nur einen Teil des Gesamtvolumens ausmacht, liegt die intravesikuläre  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration deutlich höher.

Um mindestens 99 % der intravesikulären  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als FeS auszufällen, muss die interne  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration auf  $3,5 \mu\text{M}$  sinken und gleichzeitig das Produkt der  $\text{Fe}^{2+}$ - und der  $\text{S}^{2-}$ -Konzentration höher als das Löslichkeitsprodukt von FeS sein. Folglich muss die  $\text{S}^{2-}$ -Konzentration  $\geq 2,9 \cdot 10^{-13} \text{ mM}$  sein. Der Zusammenhang zwischen der  $\text{S}^{2-}$ -Konzentration und der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration bei pH 7,4 ist in Abb. 40 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ab einer intravesikulären  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  die Voraussetzung zur Ausfällung von mindestens 99 % der  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als FeS bei einer verbleibenden  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von unter  $10^{-5} \text{ mM}$  gegeben sind.

Zur Veranschaulichung der besonderen Bedingungen im Inneren von Polymervesikeln dient eine Kalkulation der Anzahl an  $\text{S}^{2-}$ -Ionen, die bei einer  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentrationen von  $1 \text{ mM}$  und pH 7,4 in einem  $1000 \text{ nm}$  großen Vesikel statistisch im Gleichgewicht vorliegen. Die Berechnung ergibt, dass durchschnittlich nur  $2,6 \text{ S}^{2-}$ -Ionen in einem Vesikel vorliegen. Diese geringe Menge sollte allerdings theoretisch zur FeS-Fällung ausreichen,



**Abb. 40:** Abhängigkeit der  $S^{2-}$ -Konzentration von der  $H_2S$ -Konzentration bei pH 7,4: Bei einer intravesikulären  $Fe^{2+}$ -Konzentration von 0,35 mM und einer intravesikulären  $H_2S$ -Konzentration  $\geq 0,1 \mu M$  werden 99 % der internen  $Fe^{2+}$ -Ionen als FeS ausgefällt, da die  $S^{2-}$ -Konzentration unter diesen Bedingungen noch  $\geq 2,9 \cdot 10^{-13}$  mM ist.

da  $S^{2-}$ -Ionen durch die Fällung aus dem pH-abhängigen Gleichgewicht (vgl. Reaktion 3) entzogen werden und bei gepufferter Lösung das Gleichgewicht auf die Seite der  $S^{2-}$ -Ionen verschoben wird (Prinzip von LeChatelier).  $Fe^{2+}$ -Ionen liegen in einem deutlichen Überschuss im Vergleich zu den  $S^{2-}$ -Ionen vor, da sich bei einem 1000 nm großen Vesikel mit einer internen  $Fe^{2+}$ -Konzentration von 3 mM ca. 950000  $Fe^{2+}$ -Ionen bzw. mit einer internen  $Fe^{2+}$ -Konzentration von 0,3 mM ca. 95000  $Fe^{2+}$ -Ionen im Vesikelinneren befinden. Bei der Quantifizierung von aufgereinigten,  $Fe^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen wurde ein  $Fe^{2+}$ -Gesamtkonzentration der Dispersion von ca. 0,35 mM erhalten. Die mittlere interne  $Fe^{2+}$ -Konzentration liegt deutlich höher, da die Polymersomen nur einen Teil des Dispersionsvolumens einschließen. Da das Löslichkeitsprodukt von FeS im Vesikelinneren schon bei einer  $H_2S$ -Konzentration von  $0,1 \mu M$  deutlich überschritten wird, sollten durch die  $H_2S$ -Inkubationsbedingungen mindestens 99 % der  $Fe^{2+}$ -Ionen im Vesikelinneren als FeS ausgefällt werden.

Verringert sich nach der Ausfällung von FeS die  $H_2S$ -Konzentration in der Lösung während der Lagerung, so verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen  $H_2S$  und  $S^{2-}$ -Ionen wieder auf die linke Seite. Eine Verringerung der Elementkonzentration von Schwefel in FeS-haltigen Polymersomendispersionen bei Lagerung an Luft oder Argon im Vergleich zur Lagerung unter  $H_2S$ -Atmosphäre konnte mittels REM-EDX bestätigt werden. Diese Abnahme ist vermutlich auf das Entweichen von  $H_2S$  zurückzuführen, das in gepuffer-

ter Lösung mit der Abnahme der Konzentration freier  $\text{HS}^-$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen einhergehen würde. Dadurch könnten sich auch intravesikuläre FeS-Aggregate auflösen, wenn das Produkt der  $\text{Fe}^{2+}$ - und der  $\text{S}^{2-}$ -Ionen unter das Löslichkeitsprodukt von FeS sinkt. Ein solcher Vorgang ist nur für sehr kleine FeS-Aggregate, die ein sehr großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen aufweisen, unter den speziellen Bedingungen der Kompartimentierung denkbar. Für makroskopische FeS-Partikel ist eine solche Reversibilität der Fällungsreaktion nicht bekannt.

Die optische Aufhellung von zuvor dunkel verfärbten, FeS-haltigen Polymersomen konnte durch eine erneute Erhöhung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration im Verlauf einer zweiten Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  wieder rückgängig gemacht werden. Diese wiederholte Ausfällung von FeS konnte auch in Gegenwart eines Überschusses an extravasikulärem EDTA stattfinden. Dies beweist, dass die ablaufenden Prozesse von FeS-Fällung, -Auflösung und erneute -Ausfällung im Vesikelinneren stattfinden.

Nur beim Einschluss von höheren  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen über 500 mM wird während der Inkubation mit gasförmigem  $\text{H}_2\text{S}$  kurzzeitig eine orange Verfärbung der Polymersomendispersion beobachtet (s. Abb. 29). Dieser Effekt könnte auf die besonderen Bedingungen der Sulfidierung von kompartimentierten  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ -Aggregaten, d.h. die Umwandlung des  $\text{Fe}(\text{II})$ -hydroxids in ein Eisensulfid, zurückzuführen sein [89]. Bei dieser Reaktion bilden sich FeS-Kristallisationskeime auf vorhandenen  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ -NP, wobei als Zwischenstufe FeS-Nanocluster mit besonderen optischen Eigenschaften gebildet werden könnten. Derartige Eigenschaften sind von einer Vielzahl von nanopartikulären Substanzen bekannt [13]. Das Wachstum dieser Nanocluster im Verlauf der Reaktion führt dann vermutlich zur Ausbildung von größeren, grau-schwarzen FeS-Aggregaten.

Die bei der Inkubation von aufgereinigten  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-haltigen Polymersomen mit  $\text{H}_2\text{S}$  auftretende Ausfällung von FeS konnte auch UV/Vis-spektroskopisch erfasst werden (Abb. 30). Es ist eindeutig eine zeitliche Abnahme der Absorptionsbande des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  zu beobachten. Gleichzeitig deutet die Zunahme der Streuintensität bei Wellenlängen unter 400 nm auf die Bildung von Partikeln hin. Vergleichbare Vorgänge wurden auch bei der UV/Vis-spektroskopischen Verfolgung der Inkubation einer 1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Lösung (in Gegenwart leerer POPC-Liposomen) mit  $\text{H}_2\text{S}$  beobachtet (s. Abb. 14, S. 33).

Der Nachweis der intravesikulären Ausfällung von FeS in Polymersomen konnte indirekt mithilfe mehrerer Kontrollen unter Verwendung von EDTA erbracht werden (Abb. 31, 32). Ein direkter Nachweis bzw. eine Visualisierung von intravesikulär gebildetem FeS in dis-

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

kreten Vesikeln gestaltete sich schwierig. Zwar deuten lichtmikroskopische Aufnahmen auf die vesikelassoziierte Bildung von dunklen Aggregaten hin. Allerdings lieferten ergänzende TEM- und Cryo-TEM-Untersuchungen keinen klaren Nachweis. Dies könnte mit einer zu geringen Größe der gebildeten FeS-Aggregate zusammenhängen. Auch in anderen Arbeiten wird von Schwierigkeiten bei der Visualisierung intravesikulärer Metallsulfide mittels TEM berichtet [19].

Durch die Erhöhung der intravesikulären  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration konnte zunächst die Bildung von intravesikulären, vermutlich hydroxidischen Niederschlägen in aufgereinigten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen bei Cryo-TEM-Untersuchungen beobachtet werden. Die Bildung dieser Aggregate kann auf die hohe  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration sowie den fehlenden Einsatz eines stabilisierenden Komplexanden wie PDC bei dem vorliegenden pH-Wert von 7,4 zurückgeführt werden. Die Sulfidierung des Niederschlags, d.h. die Umsetzung des Hydroxids mit  $\text{H}_2\text{S}$  [89], führte zum Auflösen des Hydroxids, wie Cryo-TEM-Aufnahmen belegen. Indes konnte nur bei wenigen Vesikeln die Bildung eines membran-assoziierten Niederschlags beobachtet werden. Vielmehr wurde das Auftreten fadenartiger Strukturen an oder in der Polymersomenmembran beobachtet. Ob es sich um eine andersartige Struktur des verwendeten PB-PEO oder aber um winzige Aggregate von FeS handelt konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden.

Gleichwohl konnten REM-Untersuchungen an diskreten Polymersomen die Bildung von intravesikulärem FeS untermauern. Die Aufnahmen mittels SE-Detektor bei verschiedenen Anregungsenergien belegen die Lokalisierung eines eisenhaltigen Niederschlags im Vesikelinneren. Das sich im Inneren von solchen Vesikeln mittels EDX-Detektor die Elemente Eisen und Schwefel nachweisen ließen, unterstützt die Annahme, dass es sich bei den visualisierten Niederschlägen um FeS handelt.

Bei der Lagerung von frisch präparierten, FeS-haltigen Polymersomen unter inerter  $\text{H}_2\text{S}$ -Atmosphäre bei erhöhten Temperaturen von 60 - 85 °C zeigte sich, dass Polymersomen unter diesen Bedingungen zumindest einige Stunden bis einen Tag stabil sind. Damit eignen sich Polymersomen zumindest prinzipiell für Untersuchungen zur Reaktion von FeS und  $\text{H}_2\text{S}$  (Berzelius-Reaktion) [84]. Hier sind zukünftige Untersuchungen vonnöten, die klären können, ob die Reaktion von FeS mit  $\text{H}_2\text{S}$  im Inneren von Polymersomen unter den Stabilitäts-limitierenden Bedingungen von Polymersomen abläuft.

### 3.4 Alternative Zugänge zu metallsulfidhaltigen Polymersomen

Zusätzlich zu dem ausführlich angewendeten Prinzip des schrittweisen Einschlusses von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Vesikeln, deren Aufreinigung und die anschließende FeS-Ausfällung durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  gibt es noch weitere Möglichkeiten, intravesikuläre Metallsulfide herzustellen.

Zum einen ist es für die Herstellung leichter löslicher Metallsulfide wie Eisensulfid denkbar, zunächst bei niedrigem pH-Wert ( $\text{pH} \leq 3$ )  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen gemeinsam mit gelöstem  $\text{H}_2\text{S}$  in Vesikeln einzuschließen und dann nach einer schnellen Aufreinigung (mittels GPC) extern eine Base ( $\text{OH}^-$ -Ionen) zuzugeben. Durch die Diffusion der  $\text{OH}^-$ -Ionen durch die Vesikelmembran sollte es zu einem Anstieg des internen pH-Wertes und damit zur internen Ausfällung von FeS kommen. Aufgrund eines Löslichkeitsproduktes von  $K_L = 10^{-18} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$  fällt FeS erst oberhalb von pH 4 aus [63].

Daneben bietet sich eine weitere Methode der homogenen, intravesikulären Metallsulfid-Fällung an. Dazu kann Thioacetamid zum Einsatz kommen, das als potenzieller  $\text{H}_2\text{S}$ -Produzent mit den meisten Übergangsmetallsulfid-Kationen nicht direkt reagiert und somit zusammen mit z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Vesikel eingeschlossen werden kann. Thioacetamid zerfällt bei erhöhten Temperaturen ( $60^\circ\text{C}$  bis  $85^\circ\text{C}$ ) durch Säurekatalyse unter Bildung von  $\text{H}_2\text{S}$ :



Die intravesikuläre Generierung von  $\text{H}_2\text{S}$  aus Thioacetamid sollte dann bei Überschreitung des FeS-Löslichkeitsprodukts zur Ausfällung von FeS führen.

Schließlich sollte auch der direkte Einschluss von FeS-NP in Polymervesikeln untersucht werden.

#### 3.4.1 Polymervesikel mit $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und $\text{H}_2\text{S}$ bei niedrigem pH-Wert

Es wurde eine  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung in einem mit  $\text{H}_2\text{S}$  gesättigten Citratpuffer (pH 3) hergestellt und dann zur Hydratisierung eines Polymerfilms verwendet. Nach der Aufreinigung kann durch die extravasikuläre Zugabe einer Base die Diffusion von  $\text{OH}^-$ -Ionen ins Innere induziert werden. Durch den Anstieg des internen pH-Wertes sollte die intravesikuläre Konzentration der  $\text{S}^{2-}$ -Ionen so stark ansteigen, dass das Löslichkeitsprodukt von FeS überschritten werden wird.

Zum Einschluss von Metallkationen und gelöstem  $\text{H}_2\text{S}$  in Vesikeln zur anschließenden

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

Ausfällung von intravesikulären Metallsulfiden sind keine Arbeiten bekannt. Allerdings gibt es Untersuchungen zur Permeabilität von  $\text{H}_2\text{S}$ , die darauf hindeuten, dass  $\text{H}_2\text{S}$  als lipophiles Molekül sehr rasch und fast ungehindert durch Lipiddoppelschichten diffundieren kann [18, 77, 90]. Die besondere Herausforderung bei dieser Methode bestand darin, aufgereinigte Vesikeldispersionen hinreichend rasch herzustellen, bevor signifikante Mengen intravesikulären  $\text{H}_2\text{S}$  durch die Vesikelmembran entweichen.

Dass das Prinzip der FeS-Generation über diesen Weg funktioniert, konnte in Lösung gezeigt werden. So kann eine 60 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung in einem  $\text{H}_2\text{S}$ -gesättigten Citratpuffer (pH 3) ohne Probleme hergestellt werden. Die schwach gelbliche Lösung verfärbt sich bei Zugabe einer geringen Menge konzentrierten  $\text{NH}_3$  rasch dunkel, und ein schwarzer Niederschlag fällt aus.

Ausgehend von diesem positiven Befund wurde unter inerten Bedingungen eine 60 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung in  $\text{H}_2\text{S}$ -gesättigtem Citratpuffer (pH 3) hergestellt. Mit dieser Lösung wurde ein PB-PEO-Polymerfilm hydratisiert, so dass eine 1,6 mM PB-PEO-Dispersion resultierte. Nach der Aufreinigung mittels Dialyse unter Verwendung von EDTA wurde eine farblose Dispersion erhalten.

Durch den Zusatz von 10  $\mu\text{l}$  konzentrierten  $\text{NH}_3$  zu 100  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Dispersion stieg der pH-Wert der Dispersion auf  $>11$ . Nach 15 Minuten war eine gelblich-graue Verfärbung der Dispersion erkennbar, die mehr als 24 Stunden bestehen blieb. In diesem Zeitraum konnten keinerlei Aggregate in der Dispersion beobachtet werden, was darauf hinweist, dass Polymersomen unter diesen Bedingungen stabil sind.

Die beobachtete dunkle Verfärbung deutet auf die Bildung von FeS hin. Über diese phänomenologischen Beobachtungen hinaus erfolgten keine weiteren Untersuchungen der Vesikeldispersion. Dieser Ansatz wurde aufgrund der umfangreichen Freisetzung von  $\text{H}_2\text{S}$  während der Dialyse nicht weiter verfolgt

#### 3.4.2 Polymervesikel mit internem Thioacetamid und Metallsalzen

##### Vorbemerkungen

Thioacetamid (TAA) ist in der qualitativen Analyse von Bedeutung als Reagenz zur Generierung von  $\text{H}_2\text{S}$ , da es gegenüber dem schwerer handhabbaren  $\text{H}_2\text{S}$  den Vorteil besitzt, dass schwerlösliche Metallsulfide direkt aus homogenen Lösungen ausgefällt werden können [63]. Das dafür notwendige  $\text{H}_2\text{S}$  wird beim Zerfall von TAA bei höheren Temperaturen durch Säurekatalyse gebildet (s. Reaktion 4), wobei die Zerfallsgeschwindigkeit

des TAA mit steigender Temperatur zunimmt [91]. Die TAA-induzierte Metallsulfidfällung im Sauren eignet sich insbesondere für schwerlösliche Metallsulfide wie PbS und CdS, die bei pH 0 ausgefällt werden können. Allerdings ist bekannt, dass die Fällungsreaktion meist verzögert und nicht ganz quantitativ erfolgt [63].

Die Ausfällung von FeS durch Reaktion von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen mit TAA wurde bisher lediglich im Inneren eines porösen Silicats beschrieben [92]. Da FeS nur oberhalb von pH 4 quantitativ ausgefällt werden kann, ist TAA als  $\text{H}_2\text{S}$ -Bildner unter Säurekatalyse nicht zur FeS-Fällung prädestiniert.

Immerhin ist eine intravesikulär induzierte CdS-Ausfällung durch Einsatz von TAA in Phospholipidvesikeln bekannt [93]. Die dort beschriebene Fällungsreaktion findet gleichwohl bei Raumtemperatur und verzögert statt.

Ausgehend von den offensichtlichen Einschränkungen bei der Wahl der Reaktionsbedingungen musste ein Puffersystem gefunden werden, das bei  $\text{pH} \geq 4$  die Ausfällung von FeS durch TAA ermöglicht. Davon ausgehend sollten das Konzentrationsverhältnis von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu TAA optimiert werden und die Geschwindigkeit der FeS-Fällungsreaktion näher charakterisiert sowie Ausbeuten der Fällungsreaktion bestimmt werden. Da bekannt ist, dass selbst deutlich schwerlöslichere Metallsulfide nicht quantitativ mit TAA ausgefällt werden, konnte auch für FeS nicht mit einer quantitativen Ausfällung gerechnet werden. Dennoch sollte aufbauend auf den Erfahrungen der FeS-Fällung in Lösung die Möglichkeit einer FeS-Fällung unter den Bedingungen der Kompartimentierung in PB-PEO-Polymersomen verifiziert werden.

#### **Untersuchungen zur TAA-induzierten Metallsulfidfällung in Lösung**

Zur TAA-induzierten Ausfällung von Metallsulfiden wurden die entsprechenden Lösungen im Wasserbad auf  $85^\circ\text{C}$  erhitzt. Es wurde mit einem fünffachen Überschuss an TAA in Bezug auf die Konzentration des Metallsalzes gearbeitet. Dieses Konzentrationsverhältnis erwies sich als optimal beim Arbeiten mit einer 100 mM Metallsalzlösung.

Zunächst wurde überprüft, ob  $\text{H}_2\text{S}$  aus TAA-Lösungen mit einem pH-Wert im Bereich von pH 2 - 7 beim Erhitzen freigesetzt wird. Dies konnte mittels  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -Papier bestätigt werden. Dennoch zeigte sich, dass sich beim Erhitzen einer 100 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung in 100 mM Citratpuffer in Gegenwart von 500 mM TAA im fraglichen pH-Bereich kein schwarzer FeS-Niederschlag bildet. Dieser Befund wurde sowohl beim Arbeiten an Luft als auch unter inerten Bedingungen erhalten. Vermutlich chelatisieren die als Puffer ver-

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

wendeten Citrationen effektiv  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, was die FeS-Fällung bei pH 5 inhibiert. Diese Vermutung konnte durch die Wahl eines alternativen Puffersystems bestätigt werden. Aus einer in 100 mM Acetatpuffer (pH 5) hergestellten 100 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung mit einem fünffachen Überschuss an TAA fällt beim inerten Erhitzen ein schwarzer Niederschlag aus. Beim Arbeiten an Luftsauerstoff wurde beim Erhitzen zunächst die Bildung eines rotbraunen Niederschlags (vermutlich  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) beobachtet, der sich nach und nach schwarz färbte. Folglich ist FeS auch bei pH 5 durch TAA in der Hitze ausfällbar, allerdings optimalerweise unter inerten Bedingungen und in Abwesenheit chelatisierender Citrationen.

Weiterhin wurde untersucht, wie schnell und in welchem Umfang sich FeS durch TAA aus einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung in 100 mM Acetatpuffer (pH 5) ausfällen lässt. Die zum Vergleich untersuchte Ausfällung von PbS aus einer 100 mM  $\text{Pb}^{2+}$ -Lösung (pH 1) bei fünffachem TAA-Überschuss läuft innerhalb von zwei Stunden ab. Im Gegensatz dazu ist die Ausfällung von FeS auch nach über fünf Stunden nicht vollständig abgelaufen, worauf eine erhebliche, noch in Lösung verbliebene  $\text{Fe}^{2+}$ -Menge hinweist.

Der Nachweis von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen konnte nur qualitativ als *Turnbulls Blau* unter Einsatz von  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  erfolgen. Die spektrophotometrische  $\text{Fe}^{2+}$ -Quantifizierung mittels 1,10-Phenanthrolin war aufgrund der störenden Reaktivität des nicht umgesetzten TAA in der Lösung nicht möglich. Indes konnte die Menge des nach fünf Stunden gebildeten schwarzen Niederschlags ermittelt werden. Dazu wurde der erhaltene schwarze Feststoff mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend vakuumgetrocknet. Es wurde eine Ausbeute von 40 % nach 30-stündigem Erhitzen auf  $85^\circ\text{C}$  ermittelt. Eine Behandlung einer identischen Lösung bei  $70^\circ\text{C}$  für 72 Stunden ergab eine Ausbeute an FeS von 7 %.

Der bei der Fällungsreaktion gebildete schwarze Feststoff wurde mittels Röntgenpulverdiffraktometrie charakterisiert. Es zeigte sich, dass es sich dabei hauptsächlich um Mackinawit ( $\text{FeS}$ ) handelt. Dies belegt, dass sich die Ausfällung von FeS durch TAA bewerkstelligen lässt, wobei die Reaktion erst bei Temperaturen von über  $80^\circ\text{C}$  mit akzeptablen Ausbeuten abläuft.

#### **TAA-induzierte FeS-Fällung in Polymersomen**

Zur Verifizierung der Möglichkeit einer intravesikulären, TAA-induzierten FeS-Fällung wurden Polymersomen unter inerten Bedingungen mit einer 100 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung mit 500 mM TAA in Acetatpuffer (pH 5) hergestellt. Nach der Aufreinigung mittels Dialyse

### 3.4 Alternative Zugänge zu metallsulfidhaltigen Polymersomen

in zwei Schritten wurden 300  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Polymersomendispersionen nach Zusatz von 100  $\mu\text{l}$  destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $85^\circ\text{C}$  erhitzt. Innerhalb von 15 Minuten bildeten sich in der Dispersion farblose Aggregate, die vermutlich auf die Zerstörung der in Dispersion befindlichen Polymersomen hindeuten. Die Dispersion verfärbte sich indes nicht dunkel. Es konnte unter diesen Bedingungen auch keine Entwicklung von  $\text{H}_2\text{S}$  detektiert werden, weder olfaktorisch noch mittels  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -Papier.

In einem weiteren Experiment wurden Polymersomen mit einer 500 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung mit 500 mM TAA in Acetatpuffer (pH 5) hergestellt. Diese Dispersion wurde in drei Schritten dialysiert, wobei im dritten Schritt eine Acetat-Pufferlösung mit 500 mM TAA zum Einsatz kam. Dieser extravasikuläre Zusatz von TAA sollte eine möglichst hohe intravesikuläre TAA-Konzentration gewährleisten, indem die Diffusion von TAA aus den  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen heraus durch einen externen TAA-Überschuss kompensiert wurde. Die aufgereinigte, farblose Polymersomendispersion wurde nun auf  $70^\circ\text{C}$  bzw.  $85^\circ\text{C}$  unter inerten Bedingungen erhitzt. Bei beiden untersuchten Temperaturen bildeten sich in der Polymersomendispersion farblose, sedimentierende Aggregate, die vermutlich auf aggregierte Polymersomen zurückzuführen sind. Daneben konnte die Entstehung von schwarzen, schwebenden Flocken nach längerer Reaktionszeit (45 min bei  $85^\circ\text{C}$  bzw. mehrere Stunden bei  $70^\circ\text{C}$ ) beobachtet werden. Das Auftreten eines schwarzen Feststoffs belegt die Bildung von FeS. Dass der schwarze Feststoff erst verzögert im Vergleich zu den beobachteten farblosen Polymeraggregaten auftritt, könnte an der vergleichsweise langsamen sauren Hydrolyse des TAA bei pH 5 liegen. Die FeS-Fällung läuft höchstwahrscheinlich nicht intravesikulär ab, da ihr die Bildung von Polymeraggregaten vorausgeht. Vermutlich entweichen verkapselte  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen aus kollabierenden Polymersomen und können dann mit dem nach und nach durch die saure Hydrolyse von TAA freigesetztem  $\text{H}_2\text{S}$  unter Bildung von feinen FeS-Niederschlägen reagieren. Die bei erhöhter Temperatur behandelten Polymersomendispersionen wurden mittels Lichtmikroskopie auf das Vorhandensein von Vesikeln untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich in der auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzten Probe, im Gegensatz zu der bei  $85^\circ\text{C}$  behandelten Probe, noch eine Vielzahl an Vesikeln befindet. Diese sind vorwiegend länglich und nicht mehr sphärisch geformt und weisen keinerlei erkennbare interne Niederschläge auf.

Die Untersuchungen zeigen, dass die TAA-induzierte FeS-Fällung in Gegenwart von Polymersomen ablaufen kann. Die moderate Temperaturstabilität der Polymersomen erwies sich als entscheidendes Hindernis für die intravesikuläre, TAA-induzierte FeS-Ausfällung, welche mit steigender Temperatur beschleunigt wird und mit höheren Aus-

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)

beuten abläuft. Die Diffusion des nur schwach polaren TAA durch die Polymersomenmembran könnte ebenfalls zu Verlusten an TAA während der Aufreinigung und damit zu nicht ausreichenden Mengen an  $\text{H}_2\text{S}$  während des Erhitzens für die FeS-Fällung führen. Die FeS-Fällungsreaktion konnte überhaupt nur bei Verwendung eines sehr hohen  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalts sowie einer hohen TAA-Konzentration intra- wie extravasikulär beobachtet werden. Dies bestätigt die bereits gewonnene Erkenntnis, dass die Ausbeuten der TAA-induzierten FeS-Fällungsreaktion nur gering sind. So werden  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Acetatpuffer (pH 5) selbst bei einem fünffachen Überschuss an TAA bei  $70^\circ\text{C}$  nur zu 7 % sowie bei  $85^\circ\text{C}$  nur zu 40 % als FeS ausgefällt. Eine geringe Ausbeute bei der TAA-induzierten FeS-Fällung entspricht Literaturhinweisen, nach denen schwer lösliche Metallsulfide mit TAA in der Hitze u.U. nicht quantitativ ausgefällt werden können [63].

#### 3.4.3 Polymervesikel mit FeS-Nanopartikeln

Generell ist bei der Art der Verkapselung von NP in Vesikeln zwischen hydrophoben und hydrophilen NP zu unterscheiden. Hydrophobe NP lagern sich bevorzugt im hydrophoben Inneren der Vesikelmembran ein, während hydrophile NP vorwiegend im wässrigen Inneren von Vesikeln lokalisiert sind [94]. Da FeS-NP hydrophil sind, sollte es möglich sein, diese im wässrigen Inneren von Polymersomen einzuschließen.

Von der erfolgreichen Einbettung hydrophiler Au- und hydrophober CdSe-NP in PB-PEO-Vesikel wurde bereits berichtet [94]. Dort wurden geringe Mengen hydrophiler Au-NP mit einer Größe von 12 nm in einer Suspension zur Hydratisierung eines PB-PEO-Polymerfilms eingesetzt. Bei der Bildung der Polymersomen konnte ein Teil der Au-NP im Inneren der Polymersomen eingeschlossen werden.

Hydrophile FeS-NP, die in einer Mikroemulsion hergestellt wurden (s. Kapitel 166), wurden nun auf ihre Eignung zum Einschluss in PB-PEO-Polymersomen untersucht. Es zeigte sich, dass sich durch die Hydratisierung von PB-PEO-Polymerfilmen mit einer FeS-NP-Suspension kein Einschluss von FeS in Polymersomen bewerkstelligen lässt. Vielmehr bildeten sich leere Polymersomen mit externen FeS-NP.

Die Behandlung eines PB-PEO-Polymerfilms mit einer wässrigen Suspension von frisch gefälltem FeS ergab dasselbe Resultat. Ein direkter Einschluss von vorgeformten FeS-NP bzw. FeS-Aggregaten in Polymersomen war nicht realisierbar.

Vermutlich ist das entscheidende Problem, dass die untersuchten FeS-NP im Wässrigen keine hinreichend stabile Suspension bilden. Durch die auftretende Sedimentation bzw.

### *3.4 Alternative Zugänge zu metallsulfidhaltigen Polymersomen*

Aggregation der FeS-NP kann die Hydratisierung eines Polymerfilms nicht bewerkstelligt werden. Auch im Fall des frisch gefällten FeS ist wahrscheinlich die Ausbildung von zu großen Aggregaten das entscheidende Hindernis, um FeS-Partikel in Vesikeln einzuschließen.

## 3.5 Eisenoxidhaltige Polymervesikel

### 3.5.1 Motivation

Die Herstellung und Charakterisierung magnetischer Liposomen wurde bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben (s. auch Kapitel 2.4). Dennoch ist die Einbettung von magnetischen NP in Liposomen eine Herausforderung, da die NP meist deutlich größer sind, als eine Liposomenmembran dick ist (3 - 4 nm), was zu Stabilitätsproblemen bei den hergestellten Magnetosomen führen kann [82]. Eine Alternative zur Herstellung von stabileren magnetischen Vesikeln ist darum der Einsatz von block-Copolymer-Vesikeln, die deutlich dickere Membranen aufweisen. Dafür können u.a. block-Copolymere mit einer biokompatiblen Polyethylenoxid-Hülle zum Einsatz kommen.

Der Einschluss von hydrophoben Eisenoxid-NP in Polymervesikel wurde bereits mehrfach beschrieben [82, 95, 96]. Die verwendeten Eisenoxid-NP wurden dabei im hydrophoben Inneren der Polymersomenmembran eingeschlossen und führten zur Ausbildung von oligolamellaren Vesikeln [82]. Die erhaltenen Polymersomen wiesen eine magnetophoretische Mobilität auf [82] bzw. konnten durch das Anlegen verschiedener externer Magnetfelder deformiert werden [95].

Allerdings sind bislang keine Studien bekannt, die den Einschluss hydrophiler Magnetit-NP im wässrigen Inneren von Polymersomen beschreiben. Solche Polymersomen würden sich, im Gegensatz zu Polymersomen mit hydrophoben Eisenoxid-Partikeln im Inneren der Membran, nicht in einem äußerlich angelegten Magnetfeld deformieren lassen und wären dadurch potenziell stabiler. Darum sollte untersucht werden, ob sich hydrophile Magnetit-NP, die eine Art Ferrofluid bilden, im Inneren von Polymersomen einschließen lassen und welche Eigenschaften solche Polymersomen aufweisen.

In einem anderen Ansatz sollten in Analogie zu den Untersuchungen zu magnetophoretischen Liposomen (s. Kapitel 2.4) ebenfalls schrittweise zunächst  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Polymersomen eingeschlossen und diese dann aufgereinigt werden. Durch Zugabe von  $\text{NH}_3$  und Lagerung an Luft sollte die intravesikuläre Ausfällung von Eisen(II,III)-oxid induziert werden, denn beim Mischen einer wässrigen Lösung mit stöchiometrischen Mengen an  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen mit einer starken Base bilden sich die entsprechenden Eisenhydroxide, die sehr rasch unter Bildung von Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) altern [80]. Dieser Ansatz, der bislang nur für die Herstellung von Eisen(II,III)-oxid-haltigen Liposomen beschrieben wurde [60], eröffnet einen weiteren, bislang nicht untersuchten Zugang zu stabileren, potenziell magnetophoretischen Vesikeln. Da das eingesetzte PB-PEO-block-Copolymer

eine biokompatible PEO-Hülle aufweist, ist es auch für das breite Anwendungsspektrum von Magnetit-haltigen Vesikeln als z.B. Röntgenkontrastmittel oder Anti-Tumor-Agenz äußerst interessant.

### 3.5.2 Polymersomen mit intravesikulär gebildeten Magnetit-Nanopartikeln

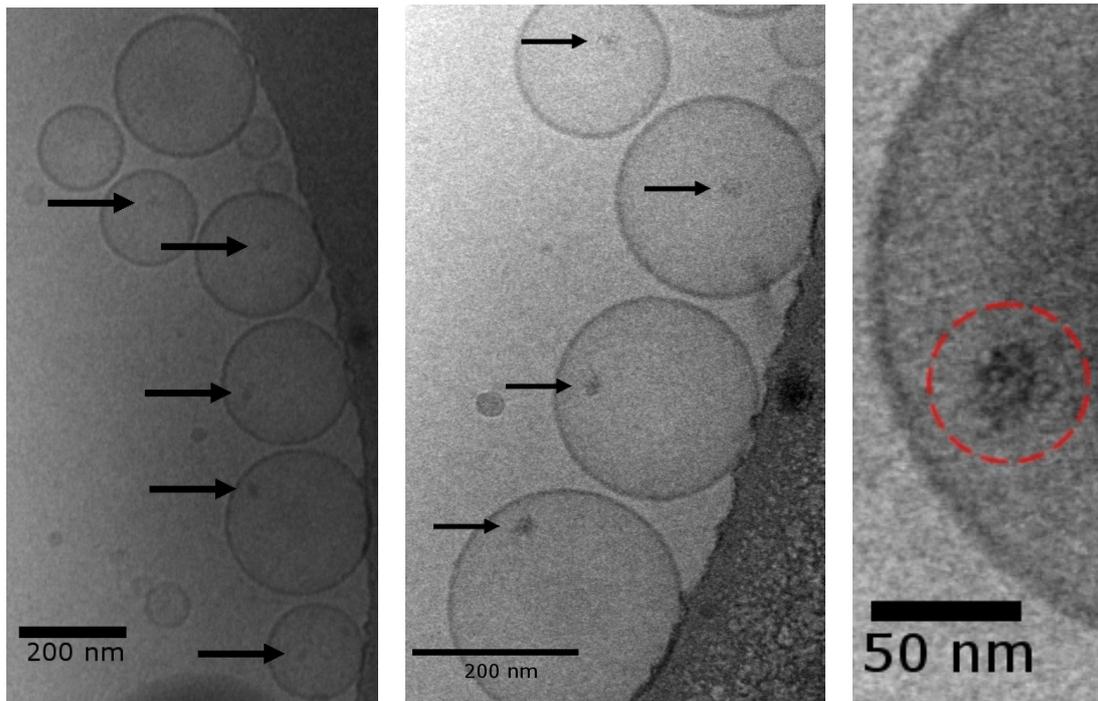
Ein alternativer Zugang zu Polymersomen mit intravesikulären Magnetit-NP stellt der sukzessive Einschluss von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen in Polymersomen und die nach der Aufreinigung erfolgende Inkubation mit  $\text{NH}_3$  an Luft dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auf diesem Weg magnetophoretische, Eisenoxid-haltige Vesikel (Liposomen) hergestellt werden können (s. Kapitel 2.4.2).

Ausgehend von diesem Prinzip wurde zunächst ein PB-PEO-Polymerfilm mit einer 60 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplex-Lösung hydratisiert. Die erhaltene Polymersomendispersion wurde in zwei Schritten sukzessive auf 100 nm extrudiert und anschließend mittels Dialyse in zwei Schritten unter Verwendung von EDTA aufgereinigt. Eine PCS-Untersuchung der erhaltenen, intensiv rosa gefärbten Dispersion ergab einen Z-Average von 146 nm ( $\text{PDI} = 0,247$ ).

Zur Generierung von intravesikulärem Magnetit wurden 80  $\mu\text{l}$  der Polymersomendispersion mit 17  $\mu\text{l}$  konzentriertem  $\text{NH}_3$  versetzt. Dabei trat eine sofortige Aufhellung der Dispersion auf, und die rötliche Färbung verschwand. Die erhaltene, schwach gelbliche Dispersion wurde 18 Stunden an Luft an einem Supermagneten gelagert. In diesem Zeitraum konnten keine Aggregationsprozesse am Supermagneten beobachtet werden.

Eine derart präparierte Dispersion wurde zusätzlich mittels Cryo-TEM untersucht, um zu verifizieren, ob sich intravesikuläre Eisenoxid-NP gebildet hatten. Es zeigte sich, dass ausschließlich unilamellare Vesikel in der Dispersion vorliegen. Fast alle Vesikel mit einer Größe  $> 150$  nm wiesen in der Tat diffuse dunkle, interne Aggregate mit einer Ausdehnung von 8 - 25 nm auf (s. Abb. 41). Vesikel ohne  $\text{NH}_3$ -Zugabe wiesen keine internen Aggregate auf. Der dunkle Kontrast der beobachteten Aggregate, die aus kleineren Partikeln im einstelligen Nanometerbereich bestehen (s. Abb. 41, rechts), ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich um eisenhaltige Aggregate handelt. Vergleichbare diffuse Aggregate konnten auch im Inneren von mittels RVE hergestellten,  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Liposomen nach Zugabe von  $\text{NH}_3$  und Lagerung an Luft, nicht jedoch im Inneren von mittels FHE hergestellten, extrudierten Liposomen nach identischer Behandlung beobachtet werden (s. Kapitel 2.4.2).

### 3 Eisenhaltige Polymervesikel (Polymersomen)



**Abb. 41:** Cryo-TEM-Aufnahmen von PB-PEO-Polymersomen nach Inkubation mit  $\text{NH}_3$  und Lagerung an Luft; diffuse, intravesikuläre Aggregate durch Pfeile indiziert; rechts: Vergrößerung eines 260 nm großen Polymersoms mit intravesikulär aggregierten Eisenoxid-NP (indiziert durch roten Kreis)

In der untersuchten Probe wurden weder visuell noch in der Cryo-TEM-Untersuchung Hinweise auf kollabierte Polymersomen gefunden, was die Stabilität von Polymersomen unter diesen stark alkalischen Bedingungen belegt. Die Lagerung der mit  $\text{NH}_3$  inkubierten Polymersomendispersion an einem Supermagneten bewirkte keine visuell erkennbare Aggregatbildung in der Nähe des Magneten. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die intravesikulären Magnetit-NP zu klein sind. Damit wäre die gerichtete, attraktive Wirkung des Supermagneten auf die Magnetit-NP zu gering im Vergleich zur ungerichteten Diffusionsbewegung der Polymersomen in der homogenen Dispersion.

#### 3.5.3 Polymersomen mit stabilisierten Magnetit-Nanopartikeln

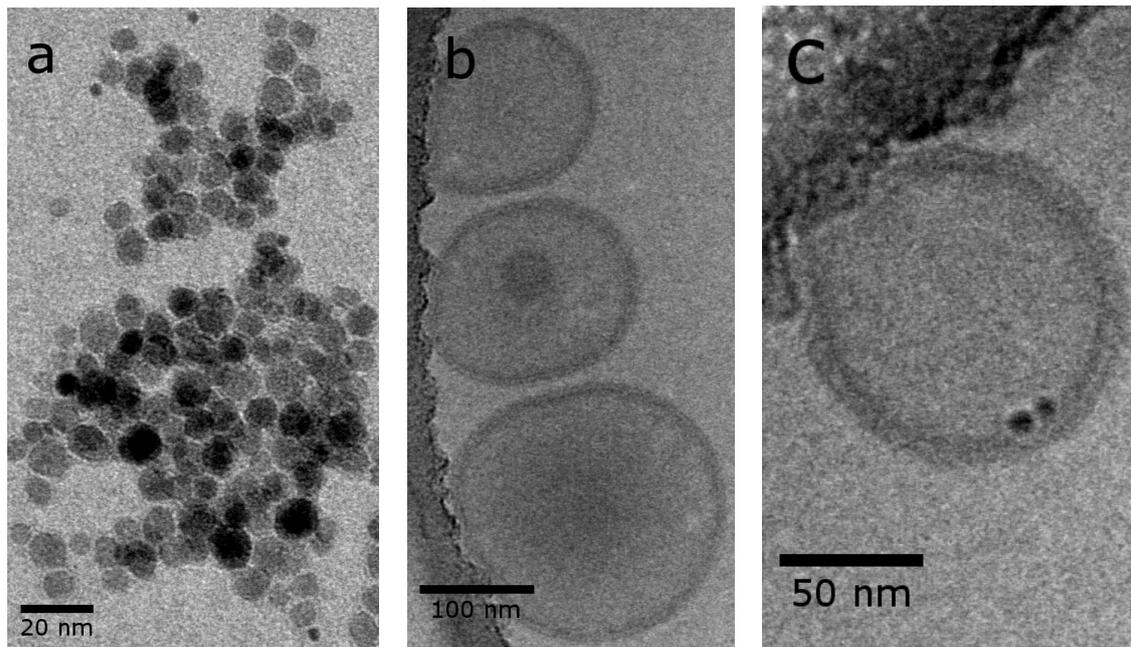
Für die Untersuchungen kamen zuvor hergestellte, mittels Triethylglykol (TREG) stabilisierte Magnetit-NP zum Einsatz, die in einer wässrigen, HCl-sauren Lösung bei pH 3 eine für mehrere Wochen stabile Suspension bilden (vgl. Kapitel 3.6.2). Die Magnetit-NP weisen eine Größe im Bereich von 4 - 8,5 nm auf.

Mit verschiedenen Verfahren wurde versucht, TREG-stabilisierte, hydrophile Magnetit-NP in PB-PEO-Polymersomen einzuschließen. Dafür kam eine Suspension von Magnetit-NP in salzsaurem H<sub>2</sub>O von 0,1 mg/ml zum Einsatz. Diese wurde zur Hydratisierung eines PB-PEO-Polymerfilms zur Herstellung einer 1,6 mM PB-PEO-Polymersomendispersion verwendet.

Zusätzlich wurde die Möglichkeit eines Einschlusses von Magnetit-NP in Polymersomen mittels THF- bzw. Ethanol-Injektion verifiziert. Dazu wurden je 5 mg PB-PEO in 100  $\mu$ l THF bzw. Ethanol gelöst und dann rasch über eine Kanüle in 900  $\mu$ l einer Magnetit-NP-Suspension injiziert. Die verwendete Menge an Magnetit-NP betrug dabei 0,1 mg/ml. Gleichwohl zeigten PCS- und UV/Vis-Untersuchungen der PB-PEO-haltigen Dispersionen, dass lediglich bei der Filmhydratisierungsmethode Vesikel gebildet wurden. Die beiden untersuchten Injektionsmethoden führten nicht zur Bildung von Polymersomendispersionen. Auch bei Einsatz einer geringeren Menge von Magnetit-NP von 0,05 mg/ml in einer wässrigen Suspension konnte weder bei der THF- noch bei der Ethanol-Injektion die Bildung von Vesikeln beobachtet werden.

Die über die FHE-Methode hergestellte, magnetithaltige Polymersomendispersion wurde durch GPC aufgereinigt, wobei zur Eluierung eine wässrige, HCl-saure Lösung (pH 3) verwendet wurde. Während Polymersomen rasch auf der Säule wandern, verblieben die Magnetit-NP auf der Säule. Eine Probe der aufgereinigten Polymersomendispersion sowie die verwendete Magnetit-NP-Suspension wurden mittels Cryo-TEM untersucht, um zu testen, ob Magnetit-NP im Inneren von Polymersomen eingeschlossen werden können. Die bei der Herstellung der Polymersomen eingesetzten Magnetit-NP weisen überwiegend Größen im Bereich von 4 - 8,5 nm auf und sind deutlich anhand ihres dunklen Kontrasts zu erkennen (s. Abb. 42a). Bei der Cryo-TEM-Untersuchung von aufgereinigten, potenziell magnetithaltigen Polymersomen wurden ausschließlich unilamellare Vesikel gefunden, von denen ein Großteil leicht defomiert ist (s. Abb. 42b). Weniger als 5 % der Vesikel auf den Cryo-TEM-Aufnahmen weisen überhaupt dunkle Magnetit-NP auf, die membranassoziiert sind. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 42c zu erkennen. Isolierte oder aggregierte Magnetit-NP wurden bei der Untersuchung nicht gefunden.

Der Einschluss von Magnetit-NP in Polymersomen mittels Filmhydratisierung gelingt also nur zu einem sehr geringen Anteil. Die wenigen beobachteten Magnetit-NP liegen höchstwahrscheinlich intravesikulär vor, da nach der GPC keinerlei externe Magnetit-NP in der aufgereinigten Polymersomendispersion gefunden wurden. Des Weiteren weisen die hergestellten Polymersomen deutliche Deformationen auf, die auf eine mögliche Wechsel-



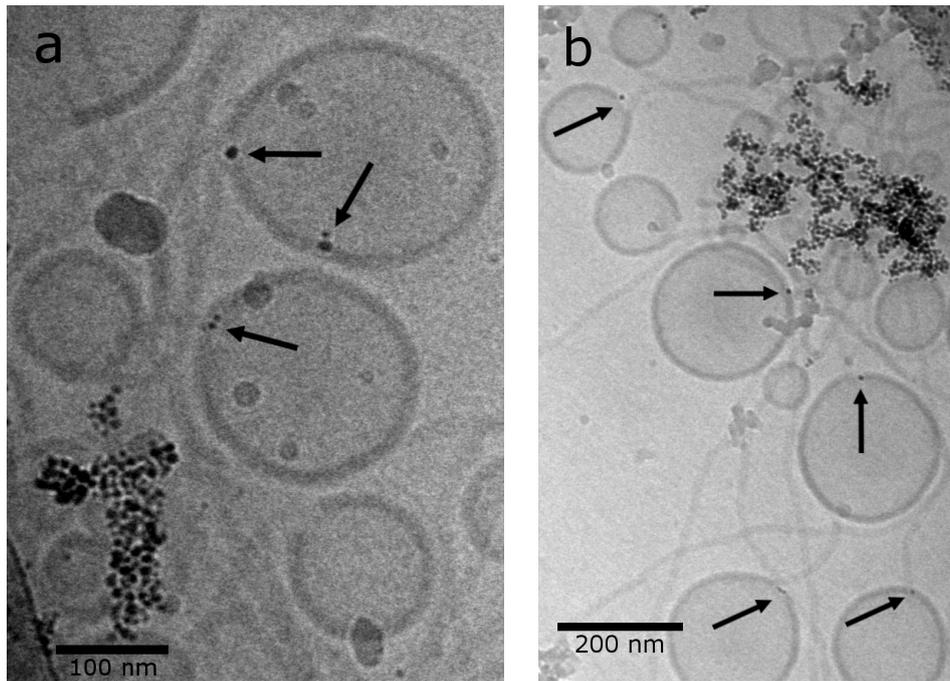
**Abb. 42:** Cryo-TEM-Aufnahmen von (a) Magnetit-Nanopartikeln und (b), (c) Polymersomen mit Magnetit-Nanopartikeln nach Aufreinigung mittels GPC

wirkung mit TREG-stabilisierten Magnetit-NP hinweisen. Der Stabilisator Triethylenglykol ist ebenso aus Ethylenoxid-Einheiten aufgebaut wie der PEO-Teil des PB-PEO, was Interaktionen wahrscheinlich macht.

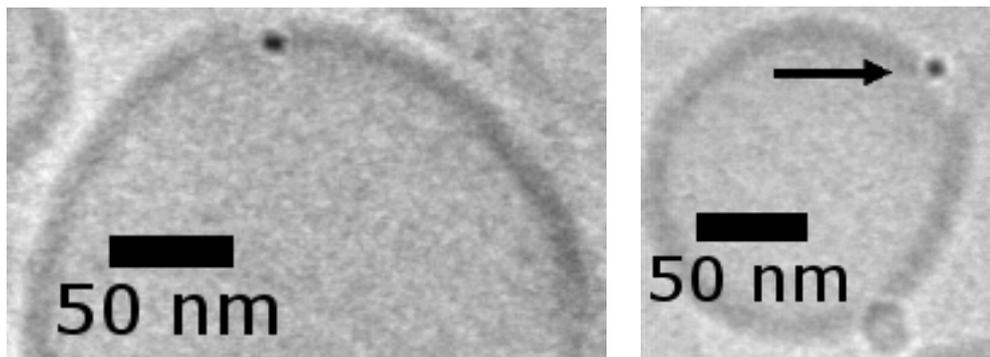
Um Belege für solche Wechselwirkungen zu finden, wurden auch nicht-aufgereinigte, potenziell magnetithaltige Polymersomen mittels Cryo-TEM untersucht. Repräsentative Aufnahmen einer solchen Probe sind in Abb. 43 zu sehen.

Es zeigte sich, dass ca. 30 % der Polymersomen auf den Cryo-TEM-Aufnahmen diskrete Magnetit-NP, der Rest keine NP aufweist. Die Magnetit-NP liegen vorwiegend als isolierte Aggregate bzw. auf den Stegen des Grids vor. Zudem sind schlauchförmige Strukturen des PB-PEO zu erkennen, die auf eine andere Packungsform des PB-PEO zurückzuführen sind. Solche Strukturen weisen auf ein vermutlich während der Lagerung chemisch verändertes PB-PEO hin, das damit auch andere amphiphile Eigenschaften aufweist.

Die Membran einzelner Polymersomen ist an der Kontaktfläche zu assoziierten Magnetit-NP deutlich deformiert bzw. gestört (s. Abb. 44). Folglich liegen diese Magnetit-NP wie eingesunken in der Membran vor und sind nicht im Inneren der Polymersomen eingeschlossen. Ob sich in der Probe auch Polymersomen mit internen Magnetit-NP befinden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 43:** Cryo-TEM-Aufnahmen von PB-PEO-Polymersomen, die mit einer Magnetit-Nanopartikel-Suspension hergestellt wurden; membranassoziierte Magnetit-NP mit Pfeilen indiziert



**Abb. 44:** Ausschnitt von Cryo-TEM-Aufnahmen von PB-PEO-Polymersomen mit Membran-deformierenden Magnetit-Nanopartikeln

### 3.5.4 Diskussion - Zugänge zu magnetithaltigen Polymersomen

Die zwei untersuchten Zugänge zu magnetithaltigen Polymersomen führten zu sehr unterschiedlichen Resultaten. Die beabsichtigte intravesikuläre Generierung von Magnetit-NP in aufgereinigten  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomen durch Zugabe von  $\text{NH}_3$  und Lagerung an Luft gelang nachweislich. So belegen Cryo-TEM-Aufnahmen eindeutig die Bildung von dunklen intravesikulären Aggregaten mit einer Ausdehnung von 8 - 25 nm. Diese können in Vesikeln mit Größen  $> 150$  nm beobachtet werden. Es wurden keinerlei Polymeraggregate in solchen Polymersomendispersionen beobachtet.

Gleichwohl zeigten Polymersomen mit intern generierten Aggregaten von Magnetit-NP keine visuell erkennbare Mobilität (Magnetophorese) im Magnetfeld eines Supermagneten. Die magnetische Wechselwirkung der Magnetit-Partikel mit dem angelegten Magnetfeld ist also zu gering, um eine beobachtbare, gerichtete Bewegung der Polymersomen zu induzieren. Dies könnte an einer zu geringen Größe der Magnetit-NP liegen. Die Erhöhung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Startkonzentration ist eine Möglichkeit, um eine höhere intravesikuläre  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration zu erreichen. Dies könnte zur Ausbildung größerer, interner Magnetit-NP führen, die die Magnetophorese von Polymersomen ermöglichen.

Dennoch ist bemerkenswert, dass überhaupt interne Aggregate mittels Cryo-TEM zu detektieren waren, da dies im Fall von Liposomen, die unter vergleichbaren Bedingungen mittels FHE hergestellt wurden, nicht der Fall war.

Ganz anders stellen sich die Ergebnisse der Experimente zum Einschluss von vorgeformten hydrophilen Magnetit-NP in Polymersomen dar. Nur die FHE-Methode erwies sich als geeignet, Polymersomen in einer Suspension von Magnetit-NP zu erzeugen. Eine Cryo-TEM-Untersuchung der aufgereinigten Polymersomendispersion zeigte indes, dass sich vorwiegend leicht deformierte Polymersomen gebildet hatten. Polymersomen mit Magnetit-NP fanden sich nur zu einem Anteil von  $< 5$  % in der Probe. Eine mögliche Ursache ist, dass Magnetit-NP in der verwendeten Suspension aggregieren und somit zu groß für den Einschluss in Polymersomen sind. Größere Aggregate von Magnetit-NP wurden zwar bei Cryo-TEM-Untersuchungen einer nicht aufgereinigten Polymersomendispersion mit Magnetit-NP gefunden, allerdings befand sich eine deutlich größere Anzahl isolierter Magnetit-NP als Polymersomen in der Probe.

Eine weitere mögliche Erklärung für den in meinen Arbeiten selten beobachteten Einschluss von Magnetit-NP in Polymersomen könnte eine zu starke Wechselwirkung der Magnetit-NP mit der Polymersomenmembran sein. Indizien dafür lieferte die Cryo-TEM-

Untersuchung einer nicht aufgereinigten, potenziell magnetithaltigen Polymersomendispersion. Dort konnte bei mehreren Polymersomen die Deformation der ca. 12 nm dicken Membran durch angelagerte Magnetit-NP beobachtet werden. Diese starke Deformation erscheint angesichts der Rigidität und Dicke der Polymersomenmembran erstaunlich. Allerdings kann dieser Effekt mit einer starken Wechselwirkung zwischen Triethylenglykol, dem Stabilisator der Magnetit-NP, und den Ethylenoxid-Einheiten des PEO-Teils der Polymersomenmembran erklärt werden, da diese beiden Komponenten strukturell identische Einheiten aufweisen. Dies ist eine plausible Erklärung für die beobachtete Einbuchtung der Polymersomenmembran durch Magnetit-NP (s. Abb. 44, Pfeile). Die damit verbundene starke Deformation eines Membransegments geht bei einigen Polymersomen sogar mit der Ausbildung schlauchförmiger Strukturen aus der Polymersomenmembran und damit der Zerstörung des Polymersoms einher (s. Abb. 43).

Die Vermutung, dass Polymersomenmembranen gegenüber Magnetit-NP stabiler als Liposomenmembranen sind, kann für den Einschluss von TREG-stabilisierten, hydrophilen Magnetit-NP nicht untermauert werden. Die Ursache dafür liegt höchstwahrscheinlich in der starken Wechselwirkung des Stabilisators TREG mit den PEO-Gruppen der Polymersomenmembran. Der Einsatz eines anderen Stabilisators für Magnetit-NP könnte die Wechselwirkungen mit der Polymersomenmembran reduzieren. Damit wäre eine höhere Stabilität der Polymersomen und ein effektiver Einschluss von Magnetit-NP in Polymersomen möglich.

## 3.6 Exkurs: Magnetit-Nanopartikel

### 3.6.1 Motivation

Die Intention der Untersuchungen lag in der Herstellung einer stabilen, wässrigen Suspension von Magnetit-NP, die zur Verkapselung von hydrophilen Magnetit-NP in Vesikeln eingesetzt werden sollte. Dazu mussten zunächst Magnetit-NP hergestellt und charakterisiert werden. In einem zweiten Schritt stand die Entwicklung einer Methode zur Generierung einer stabilen, homogenen Suspension von Magnetit-NP in einem wässrigen Lösungsmittel, einer Art „ferrofluid“, im Vordergrund.

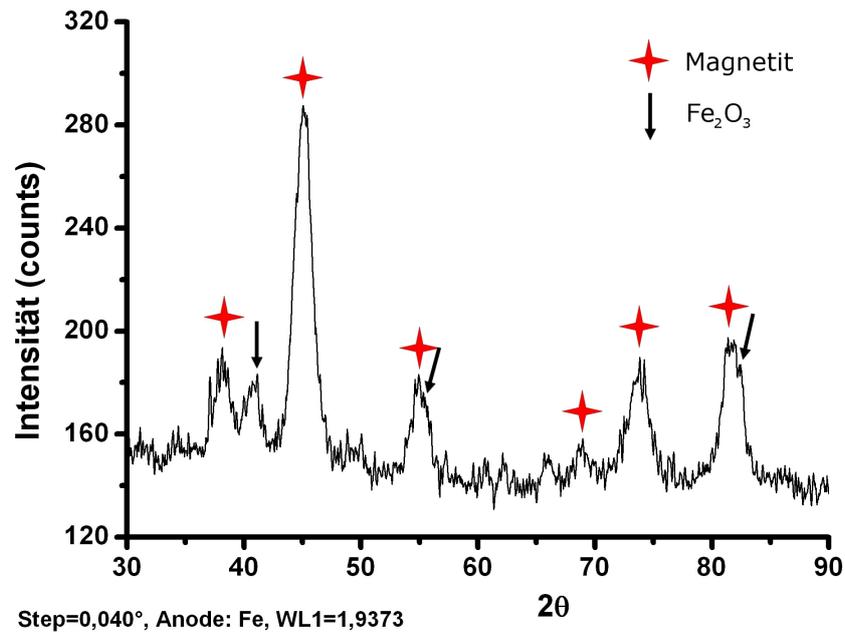
Magnetit-NP sind aufgrund ihrer besonderen magnetischen Eigenschaften vielfältig anwendbar, z.B. in der medizinischen Diagnostik oder Therapie (s. Kap. 1.1.2). Für die Herstellung von stabilisierten Magnetit-NP sind verschiedene Verfahren etabliert. So wird u.a. die Fällung von Magnetit aus einer wässrigen Lösung eines 2:1-Gemischs von  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{FeCl}_2$  durch die Zugabe von  $\text{NH}_3$  beschrieben [97]. Die entstandenen Magnetit-NP werden durch den anschließenden Zusatz des Tensids Tetramethylammoniumhydroxid in einer wässrigen Suspension stabilisiert [97].

Zudem sind unterschiedliche solvothermische Verfahren zur Generierung von Magnetit-NP bekannt. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung von Magnetit-NP durch die thermische Zersetzung von Fe(III)-acetylacetonat  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  in einer Triethylenglykol-Lösung (TREG), über die eine stabile wässrige Suspension von Magnetit-NP zugänglich ist [98, 99].

Hier wurde die Methode der solvothermischen Herstellung in TREG aufgrund des gut nachvollziehbaren Verfahrens ausgewählt.

### 3.6.2 Solvothermische Herstellung von Magnetit-Nanopartikeln

Die untersuchte solvothermische Herstellungsmethode von Magnetit-NP basiert auf der thermischen Zersetzung von  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ . Dazu wird TREG mit einem Siedepunkt von  $287^\circ\text{C}$  verwendet, das gleichzeitig drei Funktionen ausübt. Es wirkt als Lösungsmittel, teilweise als Reduktionsmittel zur Generierung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen aus  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  sowie als Stabilisator der gebildeten Magnetit-NP [98]. Dazu wurde zunächst eine geeignete Methode entwickelt, um die Reaktion bei solch hohen Temperaturen unter einer Argon-Atmosphäre durchführen zu können. Beim Erhitzen einer Lösung von  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  in TREG über ein definiertes Temperaturprogramm bis zum Rückfluss fällt aus der tiefroten Lösung ein schwarzer Feststoff aus. Dieser kann durch eine Ultrazentrifugation abgetrennt,



**Abb. 45:** Pulver-Röntgendiffraktogramm von Magnetit-NP, Peaklagen von Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) bzw.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  indiziert

durch mehrmaliges Waschen gereinigt und anschließend getrocknet werden.

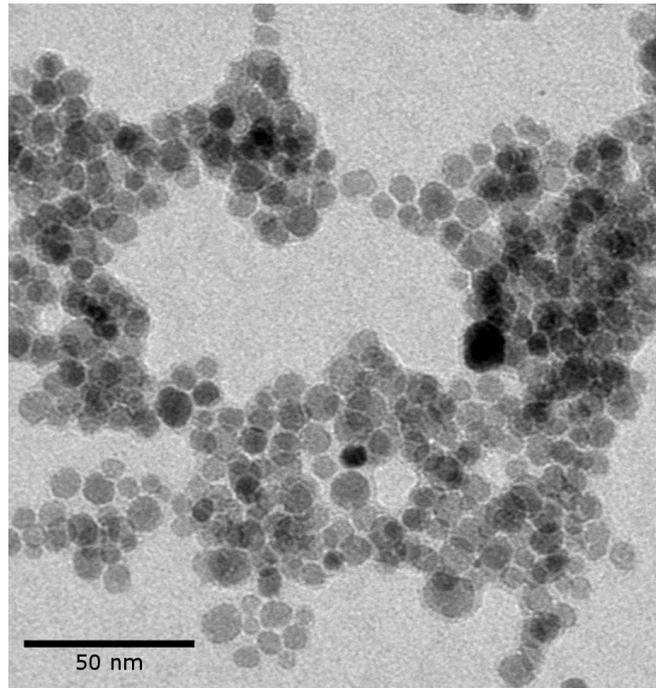
### 3.6.3 Charakterisierung von Magnetit-Nanopartikeln

#### Zusammensetzung

Der schwarze Feststoff wurde mittels PXRD charakterisiert, um abzusichern, dass es sich tatsächlich um Magnetit handelt. Das Diffraktogramm ist in Abb. 45 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die intensivsten Reflexe denen von Magnetit zugeordnet werden können. Dabei ist die Breite der gemessenen Reflexe ein gutes Indiz dafür, dass diese von sehr kleinen Partikeln (oder, weniger wahrscheinlich, von amorphen Anteilen) herrühren. Das Diffraktogramm deutet darauf hin, dass sich geringe Anteile an  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  als Nebenprodukt in der Probe befinden. Die hergestellten NP bestehen folglich hauptsächlich aus Magnetit.

#### Größenverteilung der Magnetit-Nanopartikel

Zur Ermittlung der Größe und der Größenverteilung der hergestellten Magnetit-NP wurden TEM-Untersuchungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die NP mehrheitlich nahezu sphärisch geformt sind (s. Abb. 46). Die Analyse mehrerer TEM-Aufnahmen



**Abb. 46:** TEM-Aufnahme von Magnetit-NP

hinsichtlich der Größe der abgebildeten NP ergab, dass diese Größen im Bereich von 3 - 14 nm aufweisen, wobei 90 % der NP einen Durchmesser zwischen 4 und 8,5 nm haben. Die NP liegen in losen Aggregaten vor, was auf das Eintrocknen der stabilen Suspension zurückzuführen ist.

#### **Dispergierbarkeit im wässrigen Milieu**

Da das Ziel der Arbeiten die Herstellung einer stabilen homogenen Suspension von Magnetit-NP war, wurde untersucht, wie sich Magnetit-NP im Wässrigen verhalten. Laut [98] bilden TREG-stabilisierte Magnetit-NP eine stabile wässrige Suspension. Da in [98] weitere Angaben über die Art der verwendeten wässrigen Lösung fehlen, musste ermittelt werden, bei welchem pH-Wert stabile Suspensionen von Magnetit-NP gebildet werden. Dazu wurden Suspensionen von 0,1 mg Magnetit-NP je Milliliter wässriger Lösung hergestellt und deren Stabilität mittels PCS verifiziert.

Es zeigte sich, dass Magnetit-NP eine mehrere Wochen stabile, braune Suspension in HCl-saurem H<sub>2</sub>O (pH 3) bilden, wie PCS-Messungen ergaben. Hingegen lassen sich Magnetit-NP in destilliertem H<sub>2</sub>O (pH 6) bzw. in mit NaOH auf pH 9 gebrachtem H<sub>2</sub>O nicht länger als 24 h suspendieren.

Ergänzend wurde getestet, ob sich Magnetit-NP zur besseren pH-Kontrolle ebenfalls in 100 mM Citratpuffer (pH 3) suspendieren lassen. Es konnte indes beobachtet werden, dass sich die ursprünglich braun gefärbte Magnetit-NP-Suspension bereits nach einem Tag gelb verfärbt hatte. In der gelben Lösung konnten keine Magnetit-NP mehr mittels Lichtstreuung detektiert werden. Vermutlich werden die Magnetit-NP durch Komplexbildung der  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen durch Citratanionen aufgelöst.

Bei der Lagerung einer stabilen Suspension von Magnetit-NP an einem Supermagneten aggregieren bräunlich gefärbte Schlieren am Supermagneten. Dies kann auf die Magnetophorese von Magnetit-NP zurückgeführt werden.

#### 3.6.4 Diskussion

Mit dem gewählten solvothermischen Ansatz konnten tatsächlich erfolgreich Magnetit-NP hergestellt werden. Mittels PXRD wurde abgesichert, dass es sich bei den generierten NP tatsächlich überwiegend um Magnetit-NP handelt. Die hergestellten Magnetit-NP weisen zu 90 % eine Größe von 4 - 8,5 nm auf und sind damit deutlich kleiner als in der Literatur beschrieben [98], wo eine mittlere Größe von 11 nm angegeben wird. Dort fehlt allerdings eine genauere Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung.

Es zeigte sich, dass sich die aufgereinigten NP für mehrere Wochen in einer schwach HCl-sauren Lösung bei pH 3 stabilisieren lassen. Bei höheren pH-Werten sind die hergestellten NP-Suspensionen lediglich etliche Stunden stabil. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass im wässrigen Milieu eine elektrostatische Stabilisierung der Magnetit-NP vorliegt, wobei niedrigere pH-Werte vorteilhaft sind. Vermutlich weisen die TREG-stabilisierten Magnetit-NP eine positive Oberflächenladung auf, so dass sie im sauren Milieu besser stabilisiert werden als im neutralen oder alkalischen Milieu (vgl. [100]).

Magnetit-NP in einer HCl-sauren, wässrigen Suspension zeigen wie erwartet Magnetophorese und eignen sich somit prinzipiell zur Herstellung von Magnetit-NP-haltigen, magnetophoretischen Vesikeln (s. Kapitel 2.4.3 und 3.5.3).

## 4 **Einschluss weiterer Übergangsmetalle in Polymersomen**

### 4.1 **Motivation**

Zusätzlich zum Einschluss von FeS in Polymersomen sollten Nanopartikel der Übergangsmetallsulfide NiS, CdS und CuS in Polymersomen ausgefällt werden, um den Prozess der Generierung intravesikulärer Metallsulfide intensiver zu beleuchten. Zudem können die Erkenntnisse dieser Untersuchungen zum Vergleich und zum besseren Verständnis der Ergebnisse, die bei der Herstellung FeS-haltiger Polymersomen erhalten wurden, dienen. Die zusätzlich zu charakterisierenden Übergangsmetallsulfide eignen sich insbesondere, da

- sie deutlich schwerer löslich sind als FeS und somit schon bei niedrigerem pH-Wert sowie bei gleichem pH-Wert mit höherem Umsatz im Vergleich zu FeS ausfallen.
- sie aufgrund der geringeren Löslichkeit im Vergleich zu FeS nach der Ausfällung stabiler sein sollten.
- im Gegensatz zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen sowie FeS weder die zur Herstellung eingesetzten zweiwertigen Kationen noch die gebildeten Metallsulfide oxidationsempfindlich sind.
- der Nachweis in Polymersomen erleichtert wird, da insbesondere Cd einen deutlich stärkeren Kontrast bei Cryo-TEM-Untersuchungen aufweist und somit besser detektiert werden kann.

Ausgehend von den Ansätzen zur Herstellung von FeS-haltigen Polymersomen wurden mit der FHE-Methode ebenfalls Metallchloride der Übergangsmetalle Nickel, Kupfer und Cadmium in Polymersomen eingeschlossen. Nach der Aufreinigung wurden entsprechend der Herstellung von intravesikulärem FeS durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  die jeweiligen Metallsulfide im Inneren von Polymersomen ausgefällt.

Die geplanten Untersuchungen mussten nicht unter Luftausschluss durchgeführt werden, da die verwendeten Metallsalze der zweiwertigen Ionen von Nickel (in Form von  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), Cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) und Kupfer (in Form von  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) nicht oxidationsempfindlich sind. Von den Metallsulfiden dieser Elemente ist nur eine Oxidation von NiS zu  $\text{Ni}_2\text{S}_3$  an Luft bekannt.

Das Löslichkeitsprodukt von FeS ( $K_L(\text{FeS}) = 10^{-18} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$  [63]) ist größer als das der anderen untersuchten Übergangsmetalle. So ist das Löslichkeitsprodukt von NiS um zwei Größenordnungen, das von CdS und CuS um neun bzw. 19 Größenordnungen kleiner als das von FeS [63]. Darum sollten die gebildeten Metallsulfide im Vergleich zu FeS, welches zudem auch noch oxidationsempfindlich gegenüber Luftsauerstoff ist, nach der Ausfällung deutlich stabiler und damit auch besser charakterisierbar sein. Der Einsatz nicht-inerter Arbeitstechniken erleichterte die experimentelle Durchführung der Arbeiten.

## 4.2 Nickelhaltige Polymersomen

### 4.2.1 Vorbemerkungen

Nickel ist von den drei untersuchten Übergangsmetallen dem Eisen chemisch am ähnlichsten. Die zweiwertigen Ionen beider Metalle gehören zur Ammoniumsulfidgruppe beim Kationentrennungsgang in der qualitativen Analyse [63], bei dem unter inerten Bedingungen auch FeS statt  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  ausfallen würde. NiS bzw.  $\text{Ni}_2\text{S}_3$  und FeS sind schwarze Feststoffe. Nickelhaltige Polymersomen wurden darum analog den eisenhaltigen Polymersomen umfassend charakterisiert.

### 4.2.2 Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen

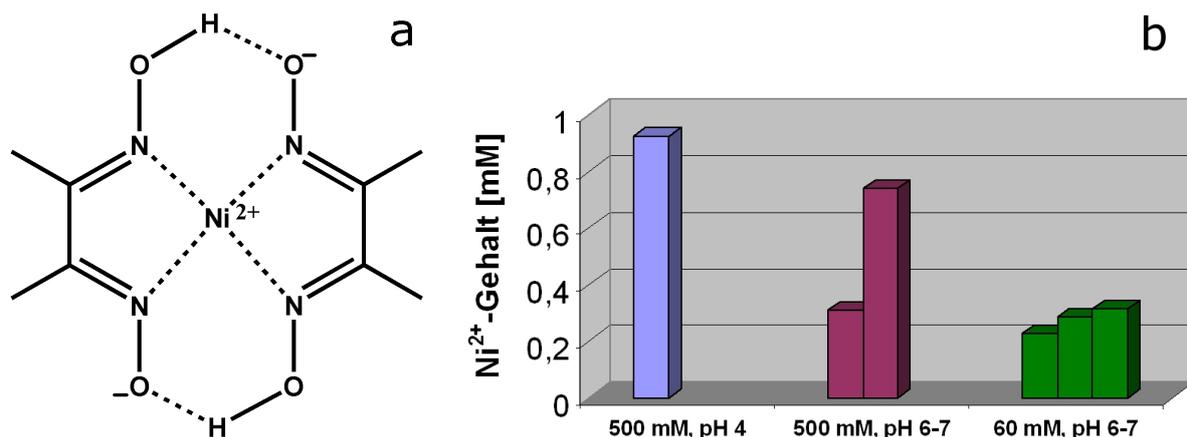
Analog zur Analyse eisenhaltiger Polymersomen sollte eine hinreichend empfindliche spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen gefunden und für die Quantifizierung von intravesikulären  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen optimiert werden. Zunächst wurde getestet, ob  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen mittels Dimethylglyoxim (dimegly) quantifiziert werden können.  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und dimegly bilden im alkalischen den neutralen Komplex  $[\text{Ni}(\text{dimegly})_2]$  (s. Abb. 47a), der intensiv rosa gefärbt und zudem schwerlöslich ist. Er eignet sich indes nicht nur zur gravimetrischen Bestimmung, sondern auch zur spektrophotometrischen Quantifizierung von Nickel. Es wurden zwei in der Literatur beschriebene Vorschriften [101] zur Bestimmung von  $\text{Ni}^{2+}$  mit dimegly hinsichtlich ihrer Eignung getestet. Es erwies sich als entscheidend, ein genaues Zeitregime bei der Präparation der zu vermessenden Lösungen einzuhalten, da sich die Absorption beim Absorptionsmaximum des Komplexes bei  $\lambda_{max} = 460 \text{ nm}$  nach der Präparation der Lösungen veränderte. Dies ist auf die langsame Oxidation der komplexierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Ni}^{3+}$ -Ionen zurückzuführen,

die zu Folgereaktionen am komplexierten dimegly-Liganden führt und damit zur Bildung anderer Komplexspezies mit veränderten Absorptionseigenschaften führt [101]. Um diese störende Reaktivität zu unterdrücken, erfolgte die Zugabe eines Oxidationsmittels zur quantitativen Oxidation von  $\text{Ni}^{2+}$ - zu  $\text{Ni}^{3+}$ -Ionen bei der Herstellung der Komplexlösungen. Es zeigte sich, dass sich nur beim Einsatz von Bromwasser im Rahmen einer modifizierten Variante nach [102] die Generierung eines Nickel-dimegly-Komplexes mit zeitlich konstanter Absorption realisieren ließ. Auf diesem Weg konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Mit dieser Bestimmungsmethode von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen (s. S. 162) wiesen die  $[\text{Ni}(\text{dimegly})_2]$ -Komplexlösungen für mehr als 60 Minuten eine konstante Absorption im Absorptionsmaximum auf. Zudem konnten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen auch in hinreichend geringen Mengen für die Analyse von  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen quantifiziert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde der Einfluss von THF und von PB-PEO auf die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit der  $\text{Ni}^{2+}$ -Bestimmungsmethode untersucht. Es zeigte sich, dass analog zur Eisenbestimmung Nickel ausschließlich mit der Standard-Additions-Methode quantifiziert werden konnte, da vorhandenes PB-PEO den Blindwert deutlich beeinflusst.

#### 4.2.3 Herstellung und Charakterisierung $\text{Ni}^{2+}$ -haltiger Polymersomen

Alle Präparationsschritte erfolgten an Luft. Es wurden analog zur Herstellung von eisenhaltigen Polymersomen mit der Filmmethode (s.S. 160)  $\text{NiCl}_2$ -Lösungen unterschiedlicher Konzentration in TRIS-HCl-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten in 1,6 mM PB-PEO-Polymersomen eingeschlossen. Eine Extrusion der hergestellten  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen erfolgte nicht. Nach der Aufreinigung mittels Dialyse wurden farblose Dispersionen erhalten, die eine große Verteilungsbreite der Vesikeldurchmesser aufwiesen. Zur Bestimmung des Nickelgehalts in aufgereinigten Polymersomendispersionen kam die zuvor optimierte Methode zur Quantifizierung von intravesikulären  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen zum Einsatz. Dazu wurden die Polymersomen zunächst mit einem Überschuss an THF aufgelöst. Daran anschließend erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung von Nickel mittels Standardaddition. Die Ergebnisse der Nickel-Bestimmung für verschiedene Ansätze sind in Abb. 47b dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Startkonzentration von 500 mM  $\text{NiCl}_2$  stark unterschiedliche Werte für den  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt nach der Aufreinigung ermittelt wurden. Die Spannbreite geht von  $\text{Ni}^{2+}$ -Konzentrationen von 0,3 mM bis zu 0,9 mM. Dabei scheint



**Abb. 47:** (a): Struktur von  $[\text{Ni}(\text{dimegly})_2]$  und (b): Spektrophotometrisch ermittelter  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt in aufgereinigten,  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen bei unterschiedlichen pH-Werten und verschiedenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Startkonzentrationen

auch der pH-Wert einen Einfluss zu haben. Bei niedrigeren pH-Werten konnte ein höherer Nickelgehalt realisiert werden. Bei Einsatz einer Startkonzentration von 60 mM  $\text{NiCl}_2$  wiesen die aufgereinigten Polymersomendispersionen jeweils einen vergleichbaren  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt von ca. 0,28 mM auf. Interessanterweise entspricht dieser  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalt auch in etwa dem mittleren  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt von 0,35 mM von aufgereinigten  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen. Die Schwankungen der ermittelten  $\text{Ni}^{2+}$ -Gehalte könnten auf die in manchen Experimenten nicht vollständige Hydratisierung des Polymerfilms nach 16-stündigem Schütteln zurückzuführen sein.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der spektrophotometrischen  $\text{Ni}^{2+}$ -Bestimmung wurde von aufgereinigten  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen der Nickelgehalt zusätzlich mittels FAAS bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Fünfpunkt-Kalibration im Konzentrationsbereich von 0,1 mg/l - 1,0 mg/l mit einem Nickel-Standard vorgenommen. Anschließend wurden die Proben mit konzentrierter  $\text{HNO}_3$  aufgeschlossen und nach definierter Verdünnung vermessen.

Dabei zeigte sich, dass für PB-PEO-Polymersomen, die in einer 60 mM  $\text{NiCl}_2$ -Lösung hergestellt wurden, teils vergleichbare, teils um bis zu 50 % geringere Werte gefunden wurden. Auch in mit 500 mM  $\text{NiCl}_2$ -Lösung hergestellten Polymersomendispersionen wurden nur 50 % der Ergebnisse der UV/Vis-Methode gefunden. Die abweichenden Ergebnisse können möglicherweise mit einem unvollständigen Aufschluss der Polymersomendispersionen vor der FAAS-Bestimmung erklärt werden. Zum Aufschluss der Proben

für die FAAS wurde anstelle von THF konzentrierte  $\text{HNO}_3$  verwendet, um ein wässriges System für die FAAS-Untersuchung zu gewährleisten. Bei der Präparation von Polymersomenproben für andere FAAS-Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass sich bei Einsatz zu geringer Mengen an  $\text{HNO}_3$  zum Aufschluss von Vesikeldispersionen inhomogene Dispersionen bildeten.

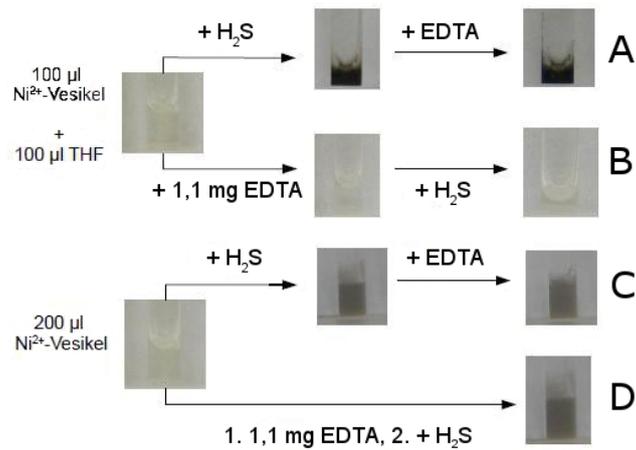
#### 4.2.4 Herstellung und Charakterisierung NiS-haltiger Polymersomen

Zum Ausfällen von intravesikulärem NiS wurden aufgereinigte,  $\text{Ni}^{2+}$ -haltige Polymersomendispersionen mit gasförmigem  $\text{H}_2\text{S}$  oder mit einer gesättigten wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung versetzt. Dabei trat eine dunkle Verfärbung der zuvor farblosen Dispersionen auf, die auf die Bildung von schwarzem NiS hindeutet. Durch mehrere Kontrollexperimente konnte gezeigt werden, dass die beobachtete NiS-Fällung intravesikulär ist (Abb. 48).

Löst man aufgereinigte,  $\text{Ni}^{2+}$ -haltige Polymersomen durch einen Überschuss an THF auf, kann dennoch eine schwarze Verfärbung der Dispersion bei Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  beobachtet werden (Abb. 48 A). Dieser löst sich auch bei Zugabe eines Überschusses an EDTA nicht mehr auf (A). Wird allerdings ein Überschuss an EDTA zu der mit THF versetzten Polymersomendispersion gegeben und diese anschließend mit  $\text{H}_2\text{S}$  inkubiert, tritt keine dunkle Verfärbung der Lösung auf (B). Die NiS-Fällung wird durch die Komplexierung der aus den Polymersomen freigesetzten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen verhindert. Dies konnte auch in einem Vergleichsexperiment gezeigt werden. Eine grün gefärbte  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung, die mit einem Überschuss an EDTA versetzt wurde, färbte sich bei der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  nur geringfügig dunkler.

In intakten, aufgereinigten  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen kann NiS durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  ausgefällt werden (Abb. 48 C). Die Zugabe eines externen Überschusses an EDTA hat keinen Einfluss auf die Ausfällung von NiS in intakten Polymersomen (D). Das bei diesem pH-Wert als Dianion vorliegende EDTA kann praktisch nicht durch die Polymersomenmembran ins Innere der Polymersomen diffundieren und folglich auch keine  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Inneren maskieren kann.

Da die Inhibierung der NiS-Fällung nur beim Zerstören der Vesikel mit THF beobachtet wurde, muss die beim Zusatz von EDTA zu intakten Vesikeln beobachtete NiS-Fällungsreaktion intravesikulär sein. Einmal gebildetes NiS löst sich nicht mehr bei Anwesenheit eines Überschusses an EDTA auf.



**Abb. 48:** Verwendung einer aufgereinigten, Ni<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersion (Startkonzentration: 500 mM NiCl<sub>2</sub>; pH 4) für die Kontrollexperimente: NiS-Fällung bei Inkubation mit H<sub>2</sub>S auch nach Zerstörung der Polymersomen durch Zusatz von THF möglich (**A**); Zusatz eines Überschusses an EDTA (15 mM) zu (durch Zusatz von THF) solubilisierten Polymersomen inhibiert NiS-Fällung bei Inkubation mit H<sub>2</sub>S (**B**); Bildung von schwarzem NiS bei Inkubation von intakten Polymersomen mit H<sub>2</sub>S (**C**); Auftreten der NiS-Fällung auch bei Zugabe eines externen Überschusses an EDTA (15mM) (**D**)

### UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der NiS-Fällung

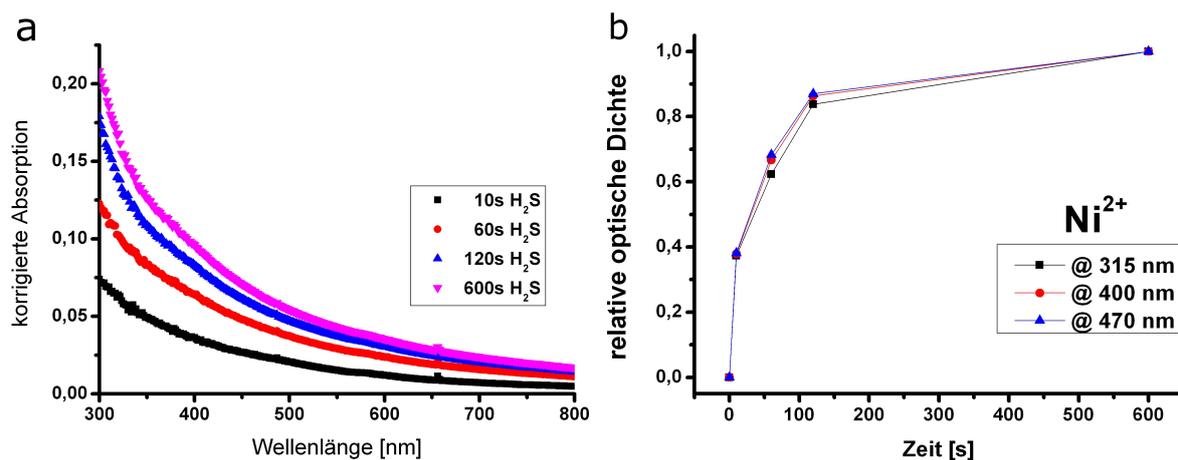
Die Kinetik der Fällung von NiS in Polymersomen wurde UV/Vis-spektroskopisch verfolgt. Dazu wurden aufgereinigte, Ni<sup>2+</sup>-haltige Polymersomen mit einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung ( $c_{H_2S} \approx 100$  mM) versetzt und die Absorption der erhaltenen Dispersion im Verlauf von 30 min gemessen. Die Spektren wurden dabei um die Lichtstreuung der Polymersomendispersion korrigiert, indem das UV/Vis-Spektrum der unbehandelten Polymersomendispersion subtrahiert wurde. Die erhaltenen korrigierten Spektren, die in Abb. 49a dargestellt sind, zeigen die nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S-Lösung auftretenden Veränderungen des Absorptionsspektrums der Probe. Das Auftragen der um die Partikelstreuung korrigierten, relativen optischen Dichte für verschiedene Wellenlängen veranschaulicht, dass nach 120 s die optische Dichte über einen breiten Wellenlängenbereich bereits über 80 % des Endwerts erreicht hat (s. Abb. 49b). Die intravesikuläre NiS-Fällung läuft also bei einer externen H<sub>2</sub>S-Konzentration von ca. 66 mM sehr rasch ab. Zudem ist zu erkennen, dass sich die relative optische Dichte praktisch wellenlängenunabhängig verändert (s. Abb. 49b).

Da NiS ebenso wie FeS als schwarzer Feststoff ausfällt, konnten keine spezifischen Absorptionsbanden im Verlauf der Messung detektiert werden. Vielmehr ist eine Zunahme der Absorption über den gesamten vermessenen Wellenlängenbereich zu beobachten, wobei für kleinere Wellenlängen eine stärkere Zunahme auftritt. Dies deutet vermutlich auf die Bildung von NiS-Partikeln hin, die Licht umso stärker streuen, je kürzer dessen Wellenlänge ist (vgl. Abb. 30, S. 59 für die Fällung von FeS in Polymersomen).

Die charakteristische grüne Farbe von Ni<sup>2+</sup>-Lösungen kann bei aufgereinigten, Ni<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen nicht mehr beobachtet werden. Dies kann auf die starke Lichtstreuung durch die Polymersomen und den geringen Ni<sup>2+</sup>-Gehalt von durchschnittlich ca. 0,28 mM in der Polymersomendispersion zurückzuführen sein. Aus diesem Grund ist es, anders als beim rötlich gefärbten Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplex, nicht möglich, die Veränderung einer für Ni<sup>2+</sup>-Ionen charakteristischen Absorptionsbande während der NiS-Fällung mittels UV/Vis-Spektroskopie zu verfolgen.

### Cryo-TEM-Untersuchungen von NiS-haltigen Polymersomen

Zur Visualisierung von intravesikulären NiS-Aggregaten wurden aufgereinigte, Ni<sup>2+</sup>-haltige Polymersomen vor und nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S mittels Cryo-TEM untersucht. Hierbei kam eine Polymersomendispersion 45 Tage nach der Herstellung zum



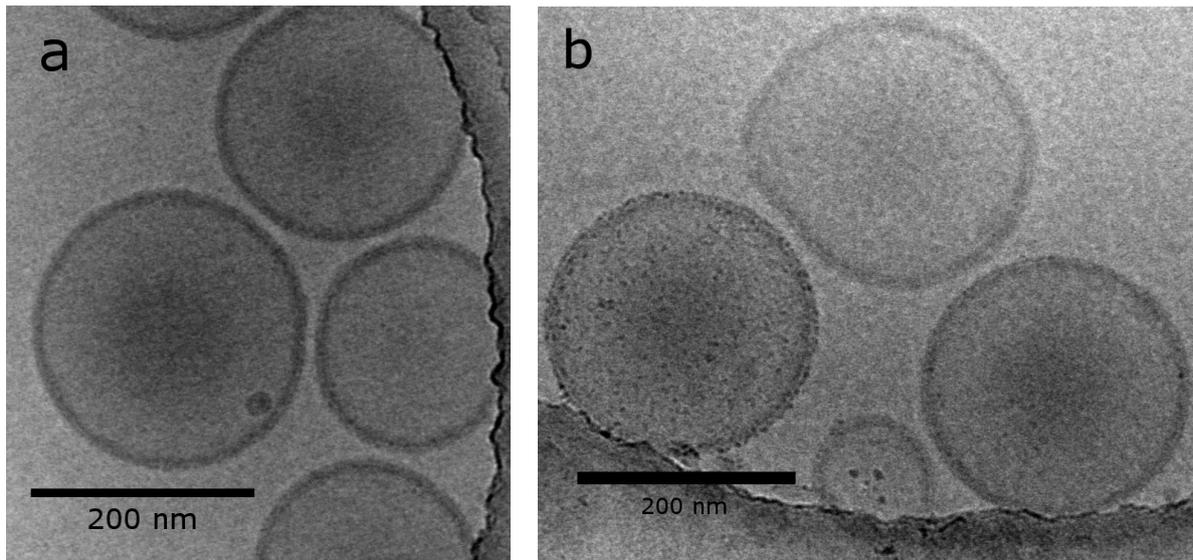
**Abb. 49:** UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der Inkubation einer aufgereinigten, Ni<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersion (Startkonzentration: 500 mM NiCl<sub>2</sub>; pH 4) mit dem doppelten Volumen einer gesättigten wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung; Darstellung der korrigierten Absorptionsspektren (a) sowie der Veränderung der korrigierten, relativen optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen (b)

Einsatz. Es zeigte sich, dass Ni<sup>2+</sup>-haltige Polymersomen praktisch ausschließlich als unilamellare Vesikel vorliegen (s. Abb. 50a).

Cryo-TEM-Aufnahmen von mit H<sub>2</sub>S inkubierten und verfärbten Polymersomendispersionen zeigen, dass viele Polymersomen kleine dunkle Aggregate aufweisen, die membranassoziiert vorliegen (Abb. 50b, 51). Diese sind teilweise auch deutlich erkennbar an der äußeren Vesikelmembran angelagert (Abb. 50b). Zudem zeigen Vesikel auf einigen Aufnahmen diffuse Aggregate mit dunklem Kontrast (schwarze Pfeile auf Abb. 51a,b), bei denen es sich vermutlich um Aggregate von NiS-NP handelt, da Polymersomen solche Aggregate vor der Inkubation mit H<sub>2</sub>S nicht aufwiesen.

Weitere beobachtete Strukturen in derselben Abbildung sind kompakte Partikel mit einer Größe zwischen 11 nm und 24 nm (durch rote Pfeile indiziert). Ähnliche Partikel konnten auch auf anderen Aufnahmen beobachtet werden. Aufgrund ihres Kontrastes sollte es sich dabei ebenfalls um NiS handeln, da solche Aggregate bei Proben ohne H<sub>2</sub>S-Inkubation nicht beobachtet wurden. Allerdings sind solche dunklen, kompakten Partikel auch in einigen Fällen extravesikulär erkennbar. Solch extravesikuläre Partikel rühren womöglich von kollabierten Polymersomen her. Es war nicht möglich, eine Kippserie zur Verifizierung der Lokalisierung solcher membranassoziierten Partikel aufzunehmen.

Eine weiteres, sehr interessantes Phänomen war das beobachtete Auftreten einer dunklen

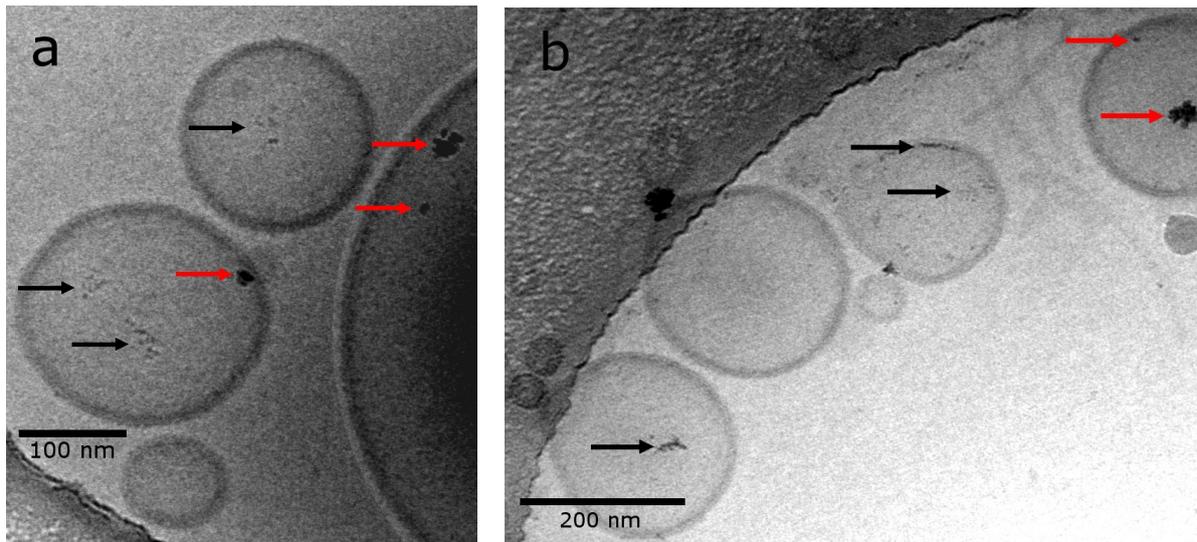


**Abb. 50:** Cryo-TEM-Aufnahme von aufgereinigten,  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen; vor (a) und nach (b) Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$

Ablagerung an der inneren Polymersomenmembran (Abb. 51b, schwarzer Pfeil). Das fragile Polymersom ist zweifelsohne nicht mehr vollständig geschlossen. Das Platzen des Polymersoms könnte durch den Einfluss des internen Niederschlags verursacht sein, da ansonsten nur intakte Vesikel in der Probe gefunden wurden. Alternativ könnte auch der interne Niederschlag erst durch das Öffnen des Polymersoms entstanden sein. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da extern vorhandenes EDTA durch das Eindringen in ein geplatzt Vesikel eine Fällung von NiS verhindern würde.

Schließlich weisen die untersuchten  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen unabhängig von der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  extravesikuläre faden- bzw. schlauchförmige Strukturen (z.B. Abb. 51b) auf, die durch eine andere Packungsanordnung der PB-PEO-Moleküle bewirkt wird. Dieser Effekt könnte durch die lange Lagerungsdauer bedingt sein und auf eine chemische Veränderung des PB-PEO hindeuten.

Die Resultate der Cryo-TEM-Untersuchungen von  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  belegen eindeutig die Bildung von dunklen Niederschlägen. Diese treten in Form von diffusen Aggregaten, einer Ablagerung auf der inneren Membran von Polymersomen sowie als Partikel bzw. Aggregate mit Größen bis zu 24 nm auf. Der Kontrast der Niederschläge und die Tatsache, dass diese nicht in Proben vor der  $\text{H}_2\text{S}$ -Inkubation beobachtet werden konnten, beweist, dass es sich um NiS handelt. Die Lokalisierung der beobachteten dunklen Aggregate mittels einer Kippserie



**Abb. 51:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Ni}^{2+}$ -haltigen Polymersomen nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$ ; Hinweise auf  $\text{NiS}$ -Fällung in Form von diffusen Aggregaten bzw. einer Membranablagerung (schwarze Pfeile) sowie als kompakte Partikel (rote Pfeile)

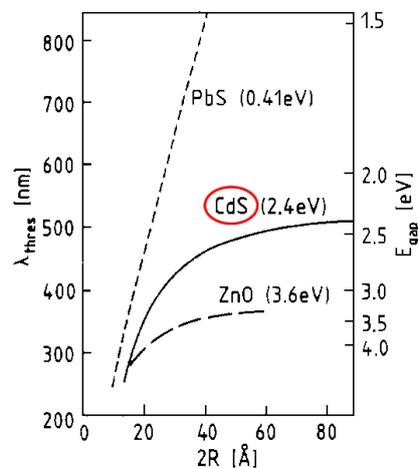
konnte nicht erfolgen. Einige Aggregate liegen erkennbar extern vor, insbesondere größere Aggregate. Trotzdem deuten die Cryo-TEM-Aufnahmen darauf hin, dass die diffusen Aggregate und insbesondere die Membranablagerungen intravesikulär sind.

## 4.3 Cadmiumhaltige Polymersomen

### 4.3.1 Vorbemerkungen

Der Einschluss des photohalbleitenden und als Photokatalysator einsetzbaren CdS im Inneren von PB-PEO-Polymersomen ermöglicht es, photokatalysierte Reaktion unter den speziellen Bedingungen der Kompartimentierung zu untersuchen. Die Verwendung von Polymersomen als vesikuläres System mit internem CdS wurde bislang noch nicht beschrieben, obwohl diese aufgrund der dickeren Membran im Vergleich zu Liposomen ein stabileres System darstellen sollten. Bislang wurde hingegen nur von der Herstellung und Charakterisierung von CdS in Liposomen [18–23] sowie in kationisch-anionischen Tensidvesikeln [103] berichtet.

Zur Herstellung von CdS-haltigen Polymersomen wurde dieselbe Herangehensweise wie im Fall von FeS- und NiS-haltigen Polymersomen angewendet: Zunächst erfolgte die Herstellung und Aufreinigung Cd<sup>2+</sup>-haltiger Polymersomen, in deren Inneren dann die CdS-Fällungsreaktion induziert wurde. CdS fällt aus Cd<sup>2+</sup>-haltigen Lösungen bei der Inkubation mit H<sub>2</sub>S bei pH ≥ 0 als gelber Feststoff aus, da es ein Löslichkeitsprodukt von  $K_L(\text{CdS}) = 10^{-27} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$  aufweist [83].



**Abb. 52:** Wellenlänge der CdS-Absorptionskante  $\lambda_{thres}$  als Funktion der Partikelgröße (in Å); rechte Ordinate: Energie der Bandlücke; jeweilige Energie der Bandlücke für die makrokristalline Verbindung ist in Klammern angegeben (aus [104])

CdS-Partikel mit Größen über 8 nm absorbieren Licht mit einer Wellenlängen von  $\lambda \leq 515$  nm, was für die gelbe Farbe von CdS verantwortlich ist [104]. CdS-NP mit Größen unter 8 nm weisen hingegen auf Quanteneffekten beruhende optische Eigen-

schaften auf [104]. Diese bewirken, dass sich die Wellenlänge der Absorptionskante mit abnehmender Partikelgröße verringert (s. Abb. 52). Denn je kleiner CdS-Partikel sind, desto größer ist die für das Anheben eines Elektrons auf ein höheres Energieniveau notwendige Energie, da die entsprechenden Energieniveaus höher liegen als im makroskopischen Kristall. Dieser Effekt kann auch als Vergrößerung der Energielücke von CdS mit abnehmender Partikelgröße beschrieben werden [104]. Der Zusammenhang zwischen der Größe von CdS-NP und der Lage der CdS-Absorptionskante konnte experimentell und theoretisch verifiziert und quantifiziert werden [104, 105].

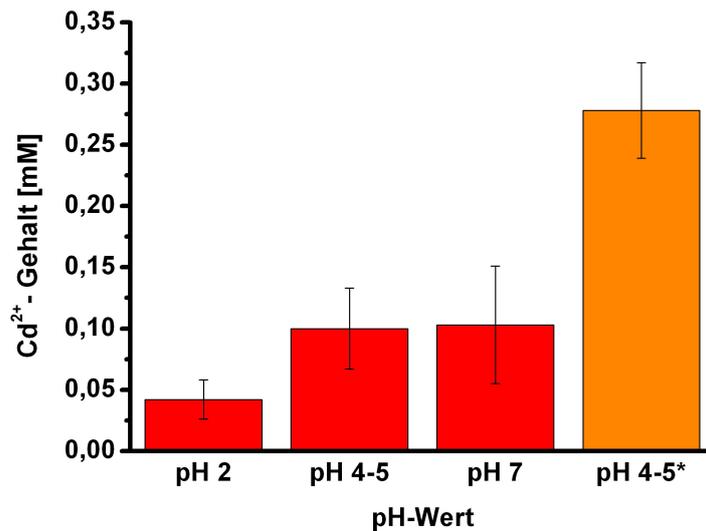
Dieser Zusammenhang kann auch zur Bestimmung der Größe von in Vesikeln gebildeten CdS-NP ausgenutzt werden. Dazu wird die Ausfällung von CdS in Liposomen UV/Vis-spektroskopisch verfolgt und die Größe der intravesikulär gebildeten CdS-NP zu einem beliebigen Zeitpunkt graphisch aus dem jeweiligen Absorptionsspektrum mithilfe von Vergleichsdaten ermittelt [18, 103].

#### 4.3.2 Herstellung und Charakterisierung Cd<sup>2+</sup>-haltiger Polymersomen

Mit der Filmhydratisierungsmethode wurden in 1,6 mM PB-PEO-Polymersomen 100 bzw. 300 mM CdCl<sub>2</sub>-Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten eingeschlossen. Die Modifikation dieser Parameter diente zur Verifizierung möglicher Einflussfaktoren auf die Einschussrate von Cd<sup>2+</sup>-Ionen in Polymersomen sowie auf die CdS-Ausfällung im Inneren von Polymersomen. Als Pufferlösungen kamen dabei jeweils 100 mM Lösungen eines Citrat- (pH 2), Acetat- (pH 4-5) oder TRIS-HCl-Puffers (pH 7) zum Einsatz. Die ohne Extrusion erhaltenen, aufgereinigten Polymersomendispersionen waren farblos und polydispers.

Der Cd<sup>2+</sup>-Gehalt aufgereinigter Polymersomendispersionen wurde in ausgewählten Proben exemplarisch mittels FAAS bestimmt. Dazu wurde eine Fünfpunkt-Kalibration im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1,0 mg/ml mit einem Cd-Standard vorgenommen. Die zu vermessenden Proben wurden mit konzentrierter HNO<sub>3</sub> aufgeschlossen, auf definierte Volumina verdünnt und anschließend vermessen. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Abb. 53 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass im sauren Milieu bei pH 2 ein geringerer Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in Polymersomen realisiert werden konnte als im schwach sauren bzw. neutralen Milieu. So wurde bei Einsatz einer 100 mM CdCl<sub>2</sub>-Lösung in Citratpuffer (pH 2) ein Cd<sup>2+</sup>-Gehalt von  $0,042 \pm 0,016$  mM erzielt. Hingegen konnte bei den untersuchten höheren pH-

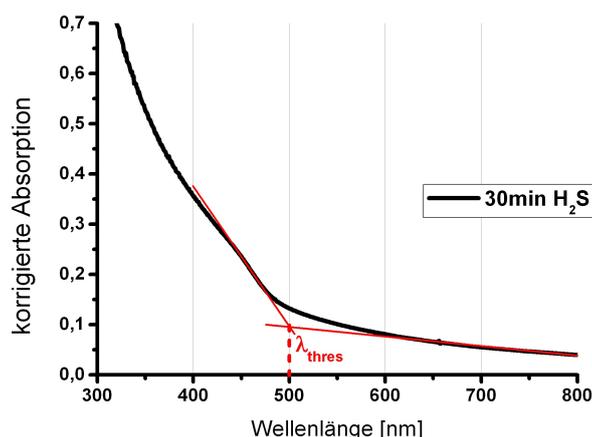


**Abb. 53:** Mittels FAAS bestimmter Cd<sup>2+</sup>-Gehalt in aufgereinigten, Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen bei unterschiedlichen pH-Werten und einer Startkonzentration von 100 mM CdCl<sub>2</sub>; \* - Startkonzentration 300 mM CdCl<sub>2</sub>

Werten jeweils ein Cd<sup>2+</sup>-Gehalt von ca. 0,1 mM realisiert werden. Bei pH 4-5 wurde ein Cd-Gehalt von  $0,100 \pm 0,033$  mM und bei pH 7 von  $0,103 \pm 0,048$  mM gefunden. Zudem wird bei einer Verdreifung der CdCl<sub>2</sub>-Startkonzentration auf 300 mM auch ein annähernd dreifacher Cd<sup>2+</sup>-Gehalt von  $0,278 \pm 0,039$  mM in der aufgereinigten Polymersomendispersion realisiert. Gleichwohl sind die absoluten Werte des Cd<sup>2+</sup>-Gehalts deutlich niedriger als die Werte von aufgereinigten Fe<sup>2+</sup>- oder Ni<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen (vgl. Abb. 27 und 47). Dies könnte an einer nicht vollständigen Hydratisierung des Polymerfilms und damit einer verringerten PB-PEO-Konzentration in der Polymersomendispersion liegen.

### 4.3.3 Herstellung und Charakterisierung CdS-haltiger Polymersomen

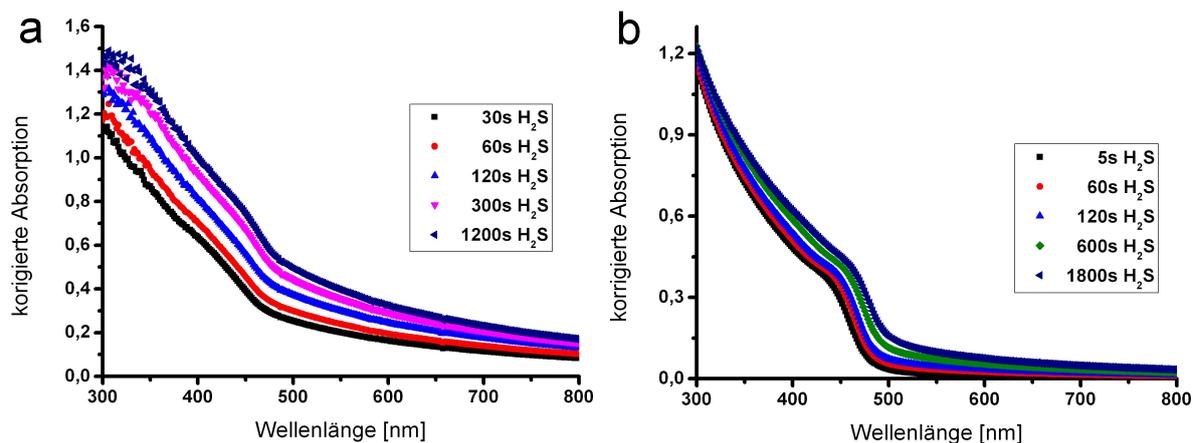
Zur Ausfällung von intravesikulärem CdS in aufgereinigten, Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen wurde die Polymersomendispersion mit einer gesättigten wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung gemischt. Dabei konnte eine rasche gelbliche Verfärbung der zuvor farblosen Dispersion beobachtet werden.



**Abb. 54:** Graphische Ermittlung der CdS-Absorptionskante bei  $\lambda_{thres} = 500$  nm aus dem UV/Vis-Spektrum von Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen (Startkonzentration 300 mM CdCl<sub>2</sub> in Acetatpuffer) 30 min nach der Inkubation mit dem doppelten Volumen einer wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung

### UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der CdS-Fällung

Der zeitliche Verlauf der Absorption von aufgereinigten, Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen nach Inkubation mit H<sub>2</sub>S wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt. Dabei wurde systematisch der Einfluss der Parameter interner pH-Wert, intravesikuläre Cd<sup>2+</sup>-Konzentration sowie die zugesetzte Menge an H<sub>2</sub>S untersucht. Zur Gewährleistung einer möglichst guten Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit aller Messungen kam dabei eine gesättigte wässrige H<sub>2</sub>S-Lösung ( $c_{H_2S} \approx 100$  mM) zum Einsatz, die in bestimmten Volumen-Verhältnissen mit der Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersion gemischt wurde. Die intravesikuläre CdS-Fällungsreaktion wurde insgesamt über einen Zeitraum von maximal 30 min verfolgt. Über diesen Zeitraum hinaus fand keine detektierbare Veränderung des UV/Vis-Spektrums der Proben mehr statt. Aufgrund der intensiven Streuung von einfallendem Licht durch die Polymersomendispersionen wurden jeweils um die Vesikelstreuung korrigierte UV/Vis-Spektren dargestellt und ausgewertet. Dazu wurde von allen Spektren jeweils das UV/Vis-Spektrum der im gleichen Mischungsverhältnis mit H<sub>2</sub>O verdünnten Polymersomendispersion subtrahiert. Die Lage der Absorptionskante der CdS-Partikel-Absorption wurde wie in [103] beschrieben graphisch im jeweiligen UV/Vis-Spektrum als Schnittpunkt der Basislinie mit der Tangente an die Schulter der CdS-Absorptionsbande bestimmt. Ein Beispiel der graphischen Ermittlung der CdS-Absorptionskante ist in Abb. 54 dargestellt.



**Abb. 55:** Zeitliche Verfolgung der CdS-Fällung mittels UV/Vis-Spektroskopie; links (a): Inkubation einer aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersion (Startkonzentration 300 mM  $\text{CdCl}_2$  in TRIS-Puffer) mit dem doppelten Volumen einer gesättigten wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung; rechts (b): Inkubation einer 0,8 mM  $\text{Cd}^{2+}$ -Lösung in TRIS-Puffer mit dem doppelten Volumen einer wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung

In Abb. 55 ist das Ergebnis der UV/Vis-spektroskopischen Verfolgung der Fällungsreaktion von CdS im Inneren von Polymersomen (Abb. 55a) sowie als Vergleich in einer 0,8 mM  $\text{CdCl}_2$ -Lösung (Abb. 55b) dargestellt. In beiden untersuchten Systemen ist ein starker Anstieg der Absorption bei Wellenlängen von  $\lambda < 500$  nm, überlagert von der Schulter einer Absorptionsbande, zu erkennen. Aus der Lage der Absorptionskante dieser Schulter  $\lambda_{thres}$  kann die jeweilige Größe der Licht absorbierenden CdS-NP und das Wachstum derselben abgeschätzt werden [18]. Laut Referenzdaten aus [105] entspricht die für die intravesikuläre CdS-Fällung ermittelte Absorptionskante nach 30 s Reaktionszeit bei  $\lambda_{thres} \approx 480$  nm einer Partikelgröße von 4,9 nm. Nach Abschluss der Fällungsreaktion nach 20 min liegt die Absorptionskante bei  $\lambda_{thres} \approx 490$  nm, was einer CdS-Partikelgröße von 5,6 nm entspricht. Es tritt also eine Zunahme der Partikelgröße im Verlauf der Untersuchung auf.

Fällt man CdS hingegen aus einer 0,8 mM  $\text{CdCl}_2$ -Lösung, so liegt der erste ermittelbare Wert der Absorptionskante bei  $\lambda_{thres} \approx 495$  nm. Dies entspricht einer Partikelgröße von 5,9 nm. Die nach 30 min ermittelte Wellenlänge der Absorptionskante von  $\lambda_{thres} \approx 510$  nm entspricht einer Partikelgröße von ca. 8,4 nm. Gleichwohl liegt die Wellenlänge der Absorptionskante sehr nah an dem Wert von  $\lambda_{thres} = 515$  nm für bulk CdS [104]. Dies könnte auf den fehlenden, das Partikelwachstum begrenzenden Einfluss der Kompartimentierung oder auch auf die höhere  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration in Lösung zu-

rückgeführt werden.

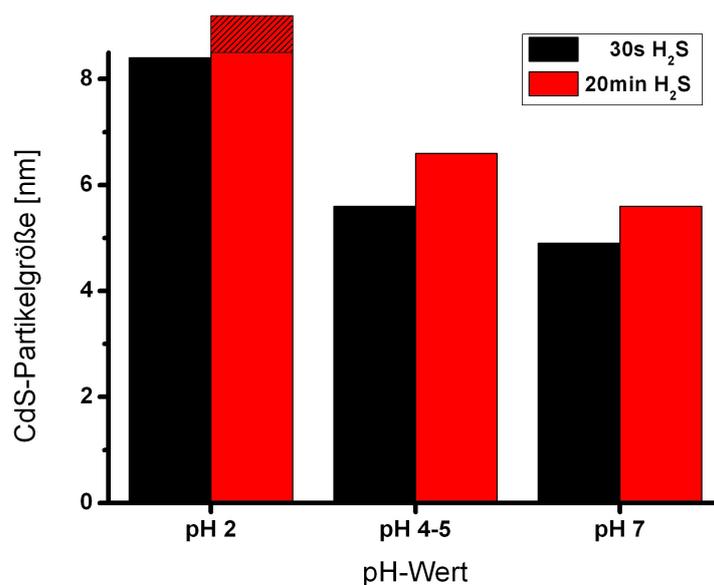
Die CdS-Partikelgröße in Lösung ist schon zu Beginn der Fällungsreaktion deutlich größer als die der kompartimentierten Partikel in Polymersomen. So liegt die Absorptionskante der gebildeten CdS-Partikel in Lösung bereits nach fünf Sekunden bei einem höheren Wert als für die kompartimentierte Fällung nach 20 min. Nach einer vergleichbaren Reaktionszeit weisen die in Lösung gebildeten CdS-Partikel bereits eine Absorptionskante auf, die nahezu der von makroskopischem CdS entspricht. Dies dürfte auf Aggregationsprozesse oder Ostwald-Reifung, d.h. große Kristallisationskeime wachsen auf Kosten kleinerer Keime, in der resultierenden Suspension zurückzuführen sein, da die entstandenen Kristallisationskeime nicht durch Stabilisatoren oder durch Kompartimentierung räumlich voneinander getrennt vorliegen.

### **Einflussfaktoren auf die Größe gebildeter CdS-Partikel**

Zusätzlich zur rein phänomenologischen Charakterisierung der CdS-Fällung im Inneren von Polymersomen und in Lösung erfolgten systematische Untersuchungen zur Verifizierung des Einflusses von Faktoren wie pH-Wert, CdCl<sub>2</sub>-Startkonzentration und der zugesetzten H<sub>2</sub>S-Konzentration auf die Größe der gebildeten CdS-Partikel. Dazu wurde in den jeweiligen UV/Vis-Spektren die Lage der CdS-Absorptionskante graphisch bestimmt und dann anhand von Referenzdaten aus [104] die dazugehörige CdS-Partikelgröße ermittelt.

Der mögliche Einfluss des pH-Wertes wurde anhand von drei Ansätzen mit einer konstanten CdCl<sub>2</sub>-Startkonzentration von 300 mM in drei unterschiedlichen Puffersystemen untersucht. Polymersomendispersionen wurden in Citratpuffer (pH 2), Acetatpuffer (pH 4-5) sowie TRIS-HCl-Puffer (pH 7) hergestellt und mittels Dialyse aufgereinigt. Die erhaltenen Dispersionen wurden mit dem doppelten Volumen einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung gemischt und UV/Vis-Spektren über einen Zeitraum von maximal 30 min aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass die erhaltenen UV/Vis-Spektren nach 20 min Messzeit konstant blieben. Die aus der Lage der Absorptionskante jeweils ermittelten Partikelgrößen sind in Abb. 56 dargestellt.

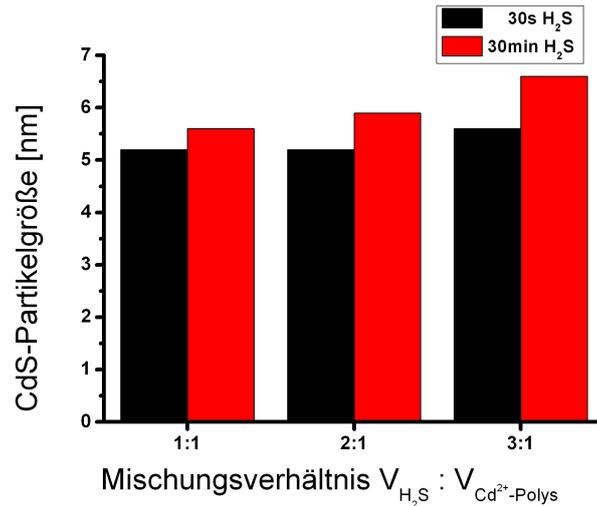
Es ist eindeutig zu erkennen, dass in allen betrachteten Fällen die Partikelgröße mit der Inkubationszeit zunimmt. Zudem ist als klarer Trend zu erkennen, dass die maximale Partikelgröße mit zunehmendem pH-Wert abnimmt. Bei pH 2 liegt die Absorptionskante nach 20 min Inkubationszeit schon bei  $\lambda_{thres} \approx 515$  nm, dem Wert von bulk CdS.



**Abb. 56:** aus der Lage der CdS-Absorptionskante graphisch ermittelte pH-Abhängigkeit der maximalen Partikelgröße von in Polymersomen (Startkonzentration: 300 mM CdCl<sub>2</sub>) gebildetem CdS 30s und 20 min nach der Inkubation mit dem doppelten Volumen einer gesättigten wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung; Partikelgröße  $\geq 8,5$  nm durch schraffiertes Kästchen indiziert

Die einzige Aussage über die maximale Partikelgröße ist in diesem Fall, dass diese bei  $\geq 8,5$  nm liegt. Folglich werden bei der Inkubation mit einer H<sub>2</sub>S-Lösung bei Vorliegen eines intravesikulären sauren Milieus (pH 2) größere CdS-Partikel gebildet als bei höheren pH-Werten. Da die Absorptionskante nur Information über die Größe der größten nicht aber über die Anzahl an gebildeten CdS-Partikeln gibt, könnte der Befund dadurch erklärt werden, dass sich mit steigendem pH-Wert eher eine größere Anzahl kleiner CdS-Partikel (statt weniger großer CdS-Partikel) bildet.

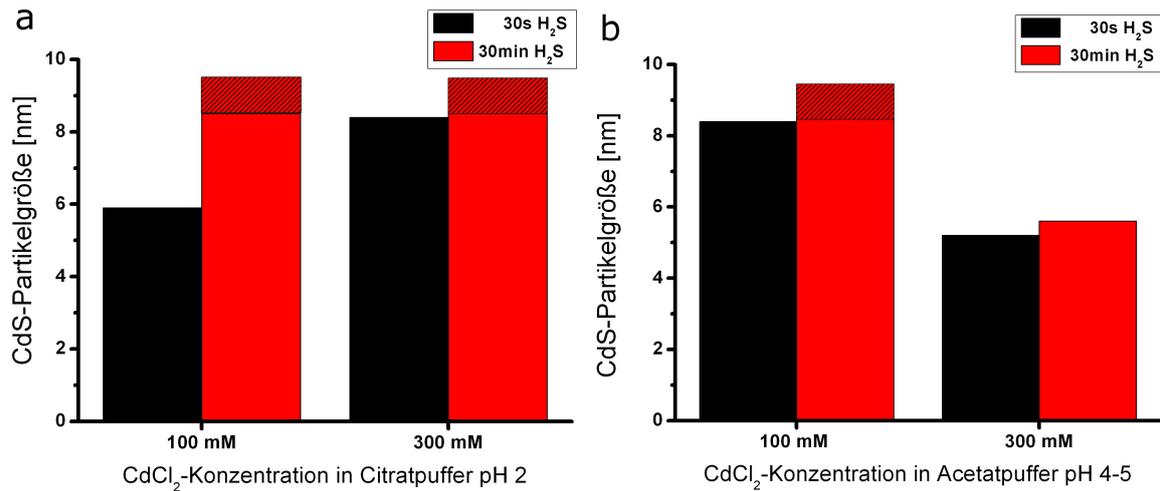
Des Weiteren wurde untersucht, ob die Menge der zu aufgereinigten, Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen zugesetzten gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung einen Einfluss auf die Größe der gebildeten intravesikulären CdS-Partikel hat. Es erfolgten UV/Vis-Untersuchungen einer Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersion (Startkonzentration: 300 mM CdCl<sub>2</sub> in Acetatpuffer), zu der 100, 200 und 300 V% einer gesättigten wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung ( $c_{H_2S} \approx 100$  mM) zugesetzt wurden. Folglich wurde in den jeweiligen Polymersomendispersionen eine externe H<sub>2</sub>S-Konzentration von ca. 50 mM (bei Zusatz von 100 V% H<sub>2</sub>S-Lösung), 66 mM (Zusatz von 200 V% H<sub>2</sub>S-Lösung) sowie 75 mM (Zusatz von 300 V% H<sub>2</sub>S-Lösung) eingestellt.



**Abb. 57:** aus der Lage der CdS-Absorptionskante graphisch ermittelte Abhängigkeit der maximalen Partikelgröße von in Polymersomen gebildetem CdS 30 s und 30 min nach der Inkubation mit einer gesättigten wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung ( $c_{\text{H}_2\text{S}} \approx 100 \text{ mM}$ ) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen;  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt der Polymersomendispersion ca. 0,3 mM (Startkonzentration: 300 mM  $\text{CdCl}_2$  in Acetatpuffer)

Es zeigte sich, dass sich die Lage der Absorptionskante nach gleichen Inkubationszeiträumen nur minimal mit Zunahme der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration zu höheren Wellenlängen verschiebt. Dies bedeutet, dass die maximale Größe der gebildeten CdS-Partikel mit zunehmender  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration leicht zunimmt und zwar von 5,2 nm ( $\lambda_{\text{thres}} \approx 485 \text{ nm}$ ) auf 5,6 nm ( $\lambda_{\text{thres}} \approx 490 \text{ nm}$ ) nach 30 s Inkubationszeit und von 5,6 nm ( $\lambda_{\text{thres}} \approx 490 \text{ nm}$ ) auf 6,6 nm ( $\lambda_{\text{thres}} \approx 500 \text{ nm}$ ) nach 30 min Inkubationszeit (s. Abb. 57). Folglich hat die Erhöhung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration im System über einen Wert von ca. 50 mM (bei einer 1:1-Mischung) nur einen geringen Einfluss auf die Größe der gebildeten CdS-Partikel. Dies dürfte am großen Überschuss des  $\text{H}_2\text{S}$  liegen, da der  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt der verwendeten Polymersomendispersion bei ca. 0,3 mM liegt. Die mittlere, intravesikuläre  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration liegt deutlich höher, da nur ein geringer Teil des Gesamtvolumens der Dispersion im Inneren von Polymersomen eingeschlossen wird.

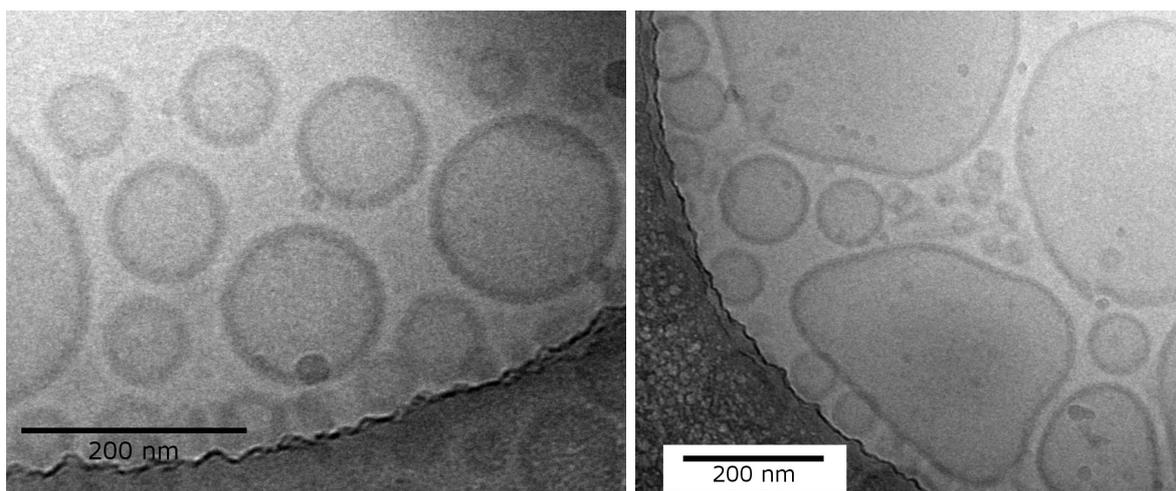
Als dritter Parameter wurde der Einfluss der  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration auf die maximale Größe der gebildeten CdS-Partikel untersucht. Bei der Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass sich ein deutlich höherer  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt bei der Verdreifachung der Startkonzentration realisieren ließ (s. Abb. 53). Es wurden bei drei verschiedenen pH-Werten von pH 2, 4-5 sowie 7 jeweils mit einer 100 mM bzw. 300 mM  $\text{CdCl}_2$ -Lösung Polymersomen-



**Abb. 58:** aus der Lage der CdS-Absorptionskante graphisch ermittelte maximale Partikelgröße von in Polymersomen gebildetem CdS 30 s und 30 min nach der Inkubation mit dem doppelten Volumen einer gesättigten wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung in (a) Citratpuffer pH 2 und (b) in Acetatpuffer pH 4-5 für verschiedene CdCl<sub>2</sub>-Startkonzentrationen; für Werte bei pH 7 s. Abb. 56; Partikelgröße  $\geq 8,5$  nm durch schraffiertes Kästchen indiziert

dispersionen hergestellt und nach der Aufreinigung mit einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung versetzt. Der zeitliche Verlauf der UV/Vis-Spektren wurde aufgezeichnet und aus den aufgenommenen Spektren 30 s und 30 min nach der Inkubation die Absorptionskante der CdS-Partikel bestimmt. Dabei konnte bei den Untersuchungen bei pH 7 kein Unterschied der Partikelgröße für die unterschiedlichen CdCl<sub>2</sub>-Konzentrationen festgestellt werden. Für in Citratpuffer (pH 2) erhaltene Polymersomen ist die aus der Lage der Absorptionskante jeweils ermittelte maximale Partikelgröße in Abb. 58a dargestellt. Es ist erkennbar, dass bei einer höheren Startkonzentration die anfängliche maximale CdS-Partikelgröße größer ist. Nach 30 min liegt die Absorptionskante beider untersuchter Dispersionen bei  $\lambda_{thres} \approx 515$  nm, so dass die maximale Partikelgröße bei  $\geq 8,5$  nm liegen muss. Bei höherer intravesikulärer CdS-Konzentration tritt folglich zu Beginn der CdS-Ausfällung eine raschere Zunahme der Partikelgröße auf. Allerdings ist nach 30 min keinerlei Unterschied zwischen den Vesikeldispersionen unterschiedlicher Cd<sup>2+</sup>-Konzentration zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Fällungsreaktion nach diesem Zeitintervall abgeschlossen ist.

Die Untersuchung bei pH 4-5 ergab indes, dass bei einer CdCl<sub>2</sub>-Startkonzentration von 100 mM ein rascheres Partikelwachstum als bei einer Startkonzentration von 300 mM



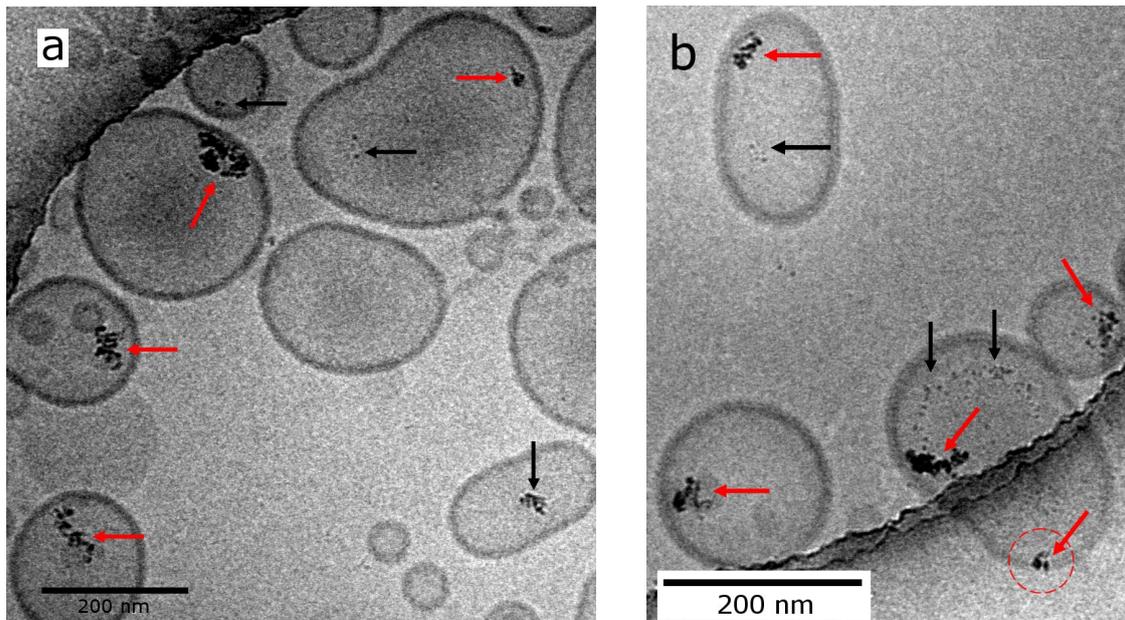
**Abb. 59:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen; Startkonzentration: 300 mM  $\text{CdCl}_2$  in TRIS-HCl-Puffer

auftrat (s. Abb. 58b). Auch am Ende der CdS-Fällungsreaktion nach 30 min lagen bei einer Startkonzentration von 100 mM  $\text{CdCl}_2$  größere Partikel als für Polymersomen mit einer Startkonzentration von 300 mM  $\text{CdCl}_2$  vor. Die Ursache dafür ist unklar.

In der Literatur finden sich indes keine einheitlichen Angaben über den Einfluss der  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration auf die maximale Partikelgröße von in Vesikeln ausgefälltem CdS. So wurde bei der vergleichenden Untersuchung von Lecithin-Vesikeldispersionen, die mit einer 100 mM bzw. einer 300 mM  $\text{CdCl}_2$ -Lösung hergestellt wurden, keinerlei Unterschied der anfänglichen und der finalen CdS-Partikelgröße im Verlauf der intravesikulären Ausfällung beobachtet [18]. Gleichwohl wird in [21] von einer Korrelation zwischen der finalen CdS-Partikelgröße in Liposomen und der intravesikulären  $\text{CdCl}_2$ -Konzentration berichtet. Allerdings wird nicht angeführt, in welchem Konzentrationsbereich von  $\text{CdCl}_2$  gearbeitet wurde, so dass diese Ergebnisse womöglich nicht im Widerspruch zu dem zuerst aufgeführten Bericht stehen.

### Cryo-TEM von CdS-haltigen Polymersomen

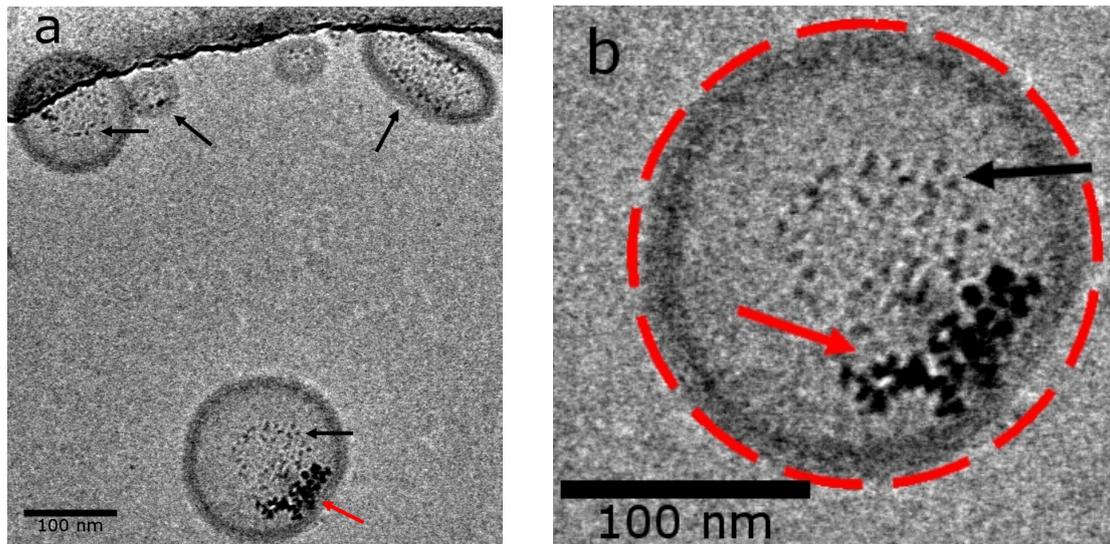
Zur Visualisierung von aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen sowie potenzieller CdS-Niederschläge nach der Inkubation mit einer gesättigten wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung erfolgten Cryo-TEM-Untersuchungen. Neben der Visualisierung von CdS-Niederschlägen im Allgemeinen sollte eine Bestimmung der Größe der gebildeten CdS-Partikel zur Verifizierung der Ergebnisse der UV/Vis-Untersuchungen erfolgen. Zunächst wurden mit



**Abb. 60:** (a),(b): Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen (Startkonzentration: 300 mM  $\text{CdCl}_2$  in TRIS-HCl-Puffer) nach Inkubation mit einer gesättigten wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung; kleinere Aggregate (schwarze Pfeile) und größere Aggregate (rote Pfeile) in Polymersomen mit einer Größe über 100 nm

einer 300 mM  $\text{CdCl}_2$ -Lösung in TRIS-HCl-Puffer hydratisierte Polymersomen nach der Aufreinigung untersucht. Zwei repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 59 dargestellt. Es sind ausschließlich unilamellare Vesikel zu erkennen, wobei die Mehrzahl der Vesikel mit Größen unter 150 nm auf den Kohlenstoffstegen des Grids lokalisiert sind. Größere Vesikel sind in einigen Fällen nicht ideal sphärisch und weisen zudem Deformationen auf. Bei den Untersuchungen wurden keinerlei Vesikel gefunden, die dunkle Aggregate aufweisen.

Eine Probe dieser aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Vesikeldispersion wurde mit demselben Volumen einer gesättigten  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung versetzt und anschließend mittels Cryo-TEM untersucht. Dabei konnten bei mehr als 75 % der Polymersomen mit einer Größe von über 100 nm eindeutig dunkle Aggregate visualisiert werden. Dabei kann zwischen sehr kleinen Aggregaten (jeweils durch schwarze Pfeile indiziert) im Bereich von 1,5 - 3 nm sowie größeren Aggregaten (jeweils durch rote Pfeile indiziert) mit einer Größe zwischen 6 nm und 9 nm unterschieden werden. Die Aggregate liegen nur in Ausnahmefällen erkennbar extern vor (z.B. auf Abb. 60b, s. roter Kreis). Die aufgenommenen Abbildungen weisen indes darauf hin, dass sich die vesikelassoziierten Aggregate praktisch ausschließlich



**Abb. 61:** Cryo-TEM-Aufnahmen von aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen (Startkonzentration: 300 mM  $\text{CdCl}_2$  in TRIS-HCl-Puffer) nach Inkubation mit einer gesättigten wässrigen  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung; (a): kleinere (schwarze Pfeile) und größere CdS-Aggregate (rote Pfeile) in Polymersomen erkennbar; (b): Vergrößerung des bei (a) unten abgebildeten Polymersoms; Abweichung von der ideal sphärischen Form durch internen CdS-Niederschlag

innerhalb der Polymersomen befinden. Dies konnte zum einen anhand einer Kippserie eindeutig bewiesen werden. Zum anderen zeigt die Vergrößerung eines Polymersoms in Abb. 61b, dass dessen Form von der ideal sphärischen Form erkennbar abweicht und eine geringere Krümmung in dem Bereich der großen CdS-Aggregate aufweist (vgl. Form des roten Kreises). Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine Membrandeformation durch die Anlagerung des ausgedehnten internen CdS-Niederschlags zurückzuführen.

Auch in Abb. 60 sind Polymersomen mit einer Größe über 200 nm zu erkennen, die nicht mehr ideal sphärisch sind. Auch bei diesen könnte die Wechselwirkung der Membran mit dem internen CdS-Niederschlag die Ursache für die Deformation sein. Allerdings wiesen Polymersomen mit dieser Größe bereits vor der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  Deformationen auf (s. Abb. 59), welche in jenem Fall womöglich durch die Probenvorbereitung für die Cryo-TEM bedingt sind.

Die CdS-Partikel können nicht scharf voneinander abgegrenzt visualisiert werden, da die zur Realisierung einer so hohen Auflösung notwendige Energie des Elektronenstrahls die Vesikel zerstören würden. Somit kann nicht mit Sicherheit zwischen einzelnen großen

Partikeln und Aggregaten kleinerer Partikel unterschieden werden. Dennoch liegt die Größe der Partikel auf den Cryo-TEM-Aufnahmen ungefähr in dem Bereich, der auch bei der Auswertung der UV/Vis-Spektren ermittelt wurde.

#### 4.3.4 Diskussion - CdS-haltige Polymersomen

Sowohl die visuell erkennbare gelbe Verfärbung, die zeitliche Änderung der UV/Vis-Spektren, als auch Cryo-TEM-Aufnahmen belegen die Bildung von CdS-Niederschlägen bei der Inkubation von aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen mit einer gesättigten  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung. Mittels Cryo-TEM konnte gezeigt werden, dass die gebildeten CdS-NP fast ausnahmslos intravesikulär vorliegen. Die Lokalisierung konnte dabei eindeutig anhand einer Kippserie über einen Bereich von  $60^\circ$  belegt werden. Zudem konnte exemplarisch anhand eines Polymersoms mit CdS-Niederschlägen eine Veränderung der Membrankrümmung in Nachbarschaft zu den CdS-Aggregaten nachgewiesen werden, was ebenfalls die Annahme der internen Lokalisierung von CdS-Niederschlägen untermauert.

Trotz Limitierung konnte die Größe der gebildeten CdS-Aggregate aus den Cryo-TEM-Aufnahmen abgeschätzt werden und liegt in einem Bereich von 1,5 - 9 nm. Somit stimmen die elektronenmikroskopisch ermittelten Größen sehr gut mit dem Bereich der über die UV/Vis-Messungen ermittelten maximalen Größe der CdS-Aggregate überein. In der Literatur sind nur zwei Beispiele bekannt, bei denen ebenfalls CdS-NP unter vergleichbaren Bedingungen in und an Liposomen generiert und dann mittels Cryo-TEM visualisiert werden konnten [21, 22]. Auf den dort gezeigten Aufnahmen weisen alle Liposomen mit einer Größe von ca. 70 nm selektiv nur ein einziges CdS-NP mit einer von der  $\text{CdCl}_2$ -Konzentration abhängigen Größe von 2,2 - 5,9 nm auf [21, 22]. Größere interne Aggregate von CdS-NP, wie sie im Fall der deutlich größeren Polymersomen beobachtet wurden, sind nicht zu erkennen. Die beobachteten größeren CdS-Aggregate im Inneren der Polymersomen können auf eine vergleichsweise größere Vesikelgröße und/oder auf eine höhere interne  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration zurückzuführen sein. Eine größere Anzahl an internen  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen bildet auch größere CdS-Partikel bzw. -Aggregate.

Die aus den UV/Vis-Spektren über die Lage der Absorptionskante von CdS-Partikeln bestimmten maximalen Partikelgrößen lagen in einem Bereich von 5 nm bis über 8,5 nm. Folglich führt die CdS-Fällungsreaktion nach der Inkubation von aufgereinigten,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen mit einer gesättigten  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung zu einer raschen

Bildung von CdS-Partikeln schon innerhalb von 30 Sekunden. Spätestens nach 30 min ist in keiner der untersuchten Dispersionen mehr eine Änderung der Lage der Absorptionskante zu beobachten. Teilweise verschob sich die CdS-Absorptionskante in weniger als 30 min bis zur „Grenze“ von bulk CdS mit einer Absorptionskante bei  $\lambda_{thres} = 515$  nm. Auch bei [18] war die CdS-Fällungsreaktion in 30 nm großen aufgereinigten,  $Cd^{2+}$ -haltigen Liposomen (bei identischer  $CdCl_2$ -Startkonzentration) nach 20 min abgeschlossen. Gleichwohl wurden dort nur Partikel bis zu einer maximalen Größe von 6 nm ausgefällt [18]. Dies kann auf die dort durch Ultraschall hergestellten, deutlich kleineren Vesikel zurückgeführt werden, die bei vergleichbarem  $Cd^{2+}$ -Gehalt eine geringe Anzahl an  $Cd^{2+}$ -Ionen als die größeren Polymersomen aufweisen. Vergleichbare UV/Vis-Spektren aufgrund der Bildung vergleichbar großer, vesikulärer CdS-Partikel sind auch in [21] zu finden.

Interessante und unerwartete Ergebnisse förderte die Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Lage der CdS-Absorptionskante und damit der maximalen Partikelgröße nach einheitlichen Messzeiten von 30 Sekunden sowie 30 min zu Tage. So zeigte sich, dass umso größere Partikel gebildet werden, je niedriger der intra- und extravesikuläre pH ist (Abb. 56). Dabei war der externe pH-Wert durch entsprechende Dialysemedien stets gleich dem internen pH-Wert. Allerdings sollte der externe pH-Wert mit Ausnahme des TRIS-HCl-Puffers ohne großen Einfluss sein, da dieser stets  $\leq 7$  war. Somit würde nur in externem TRIS-HCl-Puffer ein Teil des zugesetzten  $H_2S$  in  $HS^-$ -Ionen umgewandelt. Von der Abnahme der Partikelgröße bei zunehmendem externem pH-Wert einer zugesetzten  $Na_2S$ -Lösung wird auch in [18] berichtet. Dort erfolgten die Untersuchungen jedoch im Bereich von pH 7-10.

Die rasche  $H_2S$ -Permeation ins Innere von Vesikeln ist nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der CdS-Fällung, sondern vielmehr ein komplexerer intravesikulärer Prozess, der noch nicht genauer charakterisiert wurde [18]. Darum kann angenommen werden, dass das pH-abhängige Verhältnis von Keimbildungs- zur Keimwachstumsgeschwindigkeit im Vesikelinneren entscheidend für die resultierende maximale CdS-Partikelgröße ist. In das Vesikelinnere eindiffundierende  $H_2S$ -Moleküle stehen mit abnehmendem pH-Wert mit einem immer marginaleren Anteil an  $S^{2-}$ -Ionen, dem maßgeblichen Reagenz für die Bildung von CdS, im Gleichgewicht (vgl. Diskussion im Kapitel 3.3.5). Folglich bilden sich im Fall des Citratpuffers (pH 2) aufgrund der geringen Gleichgewichtskonzentration von  $S^{2-}$ -Ionen nur vergleichsweise wenige CdS-Kristallisationskeime, während bei höherem pH, d.h. höherer  $S^{2-}$ -Ionenkonzentration, rascher viele kleine CdS-Keime entstehen.

Aufgrund der verbleibenden hohen intravesikulären  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration bei pH 2 spielt somit wahrscheinlich das CdS-Keimwachstum eine gewichtigere Rolle und führt zur Bildung größerer Partikel als bei pH 4-5 sowie pH 7. Bei diesen höheren pH-Werten verursachen vermutlich die vielen, rasch gebildeten kleinen CdS-Keime eine starke Abnahme der intravesikulären  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration, so dass das Keimwachstum nicht mehr zu einer wesentlichen Größenzunahme der CdS-Partikel führen kann. Zudem scheinen mögliche Aggregationsprozesse im Zeitfenster der UV/Vis-Messungen die geringere Größe der Keime nicht maßgeblich zu verändern. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung untermauert, dass auf Cryo-TEM-Aufnahmen von bei pH 7 hergestellten, CdS-haltigen Polymersomen tatsächlich eine Vielzahl von Polymersomen viele sehr kleine CdS-NP mit einer Größe unter 3 nm aufweisen (Abb. 60b und 61a,b; indiziert schwarze Pfeile). Dies ist ein Indiz für die postulierte Bildung einer Vielzahl von CdS-Kristallisationskeimen bei pH 7.

Eine pH-abhängige Kristallbildungs- sowie -wachstumsgeschwindigkeit könnte auch die Bildung größerer CdS-Partikel bei abnehmendem pH trotz gleichzeitig abnehmender  $\text{Cd}^{2+}$ -Konzentration in Einklang bringen. Schließlich ergab die Quantifizierung von Cadmium in aufgereinigten Polymersomendispersionen (Abb. 53), dass in Citratpuffer (pH 2) ein geringerer  $\text{Cd}^{2+}$ -Gehalt vorlag als in Acetat- und TRIS-HCl-Puffer. Dennoch konnte zumindest für die  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration kein eindeutig erkennbarer Trend des Einflusses auf die CdS-Partikelgröße festgestellt werden. Auch bei *Vassiltsova et al.*, die dieselben  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentrationen (100 mM und 300 mM) wie im Fall der Polymersomen verwendeten, konnte keine Abhängigkeit der CdS-Partikelgröße von der jeweiligen  $\text{Cd}^{2+}$ -Startkonzentration in Liposomen festgestellt werden [18].

Eine Erhöhung der Menge an zugesetztem  $\text{H}_2\text{S}$  führte zu einer, wenn auch geringen Zunahme der Wellenlänge der Absorptionskante und somit zu größeren CdS-Partikeln. Dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Yu et al.* [103].

## 4.4 Kupferhaltige Polymersomen

### 4.4.1 Vorbemerkungen

$\text{Cu}^{2+}$ -haltige Liposomen sind von besonderem pharmakologischen Interesse, da geeignete Arzneistoffe wie z.B. Mitoxantrone in vorgeformten,  $\text{Cu}^{2+}$ -haltigen Liposomen mittels des so genannten *active loading* verkapselt werden können [106]. Die Triebkraft für den mit hohen Ausbeuten realisierbaren Einschluss liegt in der intravesikulären Komplexbildung des permeablen Arzneistoffs durch Metallionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen. Als Metallkomplex kann der Arzneistoff nicht mehr durch die Membran diffundieren und verbleibt somit dauerhaft im Vesikelinneren.

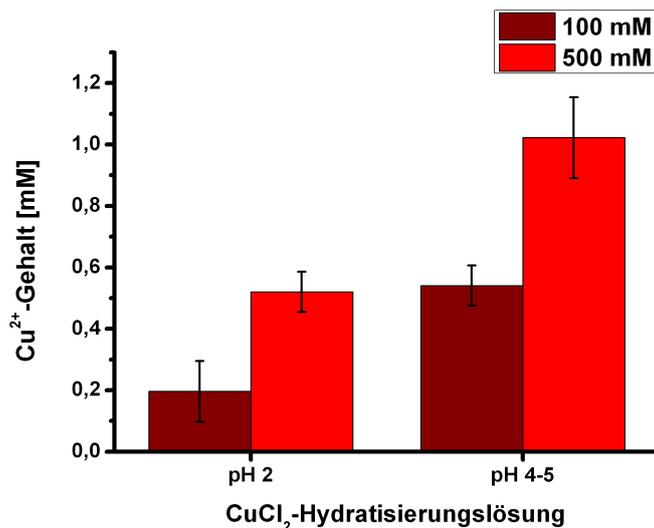
$\text{Cu}^{2+}$ -haltigen Polymersomen, die bislang noch nicht beschrieben wurden, konnten hier vergleichend zu  $\text{Cd}^{2+}$ - und CdS-haltigen Polymersomen hergestellt und zur intravesikulären CuS-Fällung mit einer gesättigten  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung versetzt wurden. CuS besitzt ein noch niedrigeres Löslichkeitsprodukt als CdS und fällt darum ebenfalls schon bei  $\text{pH} < 1$  aus  $\text{Cu}^{2+}$ -haltigen Lösungen bei Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  als schwarzer Feststoff aus [83].

Von der Synthese intravesikulärer CuS-NP in Liposomen wurde bereits berichtet [19,20]. Aufgrund der Reaktionskinetik der Fällungsreaktion in Liposomen postulieren *Igumenova et al.*, dass sich in Liposomen nicht-stöchiometrische  $\text{CuS}_x$ -NP bilden können, die eine überraschend hohe photokatalytische Aktivität aufweisen [19]. Diese Aktivität wird auf eine katalytische Oxidation von anwesenden  $\text{S}^{2-}$ -Ionen durch  $\text{Cu}^{2+}$ - bzw.  $\text{Cu}^+$ -Ionen bei der Bestrahlung zurückgeführt [19].

### 4.4.2 Herstellung und Charakterisierung $\text{Cu}^{2+}$ -haltiger Polymersomen

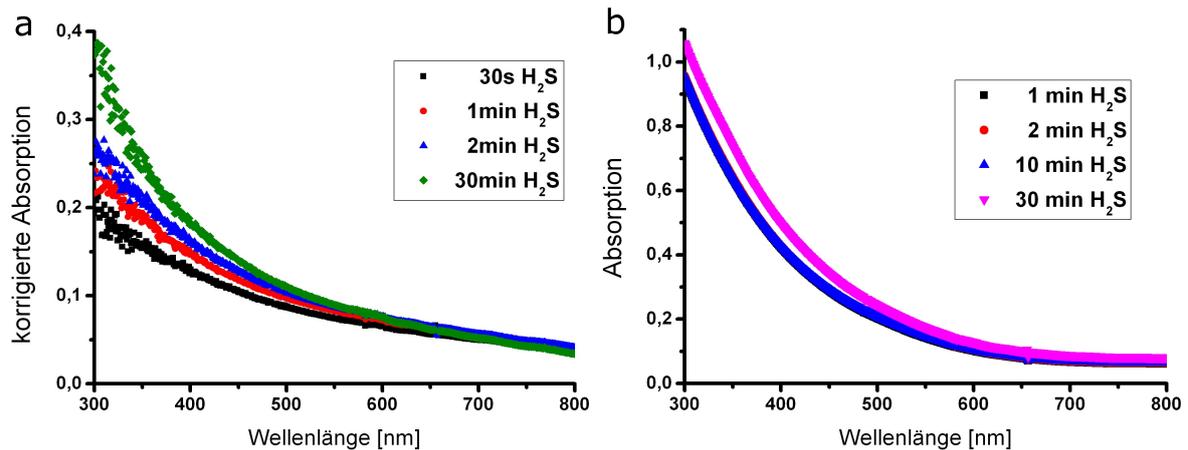
Es wurden Polymersomen mit einer 100 mM bzw. 500 mM  $\text{CuCl}_2$ -Lösung bei pH 2 (Citratpuffer) sowie pH 4-5 (Acetatpuffer) mit der Filmhydratisierungsmethode hergestellt. Das Arbeiten bei noch höheren pH-Werten ist aufgrund der damit verbundenen Ausfällung von  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  nicht möglich. Die erhaltenen  $\text{Cu}^{2+}$ -haltigen Polymersomen wurden mittels Dialyse in drei Schritten unter Verwendung von EDTA aufgereinigt. Es wurden farblose, polydisperse Vesikeldispersionen erhalten.

Der Cu-Gehalt aufgereinigter Polymersomendispersionen wurde mittels FAAS bestimmt. Dazu erfolgte eine Fünfpunkt-Kalibration im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1,0 mg/ml mit einem Kupfer-Standard. Die aufgereinigten Polymersomendispersionen wurden mit konzentrierter  $\text{HNO}_3$  aufgeschlossen, auf ein definiertes Volumen gebracht und anschließend vermessen. Die Ergebnisse der Kupfer-Bestimmung sind in Abb. 62 dargestellt.



**Abb. 62:** Mittels FAAS bestimmter Cu<sup>2+</sup>-Gehalt in aufgereinigten, Cu<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen bei unterschiedlichen pH-Werten und CuCl<sub>2</sub>-Startkonzentrationen

Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigen, dass sowohl der pH-Wert als auch die CuCl<sub>2</sub>-Startkonzentration den Cu<sup>2+</sup>-Gehalt von aufgereinigten Polymersomendispersionen beeinflussen. Dabei geht der Einsatz von Acetatpuffer (pH 4-5) im Vergleich zu Citratpuffer (pH 2) bei beiden untersuchten CuCl<sub>2</sub>-Startkonzentrationen mit einem mindestens doppelt so hohen Cu<sup>2+</sup>-Gehalt einher. Der deutlich höhere Cu<sup>2+</sup>-Gehalt in Acetatpuffer könnte mit der Ausbildung geringer Mengen von Cu(OH)<sub>2</sub>-Aggregaten zusammenhängen. Unter Verwendung des Löslichkeitsprodukts von Cu(OH)<sub>2</sub> ergibt sich, dass in einer 100 mM Cu<sup>2+</sup>-Lösung oberhalb von pH 4,8 Cu(OH)<sub>2</sub> gebildet wird. Auftretende Cu(OH)<sub>2</sub>-Aggregate könnten durch die damit verbundene lokale Aufkonzentrierung beim Einschluss in Polymersomen zu einer höheren Einschlussrate von Kupfer führen. Dennoch wirkt auch der eingesetzte Acetatpuffer als schwacher Ligand stabilisierend. Die Verfünffachung der CuCl<sub>2</sub>-Startkonzentration auf 500 mM führt in aufgereinigten Polymersomendispersionen zum 2,6-fachen Cu<sup>2+</sup>-Gehalt bei Verwendung von Citratpuffer (pH 2) bzw. zum 1,9-fachen Cu<sup>2+</sup>-Gehalt beim Arbeiten in Acetatpuffer (pH 4-5). Dass der Cu<sup>2+</sup>-Gehalt in aufgereinigten Polymersomendispersionen sich nicht um den gleichen Faktor wie die Startkonzentration verändert, könnte an der deutlich höheren Ionenstärke im System liegen.



**Abb. 63:** UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der CuS-Fällung nach Zugabe des doppelten Volumens einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung (a) zu einer aufgereinigten Cu<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersion (Startkonzentration 100 mM CuCl<sub>2</sub> bei pH 4-5) und (b) zu einer 0,8 mM CuCl<sub>2</sub>-Lösung (pH 4-5)

#### 4.4.3 Herstellung und Charakterisierung CuS-haltiger Polymersomen

Aufgereinigte, Cu<sup>2+</sup>-haltige Polymersomendispersionen wurden analog zu Cd<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen mit einer gesättigten wässrigen H<sub>2</sub>S-Lösung ( $c_{\text{H}_2\text{S}} \approx 100 \text{ mM}$ ) versetzt, um intravesikulär CuS auszufällen. Makroskopisch konnte dabei keine Verfärbung beobachtet werden, was womöglich auf die starke Lichtstreuung der Polymersomen zurückzuführen ist.

Die zeitliche Veränderung der Absorption von aufgereinigten, Cu<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersionen nach der Inkubation mit dem doppelten Volumen einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt. Aufgrund der Lichtstreuung der Polymersomen wurde hierbei von den erhaltenen UV/Vis-Spektren jeweils als Referenz das Spektrum der mit derselben Menge H<sub>2</sub>O verdünnten Polymersomendispersion subtrahiert.

Da CuS schwarz ist, können, anders als bei der Bildung von CdS-NP, keinerlei spezifische Absorptionsbanden bei der Entstehung von CuS-NP beobachtet werden. Somit lassen die erhaltenen UV/Vis-Spektren nur eine qualitative Aussage über die Bildung von CuS-Keimen und den damit verbundenen Anstieg der Absorption bzw. Streuung zu. Die zeitliche Veränderung des UV/Vis-Spektrums einer aufgereinigten, Cu<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomendispersion sowie als Vergleich für eine 0,8 mM CuCl<sub>2</sub>-Lösung nach Inkubation mit einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung ist in Abb. 63 dargestellt. Die Inkubation

führt in beiden Fällen zu einer sehr raschen Zunahme der Absorption, insbesondere bei Wellenlängen unter 600 nm. Diese Zunahme ist wahrscheinlich auf die Bildung von CuS-NP zurückzuführen, die für die Herausbildung einer Streulichtkurve sorgen. Im Fall der CuCl<sub>2</sub>-Lösung (Abb. 63b) ist die CuS-Fällungsreaktion bereits eine Minute nach der Inkubation mit der H<sub>2</sub>S-Lösung praktisch abgeschlossen und keine Veränderung des UV/Vis-Spektrums bis nach 10 min mehr detektierbar. Die nach 30 min beobachtete geringfügige Zunahme der Absorption kann durch Aggregationsprozesse der entstandenen CuS-NP verursacht sein. Die Ausfällung von kompartimentiertem CuS in Polymersomen (Abb. 63a) führt ebenfalls zu einer anfänglich raschen Zunahme der Absorption aufgrund der Bildung von CuS-Keimen. Im weiteren Verlauf der Messung kann nur noch eine geringe Erhöhung der Absorption bzw. Streuung bei Wellenlängen unter 600 nm detektiert werden. Das Wachstum von CuS-Keimen bzw. deren Aggregation scheint deutlich langsamer als die anfängliche CuS-Keimbildung abzulaufen.

Weitere Untersuchungen der Kinetik der intravesikulären CuS-Fällung mittels UV/Vis-Absorption ergaben, dass bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2 und 4-5) sowie einer Cu<sup>2+</sup>-Startkonzentrationen von 500 mM bzw. 100 mM jeweils eine sehr rasche Zunahme der Absorption nach der Inkubation mit einer gesättigten H<sub>2</sub>S-Lösung auftrat (vgl. Abb. 63a). Die Absorption aufgereinigter, Cu<sup>2+</sup>-haltiger Polymersomendispersionen nahm jeweils schon innerhalb der ersten 30 s nach der H<sub>2</sub>S-Inkubation sehr stark zu und blieb dann im Verlauf der weiteren 30 min nahezu unverändert. Diese weiteren Ergebnisse bestätigen den Befund, dass im Inneren der Cu<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen eine rasche CuS-Keimbildung gefolgt von einem nur noch langsamen CuS-Keimwachstum auftritt.

## 4.5 Diskussion - Übergangsmetallhaltige Polymersomen

Die eingehende Charakterisierung übergangsmetallhaltiger Polymersomen bestätigte einige Erkenntnisse, die bei der Untersuchung eisenhaltiger Polymersomen gefunden wurden, lieferte aber auch einige neue und unerwartete Einsichten. Insbesondere für die Untersuchung von CdS-haltigen Polymersomen standen aufgrund der photohalbleitenden Eigenschaften des CdS ganz neue Analysemöglichkeiten zur Verfolgung der Metallsulfidbildung in Polymersomen zur Verfügung. Zudem ermöglichten die Ergebnisse von Cryo-TEM-Untersuchungen NiS- und CdS-haltiger Polymersomen einen differenzierteren Blick auf die Bildung intravesikulärer Metallsulfid-NP und deren Stabilisierung in Vesikeln.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu nickelhaltigen Polymersomen waren im wesentlichen mit denen von eisenhaltigen Polymersomen vergleichbar. Dies wurde aufgrund der chemischen Verwandtschaft von Eisen und Nickel auch erwartet. So wurden vergleichbare Einschussraten von Ni<sup>2+</sup>-Ionen in Polymersomen wie für Fe<sup>2+</sup>-Ionen gefunden. Auch bei der Ausfällung von NiS in Ni<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen ließ sich anhand von Kontrollen belegen, dass es sich um eine intravesikuläre Fällungsreaktion handelt. Die Verfolgung der intravesikulären NiS-Fällungsreaktion mittels UV/Vis-Spektroskopie zeigte, dass eine deutliche Zunahme der Lichtstreuung bzw. -absorption bei Wellenlängen  $\lambda \leq 500$  nm auftrat. Ein solcher Effekt wurde ebenfalls bei der intravesikulären Ausfällung von FeS beobachtet und kann auf die Bildung von Metallsulfid-NP zurückgeführt werden, die einfallendes Licht mit abnehmender Wellenlänge stärker streuen.

Die Ausfällung von NiS in Polymersomen konnte durch Cryo-TEM-Untersuchungen deutlicher belegt werden als es für FeS der Fall war. So konnte die Bildung von intravesikulären Aggregaten von NiS-NP mit Größen im einstelligen Nanometer-Bereich sowie größerer Aggregaten bis zu 24 nm Größe beobachtet werden. Bei der Untersuchung aufgereinigter, Fe<sup>2+</sup>-haltiger Polymersomendispersionen, die sich nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>S dunkel verfärbt hatten, konnten solche Aggregate nicht beobachtet werden. Vergleichbar hingegen sind die bei der Untersuchung von sowohl FeS- als auch NiS-haltigen Polymersomendispersionen vereinzelt beobachteten dunklen Membranablagerungen an der inneren Membran von Polymersomen.

Es kommen verschiedene Ursachen für die großen Schwierigkeiten, die Bildung von FeS-NP in Polymersomen elektronenmikroskopisch nachzuweisen, infrage. Entweder sind die intravesikulären Bedingungen für eine Ausfällung von FeS-NP nicht gegeben. Oder die

gebildeten FeS-NP lösen sich während der Lagerung bzw. während der Probenpräparation für die Cryo-TEM aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von FeS oder einer hinreichend stark abnehmenden H<sub>2</sub>S-Konzentration (vgl. Kapitel 3.3.4) wieder auf. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die gebildeten FeS-NP einen zu geringen Kontrast für die Visualisierung auf Cryo-TEM-Aufnahmen aufweisen.

Dass eine intravesikuläre Ausfällung von FeS stattfindet, konnte anhand von Kontrollexperimenten eindeutig belegt werden. Hingegen hatte es sich als schwierig erwiesen, intravesikuläre FeS-NP mittels Cryo-TEM zu visualisieren. Aufgrund der fast identischen Ordnungszahl sollten Eisen(sulfid) und Nickel(sulfid) im TEM einen praktisch identischen Kontrast aufweisen. Dennoch kann eine zu geringe Größe und damit ein zu geringer Kontrast von intravesikulären FeS-NP als Ursache für die Schwierigkeiten beim Nachweis mittels Cryo-TEM nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. NiS weist ein um zwei Größenordnungen geringeres Löslichkeitsprodukt als FeS auf. Somit würde bei einem nur geringfügig überschrittenen Löslichkeitsprodukt im Inneren von Polymersomen die Ausfällung von NiS im Vergleich zu FeS in weitaus größerem Umfang ablaufen und folglich größere Metallsulfid-NP gebildet werden.

Am wahrscheinlichsten ist indes die Hypothese, dass zunächst gebildete FeS-NP sich deshalb nicht bei Cryo-TEM-Untersuchungen visualisieren lassen, da sie sich während der Lagerung (beobachtete Entfärbung!) oder während der Probenpräparation an Luft wieder auflösen. Dies ist aufgrund der im Fall von NiS-haltigen Polymersomen beobachteten geringen Größe gebildeter NiS-NP sehr gut vorstellbar. FeS-NP derselben Größe würden eine sehr große Oberfläche und damit eine hohe Reaktivität bzw. Empfindlichkeit aufweisen.

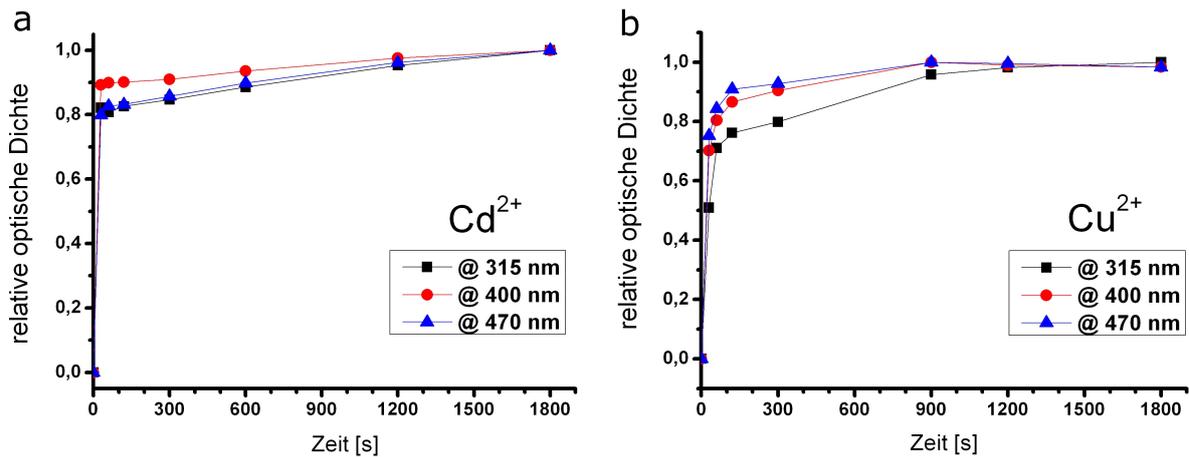
Kupfer- und cadmiumhaltige Polymersomen ergänzten die vergleichenden Untersuchungen zu eisenhaltigen Polymersomen. Da beide Metalle zur Schwefelwasserstoffgruppe im Kationen-Trennungsgang der qualitativen Analyse gehören [63], sollten diese beiden Metalle miteinander vergleichbar sein. Ein Vergleich ist zumindest im Fall der Einschlussraten möglich. Dabei zeigte sich, dass mit einer 100 mM CdCl<sub>2</sub>- bzw. CuCl<sub>2</sub>-Lösung hydratisierte Polymersomendispersionen nach der Aufreinigung deutlich verschiedene Einschlussraten aufwiesen. So wurde unabhängig vom pH-Wert für Cu<sup>2+</sup>-haltige Polymersomendispersionen eine mindestens viermal so hohe Einschlussrate wie für Cd<sup>2+</sup>-haltige Polymersomendispersionen in FAAS-Untersuchungen detektiert. Die Einschlussrate war in beiden Fällen in Citratpuffer (pH 2) ungefähr um den Faktor zwei geringer als in Acetatpuffer (pH 4-5). Dieser Effekt könnte zumindest im Fall von Cu<sup>2+</sup>-haltigen

Polymersomen mit der Bildung von  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -Hydroxid-Aggregaten erklärt werden. Als Ursache für diesen pH-abhängige Einschlusseffizienz ist auch der Einfluss des als Puffer verwendeten Citrats, welches ein deutlich stärkerer (Chelat-)Komplexbildner ist als Acetationen oder TRIS. Es wurde bereits berichtet, dass das verwendete Puffersystem die Einschussrate von Metallionen in Liposomen beeinflussen kann [65]. Die Einschussrate von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen lag auch in TRIS-HCl-Puffer (pH 7) deutlich unter der von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen. Für diese wurden bei Verwendung einer 60 mM Lösung eine höhere Einschussrate erzielt als für  $\text{Cd}^{2+}$ -haltige Polymersomen mit 100 mM  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration. Eine mögliche Erklärung ist eine nicht vollständige Hydratisierung des PB-PEO-Polymerfilms auch nach 16 Stunden Rütteln. Dies wurde mehrfach bei der Herstellung  $\text{Cd}^{2+}$ -haltige Polymersomendispersionen beobachtet.

Aus aufgereinigten,  $\text{Cu}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen konnte durch die Inkubation mit einer  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung intravesikuläres CuS ausgefällt werden. Dieser Prozess konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden. Die kompartimentierte Ausfällung von CuS, das makroskopisch ein schwarzer Feststoff ist, führt dabei zu vergleichbaren Ergebnissen wie NiS. Auch bei der intravesikulären Bildung von CuS wird eine starke Zunahme der Lichtstreuung bzw. -absorption bei Wellenlängen  $\lambda \leq 500$  nm beobachtet. Die Zunahme der Lichtstreuung bzw. -absorption erfolgt dabei sehr rasch. Schon nach 30 s wird in drei von vier untersuchten Systemen bereits eine Absorption detektiert, die nahezu identisch ist mit der nach 30 min. Die intravesikuläre Ausfällung von CuS ist folglich ein sehr rascher Prozess.

Die Inkubation aufgereinigter,  $\text{Cd}^{2+}$ -haltiger Polymersomendispersionen mit einer gesättigten  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung führte zur Ausfällung von gelbem CdS, was auch visuell erkennbar war. Die zeitliche Verfolgung der intravesikulären Bildung von CdS-NP mittels UV/Vis-Spektroskopie konnte sogar zur Abschätzung der Größe gebildeter NP genutzt werden. Dies liegt an den besonderen photohalbleitenden Eigenschaften von CdS und deren Größenabhängigkeit für CdS-Partikel mit Durchmessern unter 8 nm [104]. So ist für CdS-NP die Energielücke und damit die Absorptionskante größenabhängig [104]. Unter Verwendung der CdS-Absorptionskante, die den UV/Vis-Spektren entnommen werden kann, kann die Größe der CdS-NP abgeschätzt werden. Damit ließen sich potenzielle Einflussfaktoren auf die Geschwindigkeit der CdS-Keimbildung und des -wachstums näher verifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass sich umso größere CdS-Partikel bilden, je niedriger der intravesikuläre pH-Wert ist. Vergleichbare Aussagen sind auch schon für liposomale Systeme



**Abb. 64:** Verfolgung des Fällungskinetik über Veränderungen der korrigierten, relativen optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen für aufgereinigte (a)  $\text{Cd}^{2+}$ - und (b)  $\text{Cu}^{2+}$ -haltige Polymersomen (jeweils 100 mM Startkonzentration von  $\text{CdCl}_2$  bzw.  $\text{CuCl}_2$  bei pH 4-5) nach Inkubation mit der doppelten Menge einer gesättigten  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung

me, allerdings für einen Bereich von pH 7-10, bekannt [18]. Zudem führte die Inkubation mit zunehmenden Mengen einer  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung zur Zunahme der Partikelgröße von intravesikulär gebildeten CdS-NP. Die Variation der  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration beeinflusste zwar die Größe der CdS-Partikel, allerdings wurden bei verschiedenen pH-Werten auch verschiedene Ausprägungen dieses Parameters beobachtet. Für liposomale Systeme wurde im verwendeten Bereich der  $\text{CdCl}_2$ -Startkonzentration kein Einfluss auf die Größe der ausgefällten CdS-Partikel gefunden [18].

Die Kinetik der intravesikulären Bildung von Metallsulfiden kann anhand der zeitlichen Veränderung der optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen verfolgt werden [19]. Dabei werden die ermittelten UV/Vis-Spektren durch Subtraktion des UV/Vis-Spektrums der jeweiligen aufgereinigten Polymersomendispersion um den Betrag der Lichtstreuung durch die Polymersomen korrigiert. Da die intravesikuläre Metallsulfid-Fällungsreaktion jeweils spätestens nach 30 min abgeschlossen war, wurde das nach 30 min aufgenommene UV/Vis-Spektrum als Referenz (100%-Wert) verwendet. Für die zuvor aufgenommenen UV/Vis-Spektren wurde die auf den jeweiligen Wert nach 30 min bezogene relative optische Dichte bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt. Das Ergebnis der UV/Vis-spektroskopischen Verfolgung der Inkubation von vergleichbaren aufgereinigten,  $\text{Cu}^{2+}$ - bzw.  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomendispersionen mit einer  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung ist

in Abb. 64 dargestellt.

Es ist erkennbar, dass in beiden Fällen ein sehr starker Anstieg der optische Dichte im Vergleich zum Ausgangswert schon nach 30 s erfolgt. Auch bei der intravesikulären Ausfällung von CuS und CdS in Phospholipidvesikeln konnte eine anfänglich sehr hohe und dann kontinuierlich abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden [19].

Die Beobachtung einer anfänglich sehr raschen Reaktion ist auch in Übereinstimmung mit der aus der CdS-Absorptionskante desselben UV/Vis-Spektrums nach 30 s Inkubationszeit ermittelten CdS-Partikelgröße. Die Lage der CdS-Absorptionskante wies auf die Bildung von CdS-Partikeln mit einer Größe von ca. 8 nm hin. Im Zeitraum zwischen 30 s und 30 min ist für die cadmiumhaltigen Polymersomen eine, wenn auch nur geringe lineare Zunahme der optischen Dichte zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass bei der CdS-Fällungsreaktion zunächst eine sehr rasche Bildung von CdS-Partikeln erfolgt, an die sich ein deutlich langsamerer Prozess des CdS-Partikelwachstums anschließt.

Für die kupferhaltigen Polymersomen hingegen ist im Zeitraum zwischen 30 s und 30 min kein einheitlicher Verlauf zu erkennen. Die optische Dichte bei  $\lambda = 315$  nm nimmt kontinuierlich zu, während bei  $\lambda = 400$  nm und  $\lambda = 470$  nm bereits nach 15 min ein Maximum erreicht wird. Dies deutet darauf hin, dass die CuS-Fällungsreaktion bereits nach 15 min praktisch abgeschlossen ist.

In Cryo-TEM-Untersuchungen von CdS-haltigen Polymersomendispersionen konnten CdS-NP mit verschiedenen Größen visualisiert werden, die intravesikulär vorlagen. Aufgrund der deutlich höheren Ordnungszahl von Cadmium im Vergleich zu Eisen weisen CdS-Partikel auf TEM-Aufnahmen einen sehr dunklen Kontrast auf. Somit konnten sicher zwei verschiedene CdS-Partikelpopulation bei pH 7 unterschieden werden. Zum einen konnten in vielen Polymersomen CdS-NP mit einer Größe unter 3 nm beobachtet werden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass sich bei höheren pH-Werten viele, sehr kleine CdS-Partikel im Verlauf der H<sub>2</sub>S-Inkubation bilden (vgl. Kapitel 4.3.4). Zum anderen konnten größere CdS-Partikel mit einer Größe von 6 nm bis 9 nm detektiert werden, die teilweise in größere Aggregaten vorliegen. Die Deformation von Polymersomenmembranen durch solche internen CdS-Aggregate konnte ebenfalls beobachtet werden.

Die Cryo-TEM-Aufnahmen CdS-haltiger Polymersomen liefern wertvolle Hinweise zum Verständnis des Prinzips der Bildung intravesikulärer Metallsulfide, welche die Untersuchungen NiS- und insbesondere FeS-haltiger Polymersomen nicht liefern konnten. CdS-Partikel lassen sich aufgrund des erheblich niedrigeren Löslichkeitsprodukts und des

intensiveren Kontrasts auf TEM-Aufnahmen erheblich besser detektieren. Sollten sich bei pH 7,4 ebenfalls intravesikuläre FeS-Partikel mit einer Größe von maximal 3 nm bilden, so wären diese aufgrund des deutlich geringeren Kontrasts im Gegensatz zu CdS nicht mit Sicherheit detektierbar. Zudem könnten sich solch kleine FeS-Partikel, anders als unter diesen Bedingungen stabile CdS-Partikel derselben Größe, im Verlauf der Präparation für Cryo-TEM-Untersuchungen infolge von Oxidation oder abnehmender H<sub>2</sub>S-Systemkonzentration leicht auflösen. Intravesikuläres FeS konnte vermutlich aus diesen Gründen nur in deutlich größeren Polymersomen im Mikrometerbereich mittels REM-EDX sicher visualisiert und nachgewiesen werden konnte. Somit ergänzen die Cryo-TEM-Untersuchungen von CdS-haltigen Polymersomen sehr gut die mit derselben Methode erhaltenen, nur unzulänglichen Ergebnisse für FeS-haltige Polymersomen, indem der prinzipiell identische Vorgang der intravesikulären Ausfällung eines Metallsulfids in zuvor aufgereinigten Polymersomendispersionen sehr anschaulich beobachtet werden kann.

## 5 Untersuchungen zu Eisensulfiden

### 5.1 Motivation

Inspiziert durch die zentrale Rolle, die Eisensulfide in der Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese zur Entstehung eines ersten Pionier-Organismus gespielt haben könnten [44], sollten diese näher charakterisiert sowie deren Reaktivität an einer Modellverbindung untersucht werden. Das Redoxpaar FeS/H<sub>2</sub>S wird als Energiequelle und FeS bzw. das gebildete FeS<sub>2</sub> gleichzeitig als katalytisch wirksame Oberflächen zur Reduktion von CO<sub>2</sub> und den Aufbau organischer Verbindungen angesehen [45]. Die reduzierende Kraft des Systems FeS/H<sub>2</sub>S konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [47–52]. Die exemplarischen Untersuchungen zum Verständnis der Reduktionskraft des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems sollten hier anhand von Untersuchungen an DMSO ergänzt werden. Es sollte geklärt werden, ob sich das FeS/H<sub>2</sub>S-System als Modell für eine Art primitive DMSO-Reduktase eignet. Diese vielfältige Enzymklasse, deren aktives Zentrum eine Wolfram- oder ein Molybdän-Schwefel-Spezies ist, findet sich u.a. in marinem Phytoplankton und ist in der Lage, DMSO zu Dimethylsulfid (DMS) zu reduzieren [107]. Marines DMS besitzt als Quelle von Kondensationskeimen für die Wolkenbildung Relevanz für das globale Klima [54, 108].

Zunächst war es erforderlich, amorph gefälltes FeS, das bei den Untersuchungen verwendet wurde, hinsichtlich seiner Beschaffenheit und Reaktivität zu charakterisieren. Zudem sollte als Vergleich FeS<sub>2</sub> auf einem alternativen Weg hergestellt und näher charakterisiert werden. Zur Charakterisierung von mineralischen und synthetischen Eisensulfiden mittels BET-Bestimmung (BET - Brunauer-Emmett-Teller) der spezifischen Oberfläche [109], Elektronenmikroskopie [110] und spektroskopischen Methoden [111, 112] existieren bereits Vorarbeiten, die sich zu Referenzzwecken eignen.

Zusätzlich zu diesen Voruntersuchungen erfolgten Tests zur Bildung von H<sub>2</sub> nach der „Berzelius-Reaktion“ (Reaktion 5) in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors. Diese Experimente dienten zur Optimierung der Reaktionsführung bei Verwendung des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems und damit als Vorbereitung für die Untersuchungen zur Reduktion von DMSO. Zudem sollte verifiziert werden, ob tatsächlich ein Einschluss von H<sub>2</sub> in dem bei der Reaktion gebildeten Pyrit erfolgt, wie bereits zuvor postuliert [113].



## 5.2 Herstellung und Charakterisierung von amorphem FeS

Natürliche FeS-Minerale, die kommerziell erhältlich sind, eignen sich u.a. für die reduktive Dehalogenierung chlororganischer Verbindungen [114]. In meinen Untersuchungen wurde indes frisch gefälltes FeS für die Untersuchungen bevorzugt, da es amorph ist und aufgrund seiner Struktur eine erhöhte Reaktivität im Vergleich zu kommerziell erwerblichem (gealtertem) FeS aufweist [50, 87]. FeS kann durch Fällung aus einer Fe<sup>2+</sup>-haltigen Lösung mit einer Na<sub>2</sub>S-Lösung unter inerten Bedingungen erhalten werden. Zur Aufreinigung wird das ausgefällte FeS mehrmals mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann ggf. über Nacht unter inerten Bedingungen lyophilisiert. Dabei wird ein schwarzes Pulver erhalten.

Die Analyse einer derart präparierten Probe mit Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD) zeigte, dass die Probe kaum kristalline Anteile aufwies. Zur Absicherung, dass es sich bei der amorphen Substanz tatsächlich um FeS handelt, wurde eine frisch gefällte Probe zwei Wochen bei 65°C gelagert, um Kristallisationsprozesse zu induzieren. Nach einer identischen Aufreinigungsprozedur wurde ebenfalls eine PXRD des erhaltenen schwarzen Pulvers durchgeführt. Diese ergab, dass in der bei 65°C gelagerten Probe hauptsächlich Mackinawit Fe<sub>1+x</sub>S vorliegt. Dies deckt sich mit vorherigen Berichten zur Charakterisierung von frisch gefälltem FeS, in denen ebenfalls Mackinawit als dominante Kristallphase identifiziert wurde [109, 110].

Ein wichtiger, die Reaktivität mitbestimmender Parameter ist die spezifische Oberfläche einer Substanz. Für das amorph gefällte, aufgereinigte und lyophilisierte FeS wurde in BET-Untersuchungen eine spezifische Oberfläche von  $35,4 \frac{m^2}{g}$  ermittelt.

TEM-Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem ausgefällten FeS um größere Aggregate von Partikeln mit einer Größe von ca. 30 - 50 nm handelt. Während der TEM-Untersuchung begannen sich die FeS-Partikel bei höheren Elektronenenergien (Vergrößerung über 30000-fach) umzustrukturieren, so dass lediglich ein Überblick über die Probenbeschaffenheit gewonnen werden konnte.

Die ermittelten Werte der Partikelgröße und spezifischen Oberfläche sind in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben, in denen für amorph gefälltes FeS eine spezifische Oberfläche von  $36,5 \frac{m^2}{g}$  sowie eine mittlere FeS-Partikelgröße von 10 - 35 nm angegeben werden [109].

### 5.3 Herstellung und Charakterisierung von Pyrit $\text{FeS}_2$

Das Mineral Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) ist schon seit über 2000 Jahren bekannt und wurde u.a. bereits von Archimedes erwähnt [115]. Der Name kommt vom griechischen Wort für Feuer  $\piυρ$ , da Pyrit Funken sprüht, wenn auf das Mineral geschlagen wird [115]. Es ist die am häufigsten an der Erdoberfläche vorkommende Eisensulfid-Phase und thermodynamisch stabil [84].

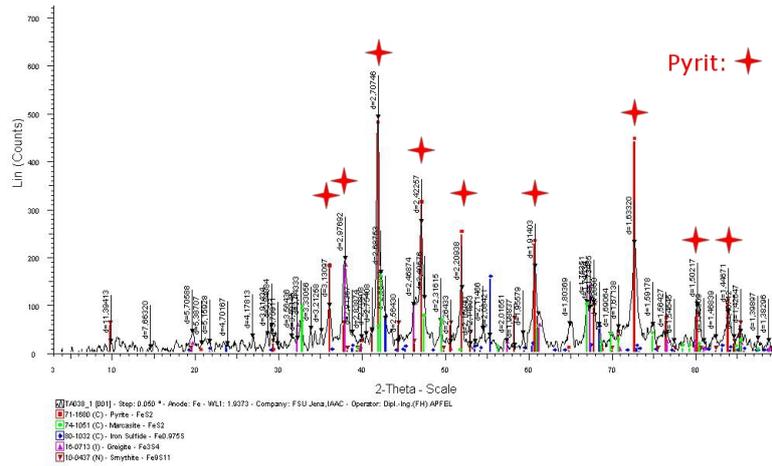
Obwohl in der Natur reichlich vorkommend, ist die gezielte Herstellung von Pyrit im wässrigen unter genau kontrollierbaren Bedingungen nicht einfach zu bewerkstelligen. Darum existieren eine Vielzahl verschiedener Berichte zur Herstellung von Pyrit, das indes meist in Mischungen mit anderen Eisensulfid-Phasen erhalten wird (zusammengefasst in [84]).

Aus der Vielzahl der Herstellungsmethoden wurden zwei verschiedene Ansätze auf ihre Eignung zur Herstellung von möglichst reinen Pyritpartikeln getestet. Zum einen wurde die von *Wei et al.* beschriebene Herstellung von Pyrit-Mikropartikeln durch die Reaktion von  $\text{FeCl}_3$  mit NaHS im wässrigen bei  $\text{pH} < 4$  getestet [116]. Zum anderen wurde die in [117] beschriebene Umsetzung von frisch gefälltem FeS mit elementarem Schwefel ( $\text{S}_8$ ) im wässrigen Milieu bei  $\text{pH} \geq 6$  und bei einer Temperatur von  $65^\circ\text{C}$  unter inerten Bedingungen getestet.

Das bei der ersten Methode entstandene schwarze Reaktionsprodukt wurde mittels PXRD charakterisiert. Es zeigte sich, dass Pyrit nur als Nebenprodukt gebildet wurde, während andere Eisensulfidphasen wie Mackinawit, Smythit ( $\text{Fe}_9\text{S}_{11}$ ) und Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) als Hauptprodukte überwogen.

Im Gegensatz dazu führte der zweite untersuchte Reaktionsweg tatsächlich zur Bildung von Pyrit. Dafür wurde das nach fünf Tagen Reaktionszeit erhaltene grauschwarze Reaktionsprodukt noch mit 5 M HCl zur Auflösung von magnetischen Mackinawit-Rückständen (vgl. [50]) und dann mit Cyclohexan zum Herauslösen von verbliebenem Schwefel behandelt. Eine Analyse des gereinigten Produkts mittels PXRD-Analyse zeigte, dass es hauptsächlich aus Pyrit besteht (s. Abb. 65). In dem gemessenen Diffraktogramm lassen sich die neun intensivsten Reflexe den bekannten Reflexen von Pyrit zuordnen. Weitere Reflexe anderer Eisensulfidphasen können nur Greigit ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) zugeordnet werden. Diese geringe Verunreinigung ist nicht überraschend, da der in [117] postulierte Reaktionsweg Greigit als eine Zwischenstufe bei der Pyritbildung einschließt. In [84] wird allerdings darauf hingewiesen, dass Greigit keine notwendige Zwischenstu-

## 5 Untersuchungen zu Eisensulfiden



**Abb. 65:** Röntgenpulverdiffraktogramm von aufgereinigtem Pyrit, hergestellt über die Reaktion von FeS und S<sub>8</sub>; Peaklagen von Pyrit durch Sterne indiziert

fe bei der Pyritbildung darstellt, sondern lediglich in einer konkurrierenden Reaktion gebildet wird.

Für zukünftige Oberflächenstudien wurde die spezifische Oberfläche des hergestellten Pyrits mittels BET-Methode zu  $42,5 \frac{m^2}{g}$  ermittelt. Dieser Wert liegt ca. 20 % über dem Wert von amorphem FeS.

## 5.4 Untersuchungen zur Reaktion von FeS und H<sub>2</sub>S

### 5.4.1 Vorbemerkungen

Die unter dem Namen *Berzelius*-Reaktion bekannte Reaktion von FeS und H<sub>2</sub>S (s. Reaktion 5) wurde bereits intensiv untersucht [84]. So wurde die Reaktion bei Temperaturen von bis zu 160°C [118] sowie bei 100°C [50] im wässrigen Milieu beschrieben. *Rickard et al.* führten Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Reaktion durch [113]. Dort wird postuliert, dass H<sub>2</sub>S als Elektronenakzeptor und FeS als Elektronendonator in der Reaktion fungieren. Bei Untersuchungen der Reaktion bei Temperaturen unter 125°C konnte indes nur ein Teil des H<sub>2</sub>, das in stöchiometrischen Mengen gebildet wird, detektiert werden [50, 113]. Es wird angenommen, dass der bei der Reaktion gebildete Wasserstoff mit den sich herausbildenden Pyrit-Oberflächen wechselwirkt und dadurch teilweise in wachsenden Pyritpartikeln eingeschlossen wird [113, 119].

Eine intensive Studie zur Kinetik der *Berzelius*-Reaktion ergab, dass die Reaktion relativ rasch abläuft und schon nach einem Tag bis zu 50 % Umsatz zu verzeichnen sind [109]. Da die Geschwindigkeit der Reaktion direkt von der Konzentration gelösten H<sub>2</sub>S abhängt, ergibt sich auch eine pH-Abhängigkeit der Reaktion.

Im Hinblick auf die geplanten Untersuchungen zur Reduktion von DMSO dienten die hier durchgeführten Untersuchungen dazu, eine Methode zur inertem Reaktionsführung sowie eine geeignete Nachweismethode für den bei der Reaktion von FeS mit H<sub>2</sub>S gebildeten H<sub>2</sub> mittels GC zu etablieren.

### 5.4.2 Durchführung und Analyse der Reaktionsprodukte

Die praktische Durchführung der *Berzelius*-Reaktion orientierte sich an den Angaben von *Rickard* [109]. Eine wässrige FeS-Suspension wurde unter inertem Bedingungen in einer H<sub>2</sub>S-Argon-Atmosphäre bei pH 6 für fünf Tage auf 90°C erhitzt. In einzelnen Reaktionen konnte dabei die Bildung einer silbrig glänzenden Schicht auf der Lösungsoberfläche oder an der Glaswand des Reaktionskolbens beobachtet werden. Dieser optische Effekt könnte durch sehr dünne Schichten von FeS oder FeS<sub>2</sub> verursacht werden und wurde bereits beschrieben [47].

Eine Probe aus der Gasphase des Reaktionsgefäßes wurde nach Beendigung der Reaktion mittels GC untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Gasraum des Reaktionskolbens geringe Mengen an H<sub>2</sub> aufwies. In Kontrollexperimenten unter denselben Bedingungen, bei denen entweder kein FeS oder kein H<sub>2</sub>S verwendet wurden, konnte nach fünf Tagen Lagerung

**Tab. 3:** Ergebnis der Reaktion von FeS und H<sub>2</sub>S sowie von Kontrollexperimenten; Bestimmung von H<sub>2</sub> mittels GC und von FeS<sub>2</sub> mittels Röntgenpulverdiffraktometrie**Ausgangsstoffe    Reaktionsprodukte**

| FeS | H <sub>2</sub> S | H <sub>2</sub> | FeS <sub>2</sub> |
|-----|------------------|----------------|------------------|
| +   | +                | +              | +                |
| +   | -                | -              | +                |
| -   | +                | -              | -                |

bei 90°C kein H<sub>2</sub> in GC-Untersuchungen gefunden werden (s. Tab. 3). Dies belegt, dass H<sub>2</sub> nur bei der Anwesenheit von beiden Reaktionspartnern, H<sub>2</sub>S und FeS, gebildet wird. Der feste Rückstand nach Beendigung der Reaktion wurde abgetrennt und getrocknet. Eine Analyse mittels PXRD ergab, dass dieser als Hauptbestandteil Pyrit enthält. Im Kontrollexperiment ohne Einsatz von H<sub>2</sub>S wurde indes ebenfalls Pyrit und nicht FeS als Hauptprodukt mittels PXRD identifiziert. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass bei der Präparation der Reaktionssuspension ein Oxidationsmittel wie z.B. Luftsauerstoff in das Reaktionsgefäß eingedrungen ist.

**5.4.3 Untersuchungen zum H<sub>2</sub>-Einschluss in Pyrit in der Berzelius-Reaktion**

Motivation für die Untersuchungen war die kontrovers diskutierte Hypothese, ob sich bei der *Berzelius*-Reaktion entstehender H<sub>2</sub> in den wachsenden Pyritpartikeln einlagert [113,119]. Die Ursache dafür könnte eine im Moment der Produktbildung von FeS<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> auftretende Wechselwirkung zwischen dem HOMO des FeS<sub>2</sub>, dessen Elektronendichte vorwiegend auf dem S<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Ion lokalisiert ist, und dem LUMO ( $\sigma_u^*$ ) des entstehenden H<sub>2</sub> sein [113]. Diese Wechselwirkung könnte die Adsorption von H<sub>2</sub> auf einer Pyritoberfläche ermöglichen [113].

Konkreter Anlass zu dieser Hypothese war die Beobachtung, dass bei der Analyse der Reaktionsprodukte keine stöchiometrischen Mengen an H<sub>2</sub> im Vergleich zum entstandenen Pyrit gefunden werden konnten [50,109]. Erst durch die CrCl<sub>2</sub>-Reduktion des Pyrit nach *Canfield et al.* [120], die den Schwefel zu H<sub>2</sub>S reduziert, zur Auflösung des Pyrit und zur Freisetzung von eingeschlossenem H<sub>2</sub> führt, konnte *Rickard* die erwartete, stöchiometrische Menge an H<sub>2</sub> nachweisen [109]. *Rickard* verweist dabei auf unpublizierte Daten. Allerdings fehlt in der Literatur eine spätere, genaue Darstellung seiner Ergebnisse.

Aufgrund dieses nicht abschließend geklärten Standes der Forschung wurde eine Probe des bei der *Berzelius*-Reaktion erhaltenen festen Reaktionsprodukts sowie mehrere Kontrollproben analog der Beschreibung in [109] unter inerten Bedingungen und Kühlung mit einer salzsauren, 0,5 M CrCl<sub>2</sub>-Lösung in einem abgeschlossenen Probengefäß behandelt. Nach mehr als drei Stunden wurde mit einer gasdichten Spritze aus dem Gasraum über der jeweils mit CrCl<sub>2</sub> behandelten Substanz eine Probe genommen und 100 µl davon mittels GC auf H<sub>2</sub> untersucht. Die dabei ermittelte H<sub>2</sub>-Menge lässt nur qualitative Aussagen über die Menge freigesetzten H<sub>2</sub> zu, da die Probenmassen nicht exakt bestimmbar waren.

Es zeigte sich, dass beim Auflösen von Pyrit erhebliche Mengen an H<sub>2</sub> entstehen. Die Fläche des H<sub>2</sub>-Signals im Gaschromatogramm ist dabei stets deutlich größer als die des als Schutzatmosphäre verwendeten Argons. Ähnliche Mengen an H<sub>2</sub> konnten in allen untersuchten Pyritproben detektiert werden, unabhängig davon, ob diese durch die *Berzelius*-Reaktion oder durch die Reaktion von FeS und S<sub>8</sub> (s.o.) hergestellt wurden. Amorphes FeS setzt bei der Behandlung mit CrCl<sub>2</sub>-Lösung nur Spuren an H<sub>2</sub> frei, während im Gasraum über der verwendeten CrCl<sub>2</sub>-Lösung nach mehreren Stunden inerte Lagerung kein H<sub>2</sub> mittels GC gefunden wurde.

### 5.4.4 Diskussion

Die Untersuchungen zeigten, dass die *Berzelius*-Reaktion unter den gewählten Reaktionsbedingungen abläuft. Dies konnte anhand des qualitativen Nachweises von H<sub>2</sub> mittels GC sowie FeS<sub>2</sub> mittels PXRD belegt werden. Ein silbriges Reaktionsprodukt, das dann als Pyrit identifiziert wurde, ist schon in früheren Untersuchungen zur Reduktionskraft des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems beschrieben worden [47].

Unklar ist, warum sich im Kontrollexperiment ohne H<sub>2</sub>S ebenfalls Pyrit gebildet hatte, der zudem laut PXRD-Untersuchung einen größeren kristallinen Anteil als der in der *Berzelius*-Reaktion entstandene aufwies. Da bei diesem Kontrollexperiment aber kein H<sub>2</sub> gebildet wurde, muss der Pyrit auf einem alternativen Reaktionsweg entstanden sein. Möglich ist, dass durch einen unbeabsichtigten Eintrag von Luftsauerstoff in das Reaktionsgefäß Fe<sup>2+</sup>- zu Fe<sup>3+</sup>-Ionen oxidiert wurden. Da Fe<sup>3+</sup>-Ionen mit Sulfidionen unter Schwefelbildung reagieren [84], könnte es zu der im Kapitel 5.3 beschriebenen Reaktion von FeS mit elementarem Schwefel gekommen sein, die zur Bildung von Pyrit führt.

Die Analyse des festen Reaktionsproduktes sowie mehrerer Kontrollen zeigte, dass beim

reduktiven Auflösen aller Pyritproben mit  $\text{CrCl}_2$  Wasserstoff freigesetzt wird. D.h., auch Pyrit, in dem gar kein  $\text{H}_2$  eingeschlossen sein sollte, generiert  $\text{H}_2$  bei der Reaktion mit  $\text{CrCl}_2$ . Die Ursache dafür könnte in einer Eisen-katalysierten Reduktion von Protonen durch  $\text{Cr}^{2+}$ -Ionen sein, die zur  $\text{H}_2$ -Entwicklung führt. Dafür spricht weiterhin, dass in einer entgasten  $\text{CrCl}_2$ -Lösung kein  $\text{H}_2$  entwickelt wird. Bei der Beschreibung der  $\text{CrCl}_2$ -Methode wird über keine mit dem Auflösen von Pyrit verbundene  $\text{H}_2$ -Bildung, sondern nur von der quantitativen Freisetzung von  $\text{H}_2\text{S}$  aus Pyrit berichtet [120].

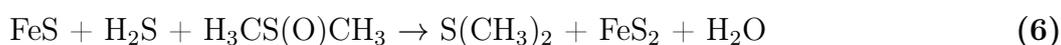
Folglich ist die Methode nicht geeignet, um die Hypothese von in Pyrit eingeschlossenem  $\text{H}_2$  experimentell zu untersuchen. Dieser Befund könnte die Ursache dafür sein, dass der von *Rickard* nur verbal geführte Nachweis des Einschlusses von  $\text{H}_2$  in Pyrit mit dieser Methode in [109] bis heute nicht mit genauen Ergebnissen publiziert ist.

Die zur Durchführung der *Berzelius*-Reaktion entwickelte Reaktionsführung und der GC-Nachweis von  $\text{H}_2$  stellen erfolgreiche Vorarbeiten dar. Darauf aufbauend konnten die Untersuchungen zur Reduktion von DMSO durch das  $\text{FeS}/\text{H}_2\text{S}$ -System durchgeführt werden. Zudem sind die Vorarbeiten wertvoll für die geplante Durchführung und Analyse der *Berzelius*-Reaktion in einem Kompartiment, z.B. in einem Vesikel.

## 5.5 Untersuchungen zur Reduktion von DMSO durch das FeS/H<sub>2</sub>S-System

### 5.5.1 Vorbemerkungen

Vor dem Hintergrund der postulierten zentralen Rolle des FeS/H<sub>2</sub>S-System als potenzielle präbiotische Energiequelle im Eisen-Schwefel-Welt-Szenario wurde die Reduktion DMSO zu DMS untersucht. Das FeS/H<sub>2</sub>S-System mit einem Standardpotenzial von  $E^\circ = -620 \text{ mV}$  [45] sollte prinzipiell in der Lage sein, das milde Oxidationsmittel DMSO mit einem Standardpotenzial von  $E^\circ(\text{DMS}/\text{DMSO}) = +160 \text{ mV}$  [121] zu reduzieren. Konkret sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen eine Reaktion nach Reaktion 6 abläuft:



Die Reduktionskraft des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems an der Modellverbindung DMSO wurde vor dem Hintergrund von Vorarbeiten von der Gruppe um Kläwi zur Reduktion von aromatischen und benzyllischen Sulfoxiden durch FeS/H<sub>2</sub>S getestet. DMSO wurde im Hinblick auf seine größere primordiale Relevanz im Vergleich zu aromatischen Sulfoxiden eingesetzt.

Im aktiven Zentrum moderner DMSO-Reduktasen befindet sich ein Mo- bzw. W-Atom, das durch Schwefelliganden komplexiert und stabilisiert wird [119, 122]. Mo und W eignen sich als aktive Zentren besonders gut, da sie hohe Oxidationsstufen bis +6 aufweisen können und somit die Funktionalität von DMSO-Reduktasen als eine Art Oxotransferase, d.h. als formaler Überträger eines O-Atoms, gewährleisten können [123]. Durch die Wirkung der DMSO-Reduktase gebildetes DMS hat beim Entweichen in die Atmosphäre klimatische Bedeutung als Quelle von Wolkenkondensationskeimen [54, 108].

### 5.5.2 Durchführung und Beobachtungen

Es sollte gezeigt werden, ob und in welchem Umfang DMSO durch FeS/H<sub>2</sub>S zu Dimethylsulfid (DMS) reduziert werden kann. Dazu wurden äquimolare Mengen (jeweils 2 mmol) der Reaktanden FeS/H<sub>2</sub>S und DMSO verwendet.

Die Experimente wurden in verschlossenen Schlenkgefäßen unter inerten Bedingungen bei 95°C über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen durchgeführt. FeS wurde dafür frisch gefällt (durch Zugabe einer Na<sub>2</sub>S-Lösung zu einer intensiv gerührten FeCl<sub>2</sub>-Lösung) und anschließend entgast DMSO zugegeben. Der experimentell schwierigste Schritt, die

Dosierung von H<sub>2</sub>S im Reaktionsgefäß, erfolgte mittels Injektionsspritzen. Dabei wurde H<sub>2</sub>S über ein Septum in den Schlenkkolben, in dem zuvor der Druck reduziert wurde, injiziert.

Im Verlauf der Reaktion bildeten sich bei einigen Experimenten schon nach einem Tag graue Partikel auf der Oberfläche der Suspension und nach mehreren Tagen silbrig glänzende Partikel. Im Falle des Kontrollexperimentes mit H<sub>2</sub>S und DMSO in Abwesenheit von FeS wurde die Bildung eines hellgelben Feststoffs an der Lösungs-Oberfläche schon nach einem Tag beobachtet. Das Kontrollexperiment ohne Injektion von H<sub>2</sub>S zeigte im Reaktionsverlauf keine nennenswerten Veränderungen. Die Suspension veränderte ihr Aussehen im Verlauf von zwei Wochen bei 90°C nicht. Bei allen durchgeführten Reaktionen wurde der charakteristische Geruch von DMS beim Öffnen des Reaktionsgefäßes nach Beendigung der Reaktion wahrgenommen.

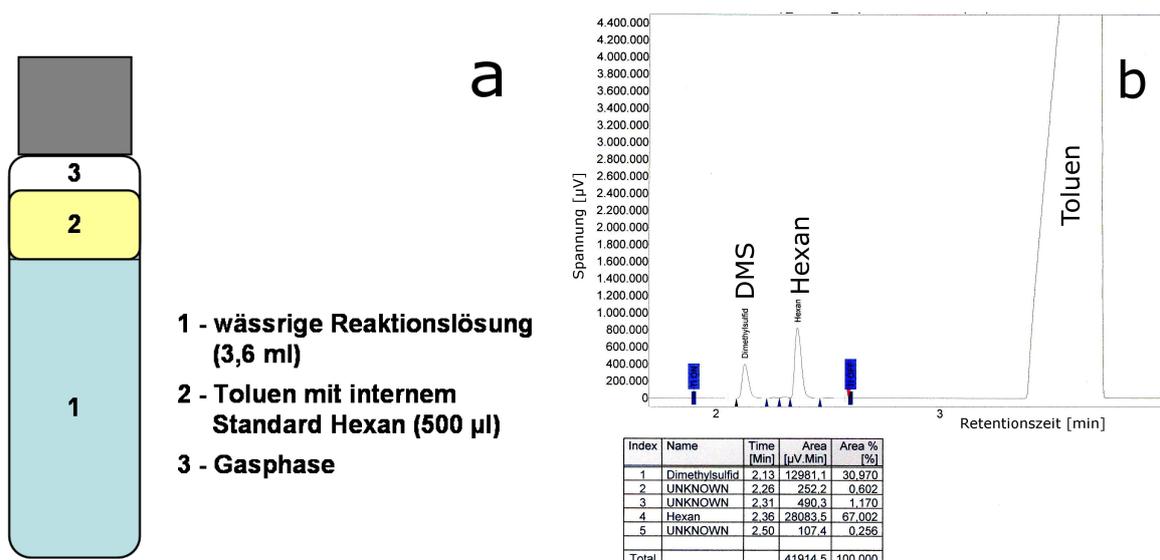
### 5.5.3 Quantitative Bestimmung des DMS-Gehaltes mittels GC

#### Methodenentwicklung

Ausgehend von dem olfaktorischen Befund der Bildung von DMS musste eine geeignete Methode zur Analyse des Reaktionsgemisches und zur Bestimmung der Ausbeute an gebildetem DMS entwickelt werden. Hierbei mussten der niedrige Siedepunkt von DMS (37°C) und der hohe Dampfdruck von 53 kPa schon bei 20°C berücksichtigt werden. Die Löslichkeit von DMS in H<sub>2</sub>O liegt bei 20  $\frac{g}{l}$  [124]. Die maximale Löslichkeit in H<sub>2</sub>O liegt somit deutlich unter der Konzentration von DMS in der Reaktionslösung, die bei vollständigem Umsatz zu erwarten ist. Allerdings musste auch der hohe Dampfdruck des DMS, der zu einer Verteilung des DMS sowohl in der Flüssigkeits- als auch in der Gasphase führt, mit berücksichtigt werden. Es bot sich die Entwicklung einer Methode zur Extraktion des DMS aus dem Reaktionsgemisch bei tiefen Temperaturen und dessen Quantifizierung mittels Gaschromatographie (GC) an.

Hierzu wurden zunächst verschiedene organische Lösungsmittel auf ihre Eignung zur Extraktion hin untersucht. Toluol erwies sich dabei als geeignet, da es sowohl eine effektive Extraktion von DMS ermöglicht als auch aufgrund seiner deutlich längeren Retentionszeit bei der GC nicht die Bestimmung von DMS beeinträchtigt. Als interner Standard für die GC-Untersuchungen kam *n*-Hexan zum Einsatz.

Die Extraktion von DMS aus einer Probe der Reaktionslösung erfolgt in einem GC-Probengefäß (s. Abb. 66a). Dabei wurden 500  $\mu$ l der Toluollösung mit 15  $\frac{mg}{ml}$  *n*-Hexan



**Abb. 66:** (a) Schematische Darstellung der Extraktion von DMS aus einer Probe der Reaktionslösung in einem GC-vial und (b) Beispiel-Gaschromatogramm von DMS in Toluol mit *n*-Hexan als internem Standard; zusätzlich detektierte, kleine Peaks (als „unknown“ in Tabelle aufgeführt) von Hexan-Isomeren

als internem Standard vorgelegt und dann 3,6 ml des klaren Überstands der Reaktions suspension dazugegeben. Nach dem Verschließen erfolgte bei 0°C ein intensives Durchmischen der beiden Phasen, um einen möglichst vollständigen Transfer des DMS in die Toluolphase zu gewährleisten. Der Vorteil des GC-Probengefäßes besteht darin, dass es relativ dicht zu verschließen ist und nur einen kleinen Gasraum über der Toluolphase aufweist.

Nach der Extraktion des DMS in die organische Phase wurden ca. 2,5 µl der organischen Phase entnommen und mittels GC (mit Flammenionisationsdetektor - FID) untersucht. Ein Beispiel für ein Gaschromatogramm einer solchen Messung ist in Abb. 66b dargestellt. Es ist zu erkennen, dass DMS, *n*-Hexan und Toluol mit Retentionszeiten von 2,13 Minuten (DMS), 2,36 Minuten (*n*-Hexan) und ca. 3,6 Minuten (Toluol) deutlich voneinander getrennt detektiert werden können. Die weiteren, sehr kleinen detektierten Signale stammen von den drei Isomeren des Hexan. Die Zuordnung der jeweiligen GC-Signale zu den Verbindungen DMS, *n*-Hexan und Toluol wurde mittels GC-MS abgesichert. Die GC-Methode ist demnach für die Bestimmung von DMS geeignet.

### Kalibration zur quantitativen Bestimmung von DMS mittels GC

Um eine quantitative Bestimmung des DMS-Gehalts in der Reaktionslösung zu ermöglichen, wurde zunächst eine Kalibration unter möglichst authentischen Bedingungen durchgeführt, wie sie auch Anwendung für die Analyse der Reaktionslösungen fanden. Dies sollte dazu dienen, den Fehler durch das bei der Extraktion nicht erfasste DMS in der Gasphase der Reaktionsgefäße zu minimieren. Folglich wurden die gleichen Schlenkgefäße wie bei den Experimenten und ein identisches Volumen an NaCl-Lösung bei der DMS-Kalibration verwendet. DMS wurde in den Schlenkgefäßen eingewogen und equilibriert, bevor die Probennahme analog zu den Reaktionsgefäßen erfolgte.

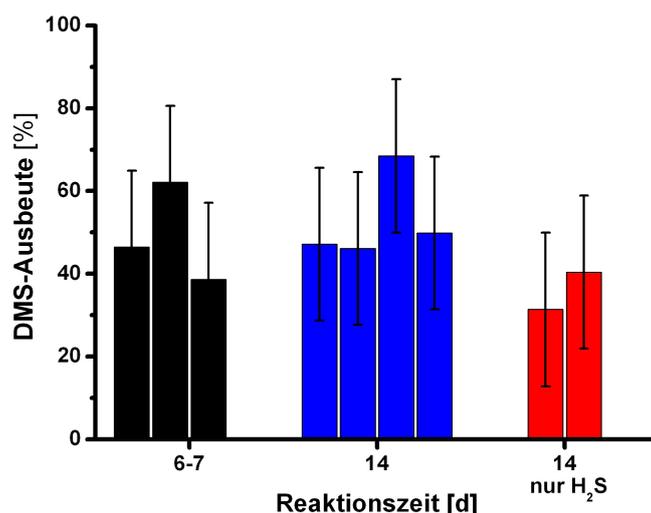
Als interner Standard wurden  $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  *n*-Hexan in Toluol verwendet, um möglichst vergleichbare Flächengrößen der Signale von DMS und Hexan im Gaschromatogramm zu gewährleisten. Durch den internen Standard war es möglich, einem Verhältnis der Flächen von DMS und Hexan im Gaschromatogramm jeweils eine entsprechende Menge an DMS in der Probe zuzuordnen.

Für eine Kalibration wurden die Quotienten aus dem Flächenverhältnis von DMS und Hexan für neun verschiedene, definierte DMS-Mengen im Bereich von 6,2 mg (0,1 mmol) bis 235,4 mg (3,8 mmol) in einem Schlenkgefäß bestimmt. Die aufgenommene Kalibration eignet sich für die Bestimmung des DMS-Gehalts in Proben von Reaktionssuspensionen. Allerdings weisen aufgrund der Streuung von Kalibrationspunkten bei höherem DMS-Gehalt die ermittelten DMS-Ausbeuten der Reduktionsreaktion von DMSO einen erheblichen Fehlerbereich auf (vgl. Abb. 67).

### Quantifizierung des bei der Reduktion von DMSO gebildeten DMS

Die Reduktion von DMSO zu DMS mit dem FeS/H<sub>2</sub>S-System wurde bei 95°C für unterschiedliche Reaktionszeiten untersucht. In Kontrollexperimenten mit einer Reaktionszeit von 14 Tagen wurde zudem untersucht, ob FeS ohne H<sub>2</sub>S oder ob H<sub>2</sub>S ohne FeS ebenfalls in der Lage sind, DMSO zu DMS zu reduzieren. Des Weiteren wurde untersucht, ob DMSO in wässriger NaCl-Lösung unter identischen Reaktionsbedingungen, allerdings in Abwesenheit von FeS und H<sub>2</sub>S, DMS generiert.

Es zeigte sich, dass beim Erhitzen von DMSO unter den gleichen Bedingungen keinerlei DMS gebildet wurde. Bei allen anderen Experimenten konnte die Bildung von DMS festgestellt werden. Die auf das eingesetzte DMSO bezogenen Ausbeuten an DMS in einzelnen Experimenten für verschiedene Reaktionszeiten für das FeS/H<sub>2</sub>S-System sowie



**Abb. 67:** DMS-Ausbeute einzelner Experimente der Reduktionsreaktion von DMSO durch FeS/H<sub>2</sub>S bzw. nur H<sub>2</sub>S für verschiedene Reaktionszeiten; Ermittlung der Werte samt zugehöriger Unsicherheit über Kalibration

für H<sub>2</sub>S (in Abwesenheit von FeS) sind in Abb. 67 dargestellt.

Es ist erkennbar, dass bei der DMSO-Reduktion durch das FeS/H<sub>2</sub>S-System schon nach sechs bis sieben Tagen vergleichbare DMS-Ausbeuten wie nach 14 Tagen Reaktionszeit realisierbar sind. Die erzielten DMS-Ausbeuten liegen bei mehr als der Hälfte der Experimente in einem Bereich von etwa 40 - 50 %. In zwei Experimenten wurden sogar DMS-Ausbeuten von über 60 % realisiert.

Überraschend hoch sind auch die DMS-Ausbeuten bei der DMSO-Reduktion durch H<sub>2</sub>S. Hierbei wurden nach 14 Tagen Reaktionszeit Werte von ca. 30 - 40 % ermittelt. Dies belegt, dass auch H<sub>2</sub>S ein effektives Reduktionsmittel für DMSO ist.

Die Ausbeute bei der Reduktion durch FeS (in Abwesenheit von H<sub>2</sub>S) lag unterhalb der Bestimmungsgrenze und kann darum nur abgeschätzt werden. Es wurde eine DMS-Ausbeute von ca. 10 % bezogen auf das eingesetzte DMSO ermittelt. Dies könnte auf den 10 %-igen Überschuss an Natriumsulfid-Lösung zur Gewährleistung einer vollständigen Fällung von Fe<sup>2+</sup>-Ionen als FeS zurückzuführen sein. In der Reaktionssuspension verbliebene HS<sup>-</sup>-Ionen sollten genauso reaktiv sein wie im Wässrigen bei pH 7 protolyisiertes H<sub>2</sub>S im Kontrollexperiment.

Die Reduktion von DMSO durch das FeS/H<sub>2</sub>S-System führt zu etwas höheren Ausbeuten als mit H<sub>2</sub>S in Abwesenheit von FeS. Der Vergleich der Ausbeuten lässt offen, ob im Fall des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems lediglich H<sub>2</sub>S und FeS unabhängig voneinander DMSO

zu DMS reduzieren, oder ob DMS durch eine „pyrite-pulled reaction“, d.h., durch das FeS/H<sub>2</sub>S-System unter Pyritbildung entstanden ist. Dies kann nur durch eine Analyse des erhaltenen, festen Reaktionsproduktes mittels z.B. PXRD oder MS geklärt werden.

### 5.5.4 Analyse der festen Reaktionsprodukte

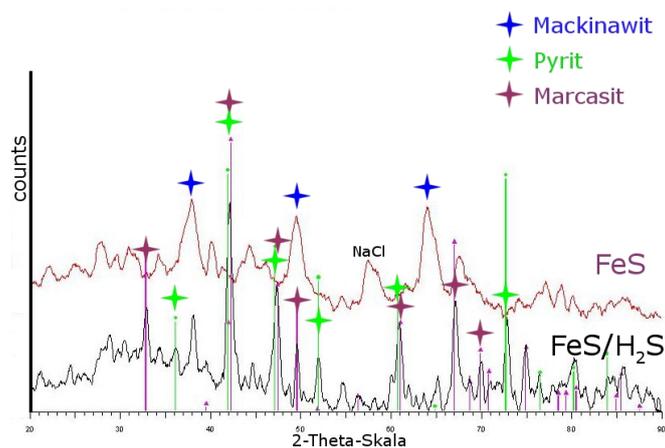
Die erhaltenen grau-schwarzen Reaktionsrückstände wurden nach der Beendigung der Reaktionen und der Probennahme für die DMS-Bestimmung unter inerten Bedingungen zentrifugiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Der im Kontrollexperiment in Abwesenheit von FeS erhaltene gelbe Feststoff wurde abgetrennt und an Luft getrocknet.

#### PXRD-Analyse

Die gereinigten, getrockneten Niederschläge, die bei den DMSO-Reduktionsexperimenten in Anwesenheit von FeS/H<sub>2</sub>S bzw. FeS entstanden, wurden mittels PXRD charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass FeS<sub>2</sub> als Pyrit bzw. Markasit das Hauptprodukt der DMSO-Reduktion durch FeS/H<sub>2</sub>S ist (s. Abb. 68, unteres Diffraktogramm). Die vier intensivsten Reflexe im Diffraktogramm können Pyrit und Markasit zugeordnet werden. Dies belegt, dass das FeS/H<sub>2</sub>S-System konzertiert die Reduktion von DMSO bewirkt. Mackinawit (Fe<sub>1+x</sub>S), das auf nicht reagiertes FeS zurückgeführt werden kann, liegt als Nebenprodukt vor. Es fanden sich nur sehr intensitätsschwache Reflexe, die auf elementaren Schwefel S<sub>8</sub> hinweisen, so dass dieser vermutlich nur als Nebenprodukt in geringen Mengen bei der Reaktion entstanden ist.

Im Kontrollexperiment mit FeS ohne H<sub>2</sub>S, bei dem ebenfalls die Bildung geringer Mengen DMS nachgewiesen wurde, ergab die PXRD-Analyse, dass sich kein Pyrit gebildet hat (s. Abb. 68, oberes Diffraktogramm). Vielmehr ist Mackinawit (Fe<sub>1+x</sub>S) das Hauptprodukt, da diesem die drei intensivsten Reflexe im Diffraktogramm zugeordnet werden konnten. Mackinawit wurde auch schon in vorangegangenen Experimenten als Alterungsprodukt von amorph gefälltem FeS identifiziert (s. Kapitel 5.2).

Der Vergleich der Diffraktogramme beider Proben (s. Abb. 68) zeigt einen deutlichen Unterschied. Die Bildung von Pyrit beim Einsatz von FeS/H<sub>2</sub>S belegt, dass DMSO konzertiert reduziert wurde. Die mögliche Konkurrenzreaktion, die Reduktion von DMSO durch H<sub>2</sub>S, spielt in Gegenwart von FeS nur eine untergeordnete Rolle. Gleichwohl kann mittels PXRD-Analyse keine Aussage zum Anteil potenziell entstandenem, elementarem Schwefel im festen Reaktionsrückstand gemacht werden.

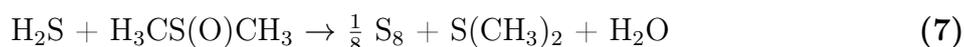


**Abb. 68:** PXR-Diffraktogramm der Reaktionsprodukte der DMSO-Reduktion mit FeS (oben) sowie mit FeS/H<sub>2</sub>S (unten); Zuordnung der Reflexe der Hauptprodukte bei der Reaktion mit FeS (Mackinawit) bzw. mit FeS/H<sub>2</sub>S (Pyrit und Markasit)

### Massenspektrometrie

Die entstandenen festen Reaktionsprodukte der Reaktion von FeS/H<sub>2</sub>S mit DMSO sowie die festen Reaktionsrückstände der Kontrollexperimente mit FeS bzw. mit H<sub>2</sub>S wurden mittels Massenspektrometrie (MS) untersucht. Dazu wurde jeweils eine Probe der gewaschenen und getrockneten Reaktionsrückstände in einen MS-Tiegel gegeben und dieser mit einem definierten Temperaturprogramm mittels MS untersucht.

Der beim Kontrollexperiment mit H<sub>2</sub>S entstandene, hellgelbe Feststoff konnte eindeutig als Schwefel (S<sub>8</sub>) identifiziert werden. H<sub>2</sub>S reduziert DMSO folglich auch in Abwesenheit von FeS und dies mit einer erstaunlich hohen Ausbeute von 30 - 40% (vgl. Abb. 67). Dabei oxidiert DMSO offensichtlich H<sub>2</sub>S zu elementarem Schwefel (s. reaktion 7).



Die ermittelte DMS-Ausbeute entspricht auch in etwa der erzielten Ausbeute an entstandenem elementarem Schwefel in der Reaktion.

Allerdings wurde auch bei der Untersuchung des schwarzen Reaktionsprodukts der Reaktion von FeS/H<sub>2</sub>S mit DMSO mittels MS elementarer Schwefel anhand des typischen Fragmentierungsmusters identifiziert. Die aufgenommenen Massenspektren zeigen, dass elementarer Schwefel beim Aufheizen nur bei Temperaturen bis 200°C aus dem schwarzen Reaktionsprodukt freigesetzt wird. Hingegen konnte kein DMS bei dieser MS-Untersuchung detektiert werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Reaktion von DMSO mit dem FeS/H<sub>2</sub>S-System zwei konkurrierende Reaktionen ablaufen: die direkte Reduktion durch H<sub>2</sub>S unter Bildung von elementarem Schwefel sowie die konzertierte Reduktion durch FeS/H<sub>2</sub>S unter Bildung von Pyrit FeS<sub>2</sub>. Ein quantitativer Vergleich der Ausbeuten an S<sub>8</sub> und FeS<sub>2</sub> als jeweilige Oxidationsprodukte beider Reaktionswege mittels MS ist nicht möglich. Zudem ist zu berücksichtigen, dass Pyrit beim Erhitzen unter Vakuumbedingungen in FeS und elementarem Schwefel zerfällt [83]. Da in der Literatur Angaben über eine untere Temperaturgrenze des Zerfalls von Pyrit fehlen, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der mittels MS detektierte Schwefel in der Pyritprobe aus eben demselben stammt.

Bei der Reaktion von FeS mit DMSO wird offensichtlich kein Schwefel gebildet, wie MS-Untersuchungen des schwarzen Reaktionsrückstands zeigten. Andererseits konnte bei der MS-Untersuchung die Anwesenheit von DMS eindeutig anhand des Peaks bei  $m/z = 62$  und dem dazugehörigen Fragmentierungsmuster nachgewiesen werden. Dennoch wurde DMS bei der MS-Untersuchung der anderen festen Reaktionsrückstände (FeS<sub>2</sub> bzw. S<sub>8</sub>) nicht detektiert. Da der Reaktionsrückstand der Reaktion von FeS/H<sub>2</sub>S analog aufgearbeitet wurde, deutet dieser Befund darauf hin, dass DMS insbesondere mit der reaktiveren FeS-Oberfläche, nicht jedoch mit einer FeS<sub>2</sub>-Oberfläche, wechselwirkt oder dort sogar adsorbiert wird. Solch ein Adsorptionseffekt wurde zumindest in einem weiteren Vergleichsexperiment, beim Erhitzen von DMS in einer NaCl-Lösung bzw. in einer Suspension aus amorph gefälltem FeS, nachgewiesen. Eine Adsorption von DMS an der Oberfläche des festen Reaktionsproduktes FeS könnte zur Verfälschung beim Ermitteln der DMS-Ausbeute über die Extraktion aus der Reaktionslösung führen.

### 5.5.5 Diskussion und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass sich das FeS/H<sub>2</sub>S-System tatsächlich als Modell für eine primitive DMSO-Reduktase eignet, da es äquimolare Mengen an DMSO mit Ausbeuten von 40 % bis zu 65 % reduzieren kann. Als Konkurrenzreaktion tritt die Reduktion von DMSO durch H<sub>2</sub>S auf, bei der beim Einsatz äquimolarer Mengen der Reaktanden DMS-Ausbeuten von bis zu 40 % detektiert wurden. Allerdings spielt diese Reaktion in Gegenwart von amorphem FeS, d.h. bei Verwendung des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems, wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle, da die Bildung von Pyrit bzw. Markasit als dominierende Spezies im festen Reaktionsprodukt mittels PXRD nachgewiesen werden

konnte. Hingegen gab es nur schwache Anhaltspunkte für die Anwesenheit von elementarem Schwefel S<sub>8</sub>, da diesem im Diffraktogramm nur sehr intensitätsschwache Reflexe zugeordnet werden konnten. Dass S<sub>8</sub> bei der Reaktion von DMSO mit dem FeS/H<sub>2</sub>S-System entsteht, konnte mittels MS belegt werden. H<sub>2</sub>S reagiert also auch in Gegenwart von FeS teilweise direkt mit DMSO.

FeS ohne H<sub>2</sub>S kann DMSO nur in geringem Ausmaß (max. 10 %) reduzieren, ist aber in der Lage, DMS stärker an der Oberfläche zu binden. Da die Bestimmung von DMS aus dem Überstand der Reaktionssuspension erfolgte, könnte adsorbiertes DMS zu einer systematisch zu gering bestimmten DMS-Ausbeute führen. Hier könnte das Auflösen von FeS, z.B. durch KHSO<sub>4</sub>, vor der Probennahme für die DMS-Extraktion Abhilfe schaffen. Die Untersuchungen zur Reduktion von DMSO zeigten ferner, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen von 95°C und pH 7 eine rasche Reaktion erfolgt, da das Oxidationsprodukt (Schwefel bzw. graues Pyrit) des jeweiligen Reduktionssystems schon nach einem Tag beobachtbar sind. Vergleicht man die Ausbeuten der Experimente für das FeS/H<sub>2</sub>S-System nach 7 Tagen und 14 Tagen, so zeigt sich, dass bereits nach einer Woche die DMS-Ausbeute nahezu konstant bleibt.

Eine Erklärung für die unerwartete Reduktion von DMSO durch H<sub>2</sub>S liefert ein Vergleich der Standardpotenziale. So weist das Redoxpaar DMS/DMSO ein Standardpotenzial von  $E^\circ(\text{DMS}/\text{DMSO}) = +160 \text{ mV}$  auf [121], während das Redoxpaar H<sub>2</sub>S/S ein Standardpotenzial von  $E^\circ(\text{H}_2\text{S}/\text{S}) = +142 \text{ mV}$  besitzt. Aufgrund des niedrigeren Standardpotenzials wirkt H<sub>2</sub>S bei der Reaktion mit DMSO als Reduktionsmittel.

Von der Reduktion von DMSO und weiterer einfacher Alkylsulfoxide durch eingebrachtes H<sub>2</sub>S-Gas bei Temperaturen von 20 - 50°C wurde bereits berichtet [125]. Die Untersuchungen fanden indes nicht im wässrigen Milieu sondern im jeweiligen Alkylsulfoxid statt, das somit gleichzeitig als Lösungsmittel und als Reaktand fungierte.

Äußerst interessant in diesem Zusammenhang ist, dass *Kläwi et al.* beobachteten, dass Diphenyl- und Dibenzylsulfoxid (DPSO und DBSO) nicht von H<sub>2</sub>S reduziert werden. Da Alkylsulfoxide wie DMSO hingegen von H<sub>2</sub>S reduziert werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Standardpotenziale von DPSO und DBSO niedriger als das von DMSO und sogar niedriger als das von H<sub>2</sub>S sind, so dass H<sub>2</sub>S nicht mehr oxidiert werden kann. Ein niedrigeres Redoxpotenzial könnte durch die stark elektronenschiebenden, aromatischen Reste in DPSO und DBSO verursacht werden, die die positive Partialladung am Sulfoxid-Schwefelatom stabilisieren und damit dessen Oxidationskraft entscheidend verringern.

Der Vergleich der Reaktion von FeS/H<sub>2</sub>S bzw. von H<sub>2</sub>S mit DMSO zeigt, dass die thermodynamisch mögliche Reduktion von DMSO in beiden Fällen mit DMS-Ausbeuten von über 30 % abläuft. Dabei konnte für das FeS/H<sub>2</sub>S-System eine nur wenig höhere DMS-Ausbeute realisiert werden, obwohl die thermodynamische Triebkraft mit einem Standardpotenzial des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems von  $E^\circ = -620 \text{ mV}$  [45] deutlich größer ist als für H<sub>2</sub>S. Die Frage, in welchem Umfang DMSO bei der Reaktion mit dem FeS/H<sub>2</sub>S-System direkt durch H<sub>2</sub>S reduziert wird, lässt sich aus den Analyseergebnis der PXRD ungefähr abschätzen. FeS<sub>2</sub> ist eindeutig das Hauptprodukt der Reaktion, während S<sub>8</sub> als Produkt der direkten Reaktion von H<sub>2</sub>S mit DMSO nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Aufklärung können zukünftige Untersuchungen der Reaktionskinetik (Aktivierungsenergie und Geschwindigkeitskonstante) zur Abschätzung der Geschwindigkeit der Bildung von S<sub>8</sub> (aus H<sub>2</sub>S) bzw. Pyrit (aus FeS/H<sub>2</sub>S) durch das jeweilige Reduktionsmittel liefern. In diesem Zusammenhang kann zudem geklärt werden, ob die Reduktion von DMSO unter den untersuchten Bedingungen u.U. bereits in weniger als sieben Tagen erfolgt.

## 6 Zusammenfassung

### Eisenhaltige Phospholipid- und Polymervesikel

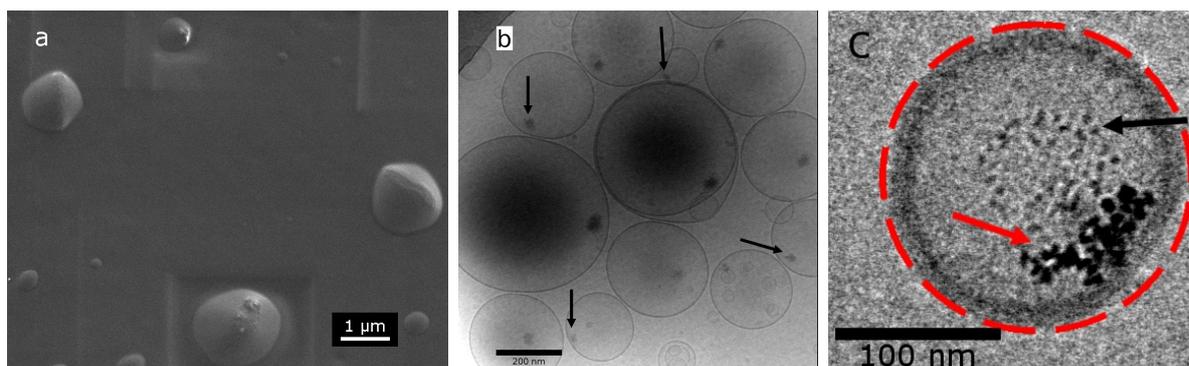
Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten erstmals FeS-haltige Vesikel hergestellt werden. Dieses Ergebnis ist ein bedeutsamer Schritt auf dem Weg zur Kompartimentierung des potenziell energieliefernden FeS/H<sub>2</sub>S-Systems in einer Art Protozelle, was eine wichtige Vorhersage der Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese darstellt.

Der Herstellungsweg FeS-haltiger Vesikel beinhaltete zunächst den Einschluss komplexierter Fe<sup>2+</sup>-Ionen in Vesikeln. Nach der anschließenden Aufreinigung der Vesikeldispersion konnte durch die Inkubation mit H<sub>2</sub>S intravesikulär FeS ausgefällt werden. Dieses konnte über mehrere Kontrollexperimente für die Vesikeldispersion sowie mittels REM-ESMA für diskrete Vesikel (s. Abb. 69a) nachgewiesen werden.

Es wurden vesikuläre Systeme auf Basis von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-phosphatidylcholin (POPC) sowie dem block-Copolymer 1,2-Polybutadien-polyethylenoxid (PB-PEO) auf ihre Eignung hin untersucht. Beide Systeme erwiesen sich tauglich für den Einschluss von komplexierten Fe<sup>2+</sup>-Ionen mittels Filmhydratisierungs-Extrusions-Methode. Die dabei erzielten Einschussraten von Fe<sup>2+</sup>-Ionen konnten anhand einer dafür entwickelten spektrophotometrischen Quantifizierungsmethode bestimmt werden. Bei einer Fe<sup>2+</sup>-Startkonzentration von 60 mM wurde ein mittlerer Eisengehalt von 0,65 mM in einer 10 mM POPC-Liposomendispersion und von 0,30 mM in einer 1,6 mM PB-PEO-Polymersomendispersion ermittelt. Für PB-PEO ergibt sich somit ein Einschluss von  $0,19 \frac{\mu\text{molFe}^{2+}}{\mu\text{molLipid}}$  und für POPC ein Einschluss von  $0,065 \frac{\mu\text{molFe}^{2+}}{\mu\text{molLipid}}$ . Folglich lassen sich Fe<sup>2+</sup>-Ionen effizienter in PB-PEO-Polymersomen als in POPC-Liposomen verkapseln, allerdings nur bei vergleichsweise geringen Lipidkonzentrationen.

Für die intravesikuläre Bildung von FeS wiesen nur Polymervesikel eine hinreichende Stabilität auf. Allerdings konnte eine vorher noch nicht beschriebene Reversibilität der FeS-Fällungsreaktion in Polymersomen beobachtet werden. Anhand von REM-ESMA-Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass dies auf eine abnehmende H<sub>2</sub>S-Konzentration in der Polymersomendispersion während der Lagerung zurückzuführen ist und durch einen Überschuss an H<sub>2</sub>S unterdrückt werden kann.

POPC-Liposomen eignen sich nicht zur intravesikulären Ausfällung von FeS, da sie eine ausgeprägte Instabilität gegenüber FeS aufweisen, wie Membran- und Vesikelstabilitätsuntersuchungen ergaben. Gleichwohl ist es möglich, im Inneren von Fe<sup>2+</sup>-haltigen



**Abb. 69:** (a) REM-Aufnahme von FeS-haltigen Polymersomen, (b) Cryo-TEM-Aufnahme von Liposomen mit Magnetit-Nanopartikeln und (c) Cryo-TEM-Aufnahme eines CdS-haltigen Polymersoms

POPC-Liposomen, die mittels Reverse-Phase-Evaporation-Methode hergestellt wurden, Aggregate von Magnetit-Nanopartikeln (Magnetit-NP) zu generieren (s. Abb. 69b). Dies kann durch das Lagern der Vesikeldispersion an Luftsauerstoff induziert sowie durch Zugabe einer Base beschleunigt werden. Die derart hergestellten Liposomen sind mehrere Wochen stabil und zeigen einen magnetophoretischen Effekt in einem äußeren Magnetfeld, wobei die Mobilität mit der Größe der Liposomen (und damit der Größe interner Magnetit-Niederschläge) korreliert.

Auch im Inneren von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Polymersomen konnten mit derselben Methode intravesikuläre Aggregate von Magnetit-NP erzeugt und mittels Cryo-TEM nachgewiesen werden.

Weiterhin konnten mit Triethylenglykol stabilisierte Magnetit-NP mit Durchmessern von 4 - 8,5 nm hergestellt und optimale Bedingungen zur Generierung einer homogenen und stabilen wässrigen Suspension gefunden werden. Das erhaltene „ferrofluid“ erwies sich als geeignet, um geringe Mengen von Magnetit-NP in die Membran von PB-PEO-Polymersomen einzubetten.

## Weitere Übergangsmetallhaltige Polymersomen

Zum besseren Verständnis der intravesikulären Ausfällung von Metallsulfiden wurden zudem Metallsulfide von Nickel, Cadmium und Kupfer in Polymervesikeln über dasselbe Verfahren wie für FeS hergestellt und charakterisiert. Die in Polymersomen hergestellten, photohalbleitenden CdS-NP stellen ein vielversprechendes System für intravesikuläre,

photokatalytische Reaktionen analog zu [18, 19] dar.

Im Fall von Nickel zeigte sich, dass die erzielten Einschussraten von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen in Polymersomen vergleichbar mit denen von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen sind, was auf die chemische Verwandtschaft der beiden Metalle zurückgeführt werden kann. Anhand von Kontrollexperimenten konnte auch für aufgereinigte  $\text{Ni}^{2+}$ -haltige Polymersomen gezeigt werden, dass bei der Inkubation mit einer  $\text{H}_2\text{S}$ -haltigen Lösung intravesikuläres NiS gebildet wird, welches in Form von diffusen Aggregaten sowie Membranablagerungen in Cryo-TEM-Untersuchungen detektiert werden konnte.

CdS-NP konnten in  $\text{Cd}^{2+}$ -haltigen Polymersomen durch Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  ausgefällt werden. Die UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der Fällungsreaktion ermöglichte die Ermittlung der jeweiligen CdS-Absorptionskante und damit eine Abschätzung der Größe intravesikulär generierter CdS-NP. Dies ist auf Quantisierungseffekte des photohalbleitenden CdS zurückzuführen. Es zeigte sich, dass v.a. der pH-Wert die Größe der entstehenden NP maßgeblich beeinflusst. Mit zunehmendem pH-Wert entstehen dabei kleinere CdS-Partikel.

Cryo-TEM-Untersuchungen von CdS-haltigen Polymersomen bewiesen, dass die beobachteten CdS-Niederschläge intravesikulär vorliegen. Durch die hohe Ordnungszahl und den daraus resultierenden intensiven Kontrast konnten auch CdS-NP mit einem Durchmesser von 1,5 - 3 nm neben größeren NP mit Durchmessern im Bereich von 6 - 9 nm detektiert werden (s. Abb. 69c). Diese wichtige Beobachtung zeigt, dass ein Teil der ausgefallenen Metallsulfid-NP einen Durchmesser  $< 5$  nm aufweist. FeS- und NiS-NP dieser Größe sind höchstwahrscheinlich aufgrund des deutlich geringeren Kontrastes im Vergleich zu CdS-NP nicht mittels Cryo-TEM detektierbar.

Auch  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen konnten mittels Filmhydratisierungs-Methode in Polymersomen eingeschlossen werden. Nach der Aufreinigung wurden diese Polymersomendispersionen zur Ausfällung von CuS mit einer  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung inkubiert. Die Kinetik dieser Metallsulfid-Fällungsreaktion wurde anhand der Veränderung der optischen Dichte für CuS sowie zusätzlich für CdS und NiS verfolgt. Für alle drei untersuchten Systeme zeigte sich, dass eine sehr rasche Umsetzung von ca. 80 % innerhalb der ersten 120 s nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{S}$  stattfindet. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Berichten zur Fällung von CuS und CdS in Phospholipidvesikeln [19].

## Reaktivität des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems

Die Reduktionskraft des potenziell energieliefernden FeS/H<sub>2</sub>S-Systems entsprechend der Eisen-Schwefel-Welt-Hypothese konnte durch Untersuchungen zur Reduktion von DMSO an einem weiteren bedeutsamen Beispiel demonstriert werden. Die Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für die Reaktivität des FeS/H<sub>2</sub>S-Systems im Sinne eines primordialen Enzyms. Die Untersuchungen wurden nicht mit dem kompartimentierten FeS/H<sub>2</sub>S-System, d.h. nicht im Inneren von Liposomen oder Polymersomen durchgeführt, sondern stellen eine notwendige Grundlage für derartige zukünftige Versuche in Vesikeln dar.

Zunächst wurde die Reaktivität des bei den Untersuchungen verwendeten amorphen FeS näher charakterisiert. Dieses kann mit einer spezifischen Oberfläche von ca.  $35 \frac{m^2}{g}$  durch Ausfällung aus einer Fe<sup>2+</sup>-haltigen Lösung hergestellt werden. Es eignet sich zum einen zur selektiven Herstellung von Pyrit (FeS<sub>2</sub>) über die Reaktion mit elementarem Schwefel eignet. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass amorphes FeS mit H<sub>2</sub>S unter Bildung von H<sub>2</sub> und Pyrit reagiert (*Berzelius*-Reaktion). In weiteren Untersuchungen des dabei erhaltenen Pyrits konnte der in der Literatur diskutierte Einschluss von H<sub>2</sub> im Inneren von Pyritpartikeln nicht bestätigt werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob das FeS/H<sub>2</sub>S-System im Sinne einer primitiven DMSO-Reduktase DMSO zu Dimethylsulfid (DMS) reduzieren kann. Dafür wurde erfolgreich eine Methode zur Durchführung der Reaktion unter inerten Bedingungen bei 95°C sowie eine geeignete Analysenmethode zum quantitativen Nachweis von DMS mittels GC entwickelt. Die Reaktion von DMSO mit dem FeS/H<sub>2</sub>S-System lieferte DMS-Ausbeuten im Bereich von 40 - 65 % schon nach einer Reaktionszeit von sieben Tagen. Eine PXRD-Analyse des festen Reaktionsprodukts zeigte, dass dieses vorwiegend aus FeS<sub>2</sub> besteht. Elementarer Schwefel konnte nicht detektiert werden.

H<sub>2</sub>S ist ebenfalls in der Lage, DMSO zu ca. 30 - 40 % zu DMS zu reduzieren. Bei dieser Reaktion wird H<sub>2</sub>S durch DMSO zu elementarem Schwefel oxidiert. Die Reaktion ist thermodynamisch begünstigt, da die Oxidationskraft von DMSO geringfügig höher als die von Schwefel ist.

Die PXRD-Analyse des Produkts der Reaktion von FeS/H<sub>2</sub>S mit DMSO zeigt, dass die potenzielle Konkurrenzreaktion einer unmittelbaren Reduktion von DMSO durch H<sub>2</sub>S in Gegenwart von FeS nicht abläuft, da kein Schwefel gebildet wurde. Die Ergebnisse belegen, dass das FeS/H<sub>2</sub>S-System eine Reaktivität im Sinne einer primitiven DMSO-Reduktase aufweist.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Chemikalien und Methoden

#### Eingesetzte Chemikalien

Das eingesetzte Phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphatidylcholin wurde von der Firma *Genzyme* bezogen. Das block-Copolymer 1,2-PB<sub>33</sub>-PEO<sub>27</sub> wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Förster (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Chemikalien Hydroxylamin Hydrochlorid, Zitronensäure, Pyrazin-2,3-dicarbonsäure, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, CdCl<sub>2</sub>, TiCl<sub>3</sub>-Lösung, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>2</sub>, DMSO, Triethylenglykol, Ethylacetat, Thioacetamid, Natriumsulfid Hydrat (Na<sub>2</sub>S · 9 H<sub>2</sub>O), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Natriumacetat Trihydrat, EDTA, 1,10-Phenanthrolin, Linolsäure, Dimethylsulfid, Dimethylglyoxim und TRITON X 100 wurden von den Firmen *Acros*, *Alfa Aesar*, *Avocado*, *BASF*, *Fluka*, *Merck*, *Roth* und *Sigma Aldrich* bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Nach Literaturvorschrift im Praktikum hergestelltes, kristallines Fe(acac)<sub>3</sub> wurde wie vorgefunden eingesetzt. Für die GC von DMSO wurden spektralreines Hexan und Toluol von der Firma *Merck* eingesetzt. Das verwendete *glove bag* aus Polyethylen wurde von der Firma *Roth* erworben.

#### Entgasung und Trocknung der Lösungsmittel

Deionisiertes Wasser wurde unter Rühren bei 80°C zwei Stunden durch Durchleiten von Argon entgast. In Ethanol, Cyclohexan und Hexan wurde zum Entfernen von Luftsauerstoff maximal zwei Stunden lang unter Rühren Argon eingeleitet. Das Trocknen von Diethylether und Tetrahydrofuran erfolgte mit Natrium nach bekannten Vorschriften [126].

#### UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Messungen wurden mit einem *SPECORD S 600 UV VIS* der Firma *Analytik Jena* unter Verwendung des Programms *WinAspect* durchgeführt.

### Atomabsorptionsspektrometrie

Die zu untersuchenden Proben wurden vor der Messung mit dem doppelten Volumen an konzentrierter  $\text{HNO}_3$  aufgeschlossen, quantitativ in einen Maßkolben überführt und auf ein definiertes Volumen gebracht. Für die Messungen wurde ein Atomabsorptionsspektrometer des Modells *Perkin-Elmer 3110* mit Flammentechnik verwendet. Mit dem eingesetzten Gasgemisch Acetylen-Luft erfolgte mit einer jeweils geeignete Lampe die Bestimmung von Eisen (Messwellenlänge  $\lambda_{\text{Fe}} = 248,3 \text{ nm}$ ), Nickel ( $\lambda_{\text{Ni}} = 231,6 \text{ nm}$ ), Kupfer ( $\lambda_{\text{Cu}} = 324,7 \text{ nm}$ ) und Cadmium ( $\lambda_{\text{Cd}} = 228,8 \text{ nm}$ ).

### PCS

Die PCS-Messungen wurden mit dem Gerät *Zetasizer Nano ZS* der Firma *Malvern* durchgeführt. Der zur Verdünnung der Proben jeweils verwendete Puffer wurde zuvor durch Celluloseacetatfilter der Firma *Millipore* mit einer Porengröße von  $0,22 \mu\text{m}$  filtriert.

### Cryo-TEM

$3 \mu\text{l}$  der Vesikeldispersionen wurden auf ein Kupfer-Grid gegeben, und der Überschuss an Flüssigkeit wurde automatisch für 3 Sekunden mit Hilfe zweier Filterpapiere abgenommen. Anschließend wurden die Proben sehr schnell in flüssiges Ethan (ca.  $-180 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in einer Cryobox der Firma *Zeiss* getaucht. Der Überschuss an Ethan wurde ebenfalls mit einem Filterpapier entfernt. Die Proben wurden in der Cryo-Transfereinheit *Gatan 626-DH* in das mit flüssigem  $\text{N}_2$  gekühlte Transmissionselektronenmikroskop *Philips CM 120* der Firma *Philips* überführt. Die Bilder wurden mit einer 1 K CCD Kamera *FastScan F114* der Firma *TVIPS* aufgenommen.

### Rasterelektronenmikroskopie und ESMA

Für die Elektronenstrahl-Mikroanalyse (ESMA) von diskreten Polymersomen wurden Siliziumwafer der Firma *Plano* verwendet, welche zunächst nacheinander mit Aceton, Isopropanol und  $\text{H}_2\text{O}$  (destilliert und filtriert) behandelt wurden. Anschließend wurden  $10 \mu\text{l}$  der Vesikeldispersion (zuvor gegen  $\text{H}_2\text{O}$  dialysiert) auf den Wafer aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 1 Minute wurde der Überstand abgenommen und der entsprechende Wafer unter Argon-Atmosphäre gelagert.

Für die Aufnahme von Elektronenmikrographen wurde das Rasterelektronenmikroskop

*LEO-1530 Gemini* der Firma *Zeiss* eingesetzt. Mit denselben Proben konnte eine ESMA mit einem *Philips SEM 515* der Firma *Philips* ausgerüstet mit einem *DX-4* Detektor durchgeführt werden. Dabei wurde eine Elektronenenergie von 25 keV zur Anregung des Fe-K<sub>α</sub>-Peaks verwendet.

Zur Untersuchung von fünffach aufkonzentrierten FeS- und CdS-haltigen Polymersomenproben mittels REM-ESMA wurden jeweils dreimal 3 μl der dickflüssigen Vesikeldispersion auf ein Kohlenstoff-beschichtetes Kupfer-Grid gegeben und dort zum Eintrocknen belassen.

### **TEM-Untersuchungen von Magnetit-NP**

10 μl einer wässrigen Suspension von Magnetit-NP wurden auf ein Kupfer-Grid aufgetragen. Nach einer Einwirkungszeit von 60 s wurde das Grid mit Filterpapier abgesaugt und anschließend in das Transmissionselektronenmikroskop *Philips CM 120* der Firma *Philips* eingeschleust. Die Bilder wurden mit einer 1 K CCD Kamera *FastScan F114* der Firma *TVIPS* aufgenommen.

### **Lichtmikroskopie**

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurde das Mikroskop *Leica DM RXP* eingesetzt. Zur Visualisierung von Polymersomen wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung gearbeitet.

### **Oberflächenmessungen**

Die Messungen der Oberfläche und des Porenvolumens wurden an einem automatischen, volumetrischen Sorptionsautomaten des Typs *Autosorb 1* der Firma *Quanta Chrome* durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proben unter Vakuum für mindestens zwei Stunden bei 250°C ausgeheizt. Die Messungen erfolgten im Anschluß daran bei -196°C, der Siedetemperatur von Stickstoff.

### **Differenzthermoanalyse (DTA) und Thermogravimetrie (TG)**

Die kombinierten DTA- und TG-Messungen erfolgten an dem Gerät *STA 429* für simultane Thermoanalyse der Firma *Netzsch Gerätebau Selb*.

### Röntgenpulverdiffraktometrie

Alle Messungen erfolgten mit einer Eisen-Anode der Geräte *ID 3000* und *HZG4* von der Firma *Seifert*.

### Zentrifugation

Eppendorf-Gefäße wurde mit einer *Biofuge 13* der Firma *Heraeus Sepatech* zentrifugiert.

Die Ultrazentrifugation wurde mit einer Ultrazentrifuge des Typs *XL-80* der Firma *Beckman* mit einem *SW Ti 55* Rotor bei 55000 Umdrehungen pro Minute (entspricht ca. 286000 g) durchgeführt. Dabei wurden Polyallomer-Zentrifugengefäße mit einem Volumen von 3,5 ml verwendet.

85 ml Schlenkgefäße wurde mit einer *Cryofuge 6000i* der Firma *Heraeus* bei einer Drehzahl von 700 U/min für 10-40 Minuten zentrifugiert.

### Gaschromatographie (GC), Massenspektrometrie (MS) und GC-MS

Die gaschromatographischen Bestimmungen von Dimethylsulfid (DMS) erfolgten mit dem Gaschromatograph *CP 9000* der Firma *Chrompack* mit einer 25 m Methylsiliconsäule vom Typ *CP SiL 5CB* und Flammen-Ionisations-Detektor (FID). Als Trägergas kam  $H_2$  mit einer Flußrate von  $2 \frac{ml}{min}$  zum Einsatz. Die Injektionstemperatur betrug  $250^\circ C$ . Die Ausgangstemperatur des Säulenofens lag bei  $30^\circ C$ . Nach 2.6 min wurde dann gleichmäßig innerhalb von 9 min auf  $300^\circ C$  aufgeheizt. Vorhandenes DMS wurde nach 2.12 min detektiert.

Die Identifizierung von DMS erfolgte mittels GC-MS unter annähernd denselben Messbedingungen, d.h. gleicher Säulentyp und gleiches Temperaturprogramm, mit einem Gaschromatograph der Firma *Varian* und einem Massenspektrometer des Typs *Finnigan SSQ 710*. Mit demselben Massenspektrometer erfolgten auch die MS-Untersuchungen.

## 7.2 Vorschriften

### Bestimmung der Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplexzusammensetzung mit der Methode der kontinuierlichen Variation

Die Vorbereitung der Lösungen erfolgt unter inerten Bedingungen. In einem 50 ml Maßkolben wird eine 2 mM PDC-Lösung (16,8 mg Pyrazin-2,3-dicarbonsäure versetzt mit 40  $\mu$ l 5 M NaOH, entspricht zwei Äquivalenten Natriumhydroxid) in entgastem TRIS-HCl-Puffer hergestellt. In einem zweiten Maßkolben wird eine 2 mM Fe<sup>2+</sup>-Lösung in entgastem TRIS-HCl-Puffer hergestellt (z.B. mit 39,2 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O). Nun werden mehrere 10 ml Maßkolben mit genau abgemessenen Volumina der 2 mM PDC-Lösung und der 2 mM Fe<sup>2+</sup>-Lösung in unterschiedlichen ganzzahligen Verhältnissen befüllt (immer mit insgesamt genau 10 ml) und homogenisiert. Anschließend erfolgt zeitnah die UV/Vis-spektroskopische Vermessung, wobei zur Auswertung die Absorption am Absorptionsmaximum von  $\lambda_{max} = 475$  nm verwendet wird.

### Bestimmung der Fe<sup>2+</sup>-PDC-Komplexzusammensetzung mit der Methode der molaren Verhältnisse

Unter inerten Bedingungen werden 1000  $\mu$ l einer 50 mM Fe<sup>2+</sup>-Lösung in entgastem 100 mM TRIS-HCl-Puffer mit 19,6 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O hergestellt. Zudem erfolgt die Präparation von 1000  $\mu$ l einer 100 mM PDC-Lösung (16,8 mg PDC versetzt mit 960  $\mu$ l TRIS-HCl-Puffer und 40  $\mu$ l 5 M NaOH). In neun 10 ml Maßkolben werden nun stets 40  $\mu$ l der 50 mM Fe<sup>2+</sup>-Lösung (Endkonzentration 0,2 mM) sowie unterschiedliche Volumina (10  $\mu$ l - 260  $\mu$ l) der 100 mM PDC-Lösung gegeben, mit entgastem TRIS-HCl-Puffer aufgefüllt und homogenisiert. Zeitnah erfolgt dann die UV/Vis-spektroskopische Vermessung, wobei zur Auswertung die Absorption im Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{max} = 475$  nm verwendet wird.

### Eisenhaltige Liposomen mit Filmhydratisierung und Extrusion

In einen 100 ml Rundkolben werden 10  $\mu$ mol POPC in Form einer Stammlösung in CHCl<sub>3</sub> gegeben und mit etwa zwei Milliliter CHCl<sub>3</sub> verdünnt. Die POPC-Lösung wird nun am Rotationsverdampfer bei 38°C schrittweise eingeeengt, bis praktisch alles CHCl<sub>3</sub> abdestilliert ist. Der erhaltene Film wird nun noch 30 Minuten an einer Hochvakuum-pumpe getrocknet. Nach dem Spülen des Kolbens mit Argon werden 1000  $\mu$ l einer zuvor

im glove bag hergestellten, sauerstofffreien  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung auf den Film gegeben und unter kräftigem Vortexen (und ggf. Ultraschall) der Film hydratisiert. Die erhaltenen Liposomen können nun ggf. extrudiert bzw. direkt mittels Dialyse oder Gelpermeationschromatographie aufgereinigt werden.

### **Eisenhaltige Liposomen mit Reverse-Evaporation-Methode**

In einem sekurierten Reagenzglas-Schlenkgefäß werden 5 ml ketylierter Diethylether sowie 5 ml Dichlormethan gemischt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10  $\mu\text{mol}$  POPC in Form einer Stammlösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zu dem organischen Lösungsmittelgemisch. Nach dem Vortexen der Lösung werden nun 1000  $\mu\text{l}$  einer zuvor im glove bag hergestellten, sauerstofffreien  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung mit einer Spritze in die POPC-Lösung rasch injiziert, anschließend das Gemisch eine Minute intensiv gevortext und dann drei Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die dabei entstandene homogene Emulsion wird nun am sekurierten Rotationsverdampfer bei  $38^\circ\text{C}$  mittels Wasserstrahlpumpe schrittweise eingeengt, bis ein festes Gel entsteht. Das erhaltene Gel wird nun durch intensives Vortexen gebrochen, wobei eine Liposomendispersion entsteht. Abschließend werden noch letzte Reste des organischen Lösungsmittels bei ca. 50 mbar entfernt. Die erhaltene Dispersion kann nun mittels Dialyse oder Gelpermeationschromatographie aufgereinigt werden.

### **Eisenhaltige Polymersomen mit Filmhydratisierungsmethode**

In einen 100 ml Einhalskolben wird die gewünschte Menge Polymer (hier 4.9 mg) eingewogen bzw. eine definierte Menge einer PBPEO-Stammlösung in  $\text{CHCl}_3$  zugegeben. Nach dem Lösen in ca. 2 ml Chloroform wird das Lösungsmittel bei  $38^\circ\text{C}$  schrittweise am Rotationsverdampfer abdestilliert. Anschließend wird der Kolben nach einer schnellen Überführung noch eine Stunde mit einer Hochvakuumpumpe getrocknet. Unter Argonatmosphäre werden nun 1000  $\mu\text{l}$  einer frisch hergestellten, entgasten  $\text{Fe}^{2+}$ -haltigen Lösung in den Filmkolben gegeben und dieser nach dem Verschließen zum Hydratisieren mindestens 15 Stunden lang mit einer Rüttelmaschine *IKA-VIBRAX-VXR* der Firma *IKA* (Regler: 1000) geschüttelt. Die erhaltene Dispersion kann nun extrudiert bzw. mittels Dialyse oder Gelpermeationschromatographie aufgereinigt werden.

### Extrusion von Vesikeldispersionen

Zur Herstellung von kleinen, unilamellaren Vesikeln werden die jeweiligen Vesikeldispersionen mittels Porenfiltermembran-Extrusion auf eine Größe von 200 nm bzw. 100 nm mechanisch eingestellt. Dafür wird der Extrusionsprozess sukzessive 21mal durch eine 200 nm und dann eine 100 nm Polycarbonatmembran unter Verwendung eines *LiposoFast-Basic* Extruders der Firma *Avestin* (Ottawa, Canada) wiederholt.

### Dialyse von Liposomen- bzw. Polymersomendispersionen

Die erhaltenen, bei Einschluss des  $\text{Fe}^{2+}$ -PDC-Komplexes tiefroten Vesikeldispersionen werden im glove bag der Firma *Roth* dialysiert. Dazu wird eine Dialysezelle des Typs *Mini Lipoprep Dialyser* mit einer zuvor in der Pufferlösung eingeweichten Cellulose-Membran (cut-off 10000 Da) bespannt und zunächst in der Pufferlösung belassen. Nach der Überführung dieser Zelle in das glove bag wird dieses sekuriert und dann die hydrierte Vesikeldispersion (ca. 900  $\mu\text{l}$ ) in die Dialysezelle eingefüllt. Es wird in zwei bzw. drei Schritten je nach Eisen-Startkonzentration mit einem Puffervolumen von mindestens 200 ml dialysiert. Dabei kommt ein 100 mM TRIS-HCl-Puffer zum Einsatz, der 2 h unter Rühren entgast wurde. Zur effektiven Abtrennung der Metallionen wird im ersten Dialyseschritt EDTA mit einer Konzentration von 6 mM und im zweiten Dialyseschritt 1 mM EDTA zugesetzt. Bei der Dialyse von Liposomendispersionen muss aufgrund des notwendigen osmotischen Ausgleichs eine isosmotische Menge an  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  im Dialysepuffer vorhanden sein. Nach dem Ende der Dialyse wird die erhaltene Vesikeldispersion aus der Dialysezelle entnommen und inert gelagert.

### Gelpermeationschromatographie von Liposomen- bzw. Polymersomendispersionen

Zum Abtrennen von externem Eisen können Vesikeldispersionen über eine *Sephadex PD10 G 25 M*-Säule aufgereinigt werden. Dazu wird eine solche Säule zunächst mit dem fünfachen Volumen des verwendeten Puffers gespült. Anschließend wird ein der Trennleistung der Säule angemessenes Volumen der Vesikeldispersion (je nach Lipidkonzentration 50-200  $\mu\text{l}$ ) aufgetragen und mit genügend Puffer vollständig eluiert. Die gesammelten Fraktionen können nun mittels PCS bzw. UV/Vis-Spektroskopie auf das Vorhandensein von Vesikeln überprüft werden.

### Bestimmung von intravesikulärem Eisen mittels 1,10-Phenanthrolin (phen)

Die Bestimmung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen erfolgt aufgrund der störenden Matrix (amphiphile Substanzen) jeweils mit der Standard-Additions-Methode. Der intensiv rot gefärbte Komplex  $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$  dient dabei zur spektrophotometrischen Quantifizierung von Eisen.

Zunächst wird unter inerten Bedingungen eine  $125 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$   $\text{Fe}^{2+}$ -Standardlösung frisch hergestellt. Dann werden für die Bestimmung von Eisen in dialysierten

- A)** Liposomen 4 Aliquote (80-150  $\mu\text{l}$ ) der Liposomendispersion mit dem doppelten Volumen einer 10%-igen Triton X 100-Lösung zur Zerstörung der Liposomen versetzt. Nach dem Homogenisieren werden die erhaltenen Lösungen jeweils quantitativ in einen 25 ml Maßkolben überführt.
- B)** Polymersomen 4 Aliquote (mindestens 80  $\mu\text{l}$ ) der Polymersomendispersion mit jeweils 150  $\mu\text{l}$  THF versetzt und so lange geschüttelt, bis die Probe homogen und klar ist. Anschließend werden die Lösungen jeweils quantitativ in einen 25 ml Maßkolben überführt.

Nun wird in allen Fällen eine zusätzliche Blindprobe in einem weiteren 25 ml Maßkolben mit demselben Volumen des jeweiligen Reagenzes zum Auflösen der Vesikel präpariert (**A**: 10%-iges TRITON X 100 bzw. **B**: THF). Anschließend werden 3 der 4 Aliquoten-Lösungen in den Maßkolben mit der erforderlichen Menge (20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$  sowie 100  $\mu\text{l}$ ) der  $125 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$   $\text{Fe}^{2+}$ -Standardlösung versetzt. Nun werden in alle Maßkolben nacheinander jeweils 500  $\mu\text{l}$  einer wässrigen Lösung von  $80 \frac{\text{g}}{\text{L}}$   $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , dann 5 ml einer wässrigen Lösung von  $1 \frac{\text{g}}{\text{L}}$  1,10-Phenanthrolin sowie schließlich 6 ml einer 1,2 M wässrigen Natriumacetat-Lösung gegeben. Abschließend werden alle Maßkolben bis zum Eichstrich aufgefüllt und homogenisiert. Nach weiteren 10 Minuten werden die Lösungen nochmals durch Schütteln homogenisiert und dann mit einem UV/Vis-Spektrometer vermessen, wobei zur Auswertung die Absorbanz bei  $\lambda = 508 \text{ nm}$  herangezogen wird.

### Bestimmung von in Polymersomen eingeschlossenem Nickel

Die Bestimmung von Nickel erfolgt analog der Eisenbestimmung aufgrund der störenden Matrix jeweils mit der Standard-Additions-Methode. Als spektrophotometrisches Reagenz kommt Dimethylglyoxim (dimegly) zum Einsatz, das mit  $\text{Ni}^{2+}$  einen intensiv rosa gefärbten, mäßig löslichen Komplex  $[\text{Ni}^{2+}(\text{dimegly})_2]$  bildet.

Zunächst werden fünf 80  $\mu\text{l}$  Aliquote der Vesikeldispersion mit der doppelten Menge an THF versetzt und in je einen 25 ml Maßkolben mit 10 ml 0,5 M HCl überführt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 25, 50, 125 und 250  $\mu\text{l}$  einer 100  $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$   $\text{Ni}^{2+}$ -Standardlösung zu vier der Lösungen. Nun werden mehrere (mindestens 4) Tropfen Bromwasser zugegeben, so dass sich die Lösung deutlich gelb färbt. Es wird etwa 30 Sekunden gewartet und danach 0,6 ml 25%-iger  $\text{NH}_3$  zugegeben. Beim Homogenisieren entfärbt sich die Lösung und es bilden sich Rauchschwaden. Nun wird nochmals 1 ml 25%-iger  $\text{NH}_3$  sowie 1 ml einer 1%-igen Dimethylglyoxim-Lösung zugesetzt, wobei sich die Lösung orange färbt. Abschließend wird mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt und nach 5 Minuten die Lösung in einer 5 cm Küvette UV/Vis-spektroskopisch vermessen. Zusätzlich wird der Blindwert einer Lösung bestimmt, die nur 150  $\mu\text{l}$  THF enthält und genauso wie die Vesikelproben präpariert wird.

### **Inkubation von Vesikeldispersionen mit gasförmigem $\text{H}_2\text{S}$**

In einem 100 ml Dreihalskolben mit zwei Hahnschliffen werden 4,8 g  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  (20 mmol) eingewogen und anschließend sekuriert. Danach erfolgt zum Auflösen des  $\text{Na}_2\text{S}$  die Zugabe von 15 ml entgastem  $\text{H}_2\text{O}$  über ein Septum. Nun wird unter Rühren und Kühlung tropfenweise halbkonzentrierte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf die  $\text{Na}_2\text{S}$ -Lösung gegeben und das generierte  $\text{H}_2\text{S}$  mit einem schwachem Argonstrom durch einen Schlauch mit Pasteurpipette direkt in die zu inkubierende Dispersion geleitet. Zur Gewährleistung inerte Bedingungen erfolgt die Inkubation in einem kontinuierlich mit Argon gespülten Eimer.

### **Polymersomen mit Magnetit-Nanopartikeln**

196  $\mu\text{l}$  einer 25,5  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  PB-PEO-Stammlösung in  $\text{CHCl}_3$  werden mit 3 ml  $\text{CHCl}_3$  in einem 100 ml Einhalskolben gemischt. Anschließend wird am Rotationsverdampfer bei 38°C das  $\text{CHCl}_3$  unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Anschließend erfolgt das Trocknen des erhaltenen Polymerfilms für 4 h an einer Hochvakuumpumpe. Die Magnetit-NP werden mit einer Konzentration von 0,1  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  mittels Ultraschallbad in Wasser suspendiert, das zuvor mit 0,5 M HCl auf pH 3 eingestellt wurde. 1000  $\mu\text{l}$  dieser Suspension werden nun auf den Polymerfilm gegeben und der Kolben über Nacht an einer Rüttelmaschine *IKA-VIBRAX-VXR* (Regler: 1000) zum Hydratisieren des Films geschüttelt. Die erhaltene, hellbraune Dispersion kann nun noch mittels Gelpermeationschromatographie (s. S. 161) aufgereinigt werden. Dabei bleiben die Magnetit-NP auf

der Säule liegen und können somit von den Polymersomen abgetrennt werden.

### Ausfällung und Aufreinigung von amorphem FeS

636 mg (1,62 mmol)  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  werden in einem Schlenkcolben eingewogen, anschließend sekuriert und dann 15 ml entgastes  $\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt. Nun werden unter kräftigem Rühren mit einer Eppendorfpipette langsam 3,24 ml (1,62 mmol) einer entgasten 0,5 M  $\text{Na}_2\text{S}$ -Lösung zugetropft, wobei schwarzes FeS ausfällt. Nach 30 Minuten Rühren wird zentrifugiert und der erhaltene Feststoff zweimal, zuerst mit 15 ml und dann mit 6 ml entgastem  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Anschließend wird der schwarze Feststoff in 6 ml  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert und unter inerten Bedingungen über Nacht lyophilisiert. Es wird ein schwarzes Pulver erhalten.

### Pyrit $\text{FeS}_2$ aus amorphem FeS und Schwefel

588 mg (1,5 mmol)  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  werden in ein 40 ml Zentrifugen-Schlenkgefäß eingewogen. Nach dem Sekurieren wird das Salz in 17 ml entgastem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Anschließend werden unter kräftigem Rühren 3 ml (1,5 mmol) einer sauerstofffreien 0,5 M  $\text{Na}_2\text{S}$ -Lösung mit einer Eppendorf-Pipette zur Fällung des FeS zugetropft und noch zehn Minuten gerührt. Die Suspension weist nun  $\text{pH} = 6$  auf. Nun werden 75 mg elementaren Schwefels (2,3 mmol) zu der Suspension gegeben und noch zehn Minuten gerührt. Schließlich wird das Schlenkgefäß mit der Reaktionssuspension für fünf Tage bei  $65^\circ\text{C}$  in einem Trockenschrank gelagert.

Zur Aufarbeitung werden an der Oberfläche der Reaktionslösung schwebende Schwefelpartikel entfernt und die überstehende Lösung abgenommen. Zum Auflösen von nicht reagiertem FeS werden nun 5 ml einer entgasten 5 M HCl auf den Feststoff gegeben und unter Rühren und Durchleiten von Argon entstehendes  $\text{H}_2\text{S}$  ausgetrieben. Nach Beendigung der  $\text{H}_2\text{S}$ -Entwicklung wird zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der erhaltene Feststoff wird zweimal mit insgesamt 10 ml Wasser, zweimal mit je 5 ml entgastem Ethanol und zur Entfernung von verbliebendem Schwefel noch zweimal mit je 5 ml entgastem Cyclohexan gewaschen. Abschließend wird *in vacuo* getrocknet, wobei ein grau-schwarzer Feststoff erhalten wird.

### Reaktion von FeS und H<sub>2</sub>S

Zum Abdichten des Reaktions-Schlenkgefäßes wird KWS-Fett verwendet, das erst bei 120°C flüssig wird. In einem sekurierten Schlenkgefäß mit einem Volumen von ca. 50 ml werden ca. 40 mg lyophilisiertes FeS unter inerten Bedingungen gegeben und anschließend in 5 ml entgastem Citratpuffer (200 mM, pH 6) suspendiert. Anschließend werden 0,5 ml einer entgasten TiCl<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, die zuvor aus einer mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> neutralisierten Mischung von 10 ml entgastem Citratpuffer (200 mM, pH 6) und 1 ml einer 15 %-igen, HCl-sauren TiCl<sub>3</sub>-Lösung hergestellt wurde. Nun wird der Druck im Gasraum des Schlenkgefäßes vermindert und dann der Gasraum über ein Septum mit H<sub>2</sub>S gefüllt. Das Schlenkgefäß wird nun für mindestens fünf Tage bei 90°C in einem Trockenschrank gelagert. Zur Analyse des Gasraums auf H<sub>2</sub> erfolgte eine GC-Untersuchung. Dazu werden mit einer gasdichten Hamilton-Spritze 100 µl direkt aus dem Gasraum des Reaktionsgefäßes entnommen und ins GC eingespritzt. Der erhaltene Feststoff wird abzentrifugiert und *in vacuo* getrocknet.

### Reaktion von FeS und H<sub>2</sub>S mit DMSO

In einem 85 ml Schlenkkolben werden 398 mg FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (2 mmol) eingewogen. Nach dem Sekurieren wird die Substanz in 20 ml entgastem H<sub>2</sub>O gelöst und dann unter kräftigem Rühren langsam 4,2 ml einer 0,5 M entgasten Na<sub>2</sub>S-Lösung (2,1 mmol) zur vollständigen Fällung von FeS zugetropft. Anschließend werden 142 µl (2 mmol) entgastes DMSO zugegeben. Nach zehn Minuten Rühren wird der Druck im Schlenkkolben reduziert und 45 ml gasförmiges H<sub>2</sub>S, das zuvor aus einer H<sub>2</sub>S-Gasflasche entnommen wurde, mit Spritzen über ein Septum zugegeben. Abschließend wird noch ein leichter Argon-Überdruck im Schlenkkolben angelegt, der Schlenkkolben dann verschlossen und im Ölbad unter Rühren für mehrere Tage auf 95°C (Ölbadtemperatur) erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionsmischung auf 0°C gekühlt, dann mit einer 5 ml Einwegspritze 3,6 ml der Reaktionslösung abgenommen und in ein gekühltes GC-vial mit 500 µl Toluol (mit 15  $\frac{mg}{ml}$  Hexan als internem Standard) gegeben. Nach 20 Minuten intensivem Mischen werden aus der Toluolphase ca. 2,5 µl mit einer Hamilton-Spritze entnommen und damit der Gehalt an Dimethylsulfid mittels GC-FID bestimmt.

### Kalibration zur Bestimmung des Gehalts an DMS in der Reaktionslösung

Zur Bestimmung des DMS-Gehalts in der Reaktionslösung wird eine Kalibration unter möglichst vergleichbaren Bedingungen wie bei der Analyse der Reaktionslösungen durchgeführt. Dazu werden die bei den Experimenten verwendeten Schlenkgefäße mit demselben Volumen einer NaCl-Lösung (4 mmol NaCl auf 25 ml H<sub>2</sub>O wie auch bei der Reaktion) gefüllt und anschließend definierte Mengen an DMS in den Schlenkgefäßen eingewogen. Bei 0°C erfolgt die Homogenisierung durch mehrmaliges Vortexen im Verlauf von 30 Minuten. Anschließend werden jeweils 3,6 ml aus den Schlenkgefäßen entnommen und in ein GC-vial mit 500  $\mu$ l Toluol (mit 15  $\frac{mg}{ml}$  Hexan als internem Standard) bei 0°C gegeben. Nach 20 Minuten mit mehrmaligem intensiven Vortexen bei 0°C werden 2,5  $\mu$ l aus der organischen Phase mit einer Hamiltonspritze entnommen und ins GC zur Vermessung eingespritzt.

### Metallsulfid-Nanopartikel in Mikroemulsionen

54 mg (1,35 mmol) Natriumhydroxid werden in einem 85 ml Zentrifugen-Schlenkgefäß eingewogen und dieses sekuriert. Im Argon-Gegenstrom werden nun (in dieser Reihenfolge) 2,7 ml entgastes H<sub>2</sub>O, 4,1 ml entgastes Ethanol, 1 ml entgaste Linolsäure und 540  $\mu$ l entgastes n-Hexan zugegeben. Unter kräftigem Rühren wird dann das in <1000  $\mu$ l entgastem H<sub>2</sub>O gelöste Metallsalz (0,135 mmol), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O zur Herstellung von FeS bzw. NiSO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O zur Herstellung von NiS, zugegeben. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe von 270  $\mu$ l 0,5 M entgaster Natriumsulfidlösung (0,135 mmol). Nach einer Stunde unter Rühren werden 4 ml entgastes n-Hexan zugegeben, um eine Phasentrennung zu bewirken. Anschließend wird zentrifugiert und die überstehende Lösung im Argongegenstrom abgenommen. Der erhaltene Rückstand wird mit zweimal 10 ml Ethanol und einmal 10 ml Hexan gewaschen und abschließend zwei Stunden *in vacuo* getrocknet.

### Herstellung von Magnetit-Nanopartikeln

In einem 250 ml Einhalskolben (mit einem 15 cm langen Hals) werden 706 mg Eisen(III)-acetylacetonat Fe(acac)<sub>3</sub> (2 mmol) eingewogen und in 25 ml Triethylenglykol (TREG) gelöst. Mittels eines T-Stücks wird nun die Apparatur 20 Minuten mit Argon gespült und anschließend unter Rühren für eine Stunde auf 120-130°C erhitzt und danach 2 h unter Rückfluss (ca. 280°C) gekocht. Dabei verfärbt sich die Lösung von rot nach schwarz.

Nach dem Beenden der Reaktion lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und lagert die Suspension über Nacht im Kühlschrank. Zur Aufarbeitung werden 5 ml der schwarzen Suspension entnommen und mit 5 ml einer Waschlösung aus Ethanol und Ethylacetat im Verhältnis 1:2 versetzt. Die erhaltene Suspension wird nun in zwei 3,5 ml Polyallomer-Zentrifugationsgefäße der Ultrazentrifuge gegeben und anschließend 3 h bei 55000 U/min zentrifugiert. Dabei setzt sich der schwarze Feststoff vollständig ab und der leicht bräunliche Überstand kann abgenommen werden. Der erhaltene Feststoff wird noch zweimal mit je 3 ml der Waschlösung gewaschen. Hierbei kann die Abtrennung des Feststoffs mittels einer *Biofuge* bei 13000 U/min erfolgen. Es wird ein schwarzer, magnetisierbarer Feststoff erhalten.

## Literatur

- [1] Stano, P.; Luisi, P. L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3639–3653.
- [2] Luisi, P.; Ferri, F.; Stano, P. *Naturwissenschaften* **2006**, *93*, 1–13.
- [3] Gibson, D. G.; et al. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2010**, *329*, 52–56.
- [4] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/342910/92244/> ; 23.07.2010.
- [5] Lo Presti, C.; Lomas, H.; Massignani, M.; Smart, T.; Battaglia, G. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3576–3590.
- [6] Antonietti, M.; Förster, S. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1323–1333.
- [7] Tanford, C. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1978**, *200*, 1012–1018.
- [8] New, R. C. C. *Liposomes : a practical approach / edited by R.R.C. New*; Oxford; New York : IRL Press, 1990.
- [9] Grit, M.; Underberg, W. J. M.; Crommelin, D. J. A. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 362–366.
- [10] Israelachvili, J. N.; Marcelja, S.; Horn, R. G. *Quart. Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 121–200.
- [11] Lasic, D. D. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 307–321.
- [12] Taupitz, M.; Schmitz, S.; Hamm, B. *Fortschr. Röntgenstr.* **2003**, *175*, 752–765.
- [13] Park, J.; Joo, J.; Kwon, S.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4714–4745.
- [14] Brusentsov, N. A.; Baiburtskii, F. S.; Tarasov, V. V.; Komissarova, L. K.; Filippov, V. I. *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*, 197–205.
- [15] Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, *9*, 467–508.
- [16] Zhang, L.; Eisenberg, A. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1995**, *268*, 1728–1731.
- [17] Noireaux, V.; Libchaber, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17669–17674.

- [18] Vassiltsova, O.; Chuvilin, A.; Parmon, V. *J. Photochem. Photobiol. A* **1999**, *125*, 127–134.
- [19] Igumenova, T.; Vasil'tsova, O.; Parmon, V. *J. Photochem. Photobiol. A* **1996**, *94*, 205–213.
- [20] Khramov, M. I.; Parmon, V. N. *J. Photochem. Photobiol. A* **1993**, *71*, 279–284.
- [21] Kennedy, M. T.; Korgel, B. A.; Monbouquette, H. G.; Zasadzinski, J. A. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2116–2119.
- [22] Korgel, B. A.; Monbouquette, H. G. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 346–351.
- [23] Bóta, A.; Varga, Z.; Goerigk, G. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1911–1915.
- [24] Summers, D.; Noveron, J.; Basa, R. *Orig. Life. Evol. Biosph.* **2009**, *39*, 127–140.
- [25] Rauchfuß, H. *Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens*; Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [26] Alpermann, T.; Weigand, W. *Encyclopedia of Time*; Birx, H. J., Ed.; Sage, Thousand Oaks, California, USA, 2008; Chapter Evolution, Chemical, 455–464.
- [27] Tian, F.; Toon, O. B.; Pavlov, A. A.; De Sterck, H. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2005**, *308*, 1014–1017.
- [28] Ball, P. *Nature* **2006**, *442*, 500–502.
- [29] Miller, S. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1953**, *117*, 528–529.
- [30] Shapiro, R. *Origins*; Penguin Books, London, 1988.
- [31] Joyce, G. F. *Nature* **2002**, *418*, 214–221.
- [32] Pascal, R.; Boiteau, L.; Forterre, P.; Gargaud, M.; Lazcano, A.; Lopez-Garcia, P.; Maurel, M.-C.; Moreira, D.; Pereto, J.; Prieur, D.; Reisse, J. *Earth Moon Planets* **2006**, *98*, 153–203.
- [33] Monnard, P.-A.; Apel, C. L.; Kanavarioti, A.; Deamer, D. W. *Astrobiology* **2002**, *2*, 139–152.
- [34] Monnard, P.-A.; Szostak, J. W. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1104–1111.

- [35] Cairns-Smith, A. G.; Hall, A. J.; Russell, M. J. *Orig. Life. Evol. Biosph.* **1992**, *22*, 161–80.
- [36] Hazen, R. *Elements* **2005**, *1*, 135–137.
- [37] Hanczyc, M.; Mansy, S.; Szostak, J. *Orig. Life. Evol. Biosph.* **2007**, *37*, 67–82.
- [38] Rees, D. C.; Howard, J. B. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2003**, *300*, 929–931.
- [39] Russell, M.; Daniel, R.; Hall, A.; Sherringham, J. *J. Mol. Evol.* **1994**, *39*, 231–243.
- [40] Martin, W.; Russell, M. J. *Philos. Trans. R. Soc. London B* **2007**, *362*, 1887–1926.
- [41] Kelley, D. S.; Karson, J. A.; Blackman, D. K.; Früh-Green, G. L.; Butterfield, D. A.; Lilley, M. D.; Olson, E. J.; Schrenk, M. O.; Roe, K. K.; Lebon, G. T.; Rivizzigno, P. *Nature* **2001**, *412*, 145–149.
- [42] Russell, M.; Hall, A. *J. Geol. Soc. London* **1997**, *154*, 377–402.
- [43] Wächtershäuser, G. *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 452–484.
- [44] Wächtershäuser, G. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 584–602.
- [45] Wächtershäuser, G. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *58*, 85–201.
- [46] Huber, C.; Wächtershäuser, G. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2006**, *314*, 630–632.
- [47] Heinen, W.; Lauwers, A. M. *Orig. Life. Evol. Biosph.* **1996**, *26*, 131–150.
- [48] Huber, C.; Wächtershäuser, G. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1997**, *276*, 245–247.
- [49] Dörr, M.; Käßbohrer, J.; Gronert, R.; Kreisel, G.; Brand, W.; Werner, R.; Geilmann, H.; Apfel, C.; Robl, C.; Weigand, W. *Angew. Chem. Int. Ed* **2003**, *42*, 1540–1543.
- [50] Drobner, E.; Huber, H.; Wächtershäuser, G.; Rose, D.; Stetter, K. O. *Nature (London)* **1990**, *346*, 742–744.
- [51] Bloechl, E.; Keller, M.; Wächtershäuser, G.; Stetter, K. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 8117–8120.

- [52] Cody, G. D.; Boctor, N. Z.; Filley, T. R.; Hazen, R. M.; Scott, J. H.; Sharma, A.; Yoder, J., Hatten S. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2000**, *289*, 1337–1340.
- [53] Alpermann, T.; Rüdell, K.; Rüger, R.; Steiniger, F.; Nietzsche, S.; Förster, S.; Fahr, A.; Weigand, W. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2010**; DOI: 10.1007/s11084-010-9223-0.
- [54] Bigg, G. R. *Chemistry in the Marine Environment - Issues in Environmental Science and Technology No. 13*; Hester, R. E.; Harrison, R. M., Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2000; Chapter The Oceans and Climate, 13–32.
- [55] Mann, S.; Hannington, J. P.; Williams, R. J. P. *Nature* **1986**, *324*, 565–567.
- [56] Nawroth, T.; Rusp, M.; May, R. P. *Physica B (Amsterdam)* **2004**, *350*, E635–E638.
- [57] Ismailova, G.; Efremenko, V.; Kuregyan, A. *Pharm. Chem. J.* **2005**, *39*, 385–387.
- [58] Li, S.-Y.; Guo, Y.; Aslam, M.; Fu, L.; Dravid, V. *Microsc. Microanal.* **2003**, *9*, 206–207.
- [59] Mann, S.; Hannington, J. P. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *122*, 326–335.
- [60] Sangregorio, C.; Wiemann, J. K.; O'Connor, C. J.; Rosenzweig, Z. *J. Appl. Phys.* **1999**, *85*, 5699–5701.
- [61] Mann, S. *Inorganic Materials*; Bruce, D. W.; O'Hare, D., Eds.; John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1996; Chapter Biogenic Inorganic Materials, 255–311.
- [62] Dörr, M.; Alpermann, T.; Weigand, W. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2007**, *37*, 329–333.
- [63] Jander, G.; Blasius, E. *Lehrbuch der analytischen und präparativen Chemie*, 14th ed.; Strähle, J.; Schweda, E., Eds.; S. Hirzel, 1995.
- [64] Suwalsky, M.; Martínez, F.; Cárdenas, H.; Grzyb, J.; Strzalka, K. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *134*, 69–77.
- [65] Xia, S.; Xu, S. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 289–296.
- [66] Kosaraju, S. L.; Tran, C.; Lawrence, A. *J. Liposome Res.* **2006**, *16*, 347–358.
- [67] Ley, H.; Schwarte, C.; Münnich, O. *Ber. dt. chem. Ges.* **1924**, *57*, 349–356.
- [68] Sanyal, G. S.; Mookherjea, S. *Z. Anal. Chem.* **1975**, *276*, 71.

- [69] Chapman, R. L.; Stephens, F. S.; Vagg, R. S. *Inorg. Chim. Acta* **1977**, *26*, 241–250.
- [70] Gao, S.; Ma, B.-Q.; Yi, T.; Wang, Z.-M.; Liao, C.-S.; Yan, C.-H.; Xu, G.-X. *Chem. Lett.* **1999**, *28*, 773–774.
- [71] Garribba, E.; Micera, G.; Lodyga-Chruscinska, E.; Sanna, D. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 2690–2700.
- [72] Jäger, E.-G.; Schöne, K.; Werner, G. *Lehrwerk Chemie - Arbeitsbuch 5 - Elektrolytgleichgewichte und Elektrochemie*; VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1982.
- [73] Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 4194–4198.
- [74] Schubert, R.; Wolburg, H.; Schmidt, K.-H.; Roth, H. J. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *58*, 121–129.
- [75] Roseman, M. A.; Lentz, B. R.; Sears, B.; Gibbes, D.; Thompson, T. E. *Chemistry and Physics of Lipids* **1978**, *21*, 205–222.
- [76] Torchilin, V. P.; Weissig, V. *Liposomes: A Practical Approach*; Oxford University Press, 2003.
- [77] Mathai, J. C.; Missner, A.; Kügler, P.; Saporov, S. M.; Zeidel, M. L.; Lee, J. K.; Pohl, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 16633–16638.
- [78] Schullery, S.; Garzaniti, J. *Chem. Phys. Lipids* **1974**, *12*, 75–95.
- [79] Cuyper, M.; Joniau, M. *Eur. Biophys. J.* **1988**, *15*, 311–319.
- [80] Sabaté, R.; Barnadas-Rodríguez, R.; Callejas-Fernández, J.; Hidalgo-Álvarez, R.; Estelrich, J. *Int. J. Pharm.* **2008**, *347*, 156–162.
- [81] Faure, C.; Meyre, M.-E.; Trepout, S.; Lambert, O.; Lebraud, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8552–8559.
- [82] Krack, M.; Hohenberg, H.; Kornowski, A.; Lindner, P.; Weller, H.; Förster, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7315–7320.

- [83] Holleman, A. F.; Wiberg, E.; N., W. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 101st ed.; de Gruyter: Berlin, 1995.
- [84] Rickard, D.; Luther, G. W. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 514–562.
- [85] Li, Y.; van Santen, R.; Weber, T. *J. Solid State Chem.* **2008**, *181*, 3151–3162.
- [86] Goldstein, J. I. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*, 3rd ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2003.
- [87] Huber, C.; Eisenreich, W.; Hecht, S.; Waechtershaeuser, G. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2003**, *301*, 938–940.
- [88] Dai, Z.; Liu, S.; Bao, J.; Ju, H. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 4321–4326.
- [89] Baird, T.; Campbell, K. C.; Holliman, P. J.; Hoyle, R.; Stirling, D.; Williams, B. P. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, *92*, 445–450.
- [90] Li, L.; Moore, P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 84–90.
- [91] Butler, E. A.; Peters, D. G.; Swift, E. H. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1379–1383.
- [92] Rosário, F. D.; Louvise, A. M. T.; Saraiva, S. M.; González, G.; Oliveira, J. F. D. *J. Coll. Interf. Sci.* **1996**, *181*, 1–10.
- [93] Li, Y.; Huang, F.; Li, Z.; Zhang, Q.; Gu, Z. *J. Mater. Sci. Lett.* **1999**, *18*, 1821–1823.
- [94] Binder, W. H.; Sachsenhofer, R.; Farnik, D.; Blaas, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 6435–6441.
- [95] Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Chécot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Perzynski, R. *J. Magn. Magn. Mater.* **2006**, *300*, 71–74.
- [96] Lecommandoux, S.; Sandre, O.; Chécot, F.; Rodriguez-Hernandez, J.; Perzynski, R. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 712–718.
- [97] Berger, P.; Adelman, N. B.; Beckman, K. J.; Campbell, D. J.; Ellis, A. B.; Lisensky, G. C. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 943–948.
- [98] Maity, D.; Ding, J.; Xue, J.-M. *Int. J. Nanosci.* **2009**, *8*, 65–69.

- [99] Wan, J.; Cai, W.; Meng, X.; Liu, E. *Chem. Commun.* **2007**, 5004–5006.
- [100] Bebie, J.; Schoonen, M.; Fuhrmann, M.; Strongin, D. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1998**, *62*, 633–642.
- [101] Sandell, E. B. *Colorimetric Analysis of Traces of Metals*; Interscience Publishers, Inc.: New York, 1959.
- [102] Fries, J. *Spurenanalyse - Erprobte photometrische Methoden*; E. Merck AG: Darmstadt, 1966.
- [103] Yu, W.; Pei, J.; Huang, W.; Zhao, G. *Mater. Chem. Phys.* **1997**, *49*, 87–92.
- [104] Henglein, A. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1861–1873.
- [105] Spanhel, L.; Haase, M.; Weller, H.; Henglein, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5649–5655.
- [106] Li, C.; Cui, J.; Li, Y.; Wang, C.; Li, Y.; Zhang, L.; Zhang, L.; Guo, W.; Wang, J.; Zhang, H.; Hao, Y.; Wang, Y. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 333–344.
- [107] Spiese, C. E.; Kieber, D. J.; Nomura, C. T. *Limnol. Oceanogr.* **2009**, *54*, 560–570.
- [108] Charlson, R. J.; Lovelock, J. E.; Andreae, M. O.; Warren, S. G. *Nature* **1987**, *326*, 655–661.
- [109] Rickard, D. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, *61*, 115–134.
- [110] Rickard, D.; Griffith, A.; Oldroyd, A.; Butler, I.; Lopez-Capel, E.; Manning, D.; Apperley, D. *Chem. Geol.* **2006**, *235*, 286–298.
- [111] Vaughan, D. J.; Lennie, A. R. *Science Progr. (St. Albans, United Kingdom)* **1991**, *75*, 371–88.
- [112] Wincott, P. L.; Vaughan, D. J. *Rev. Miner. Geochem.* **2006**, *61*, 181–229.
- [113] Rickard, D.; Luther, G. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, *61*, 135–147.
- [114] Park, S.-W.; Kim, S.-K.; Kim, J.-B.; Choi, S.-W.; Inyang, H. I.; Tokunaga, S. *Water, Air, Soil Pollut.: Focus* **2006**, *6*, 97–110.

- [115] Morse, J. W.; Millero, F. J.; Cornwell, J. C.; Rickard, D. *Earth-Sci. Rev.* **1987**, *24*, 1–42.
- [116] Wei, D.; Osseo-Asare, K. *Colloids Surf. A* **1997**, *121*, 27–36.
- [117] Schoonen, M. A. A.; Barnes, H. L. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1991**, *55*, 1505–1514.
- [118] Taylor, P.; Rummery, T.; Owen, D. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1979**, *41*, 1683–1687.
- [119] Butler, I. B.; Rickard, D. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64*, 2665–2672.
- [120] Canfield, D. E.; Raiswell, R.; Westrich, J. T.; Reaves, C. M.; Berner, R. A. *Chem. Geol.* **1986**, *54*, 149–155.
- [121] Wood, P. M. *FEBS Lett.* **1981**, *124*, 11–14.
- [122] McNamara, J. P.; Hillier, I. H.; Bhachu, T. S.; Garner, C. D. *Dalton Trans.* **2005**, 3572–3579.
- [123] Hille, R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2757–2816; PMID: 11848841.
- [124] Riddick, J. A.; Bunger, W. B.; Sakano, T. K. *Organic Solvents, Fourth Edition*; John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [125] Mehmet, Y.; Hyne, J. B. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1976**, *1*, 47–54.
- [126] Becker, H.; Berckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K. *Organikum*; Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2001.

## Danksagung

- Prof. Dr. W. Weigand danke ich für die außergewöhnliche und spannende Aufgabenstellung, sein stetiges großes Interesse, die vielen Anregungen und Ideen sowie seine vielfältige Unterstützung, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.
- Prof. Dr. A. Fahr danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie die vielen anregenden Diskussionen und hilfreichen Hinweise im Verlauf der Doktorarbeit.
- Kristin Rüdell danke ich für die langjährige, sehr gute Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt, die vielen Diskussionen und Ermutigungen. Ebenfalls danke ich ihr für die Durchführung der Membranstabilitätsexperimente und DSC-Untersuchungen sowie die Unterstützung bei den PCS-Messungen.
- Dr. Ronny Rieger danke ich für die kritische Begleitung der Untersuchungen, seine kreativen Ideen und hilfreichen Hinweise, für die Bereitstellung der Abb. 28 sowie für die Unterstützung bei den Untersuchungen zu magnetophoretischen Vesikeln.
- Prof. Dr. P.-L. Luisi und dottore Pasquale Stano danke ich für die herzliche Aufnahme und die intensive Betreuung während meines Forschungsaufenthalts an der Universität Roma Tre sowie für viele spätere fruchtbare Diskussionen.
- Meiner ehemaligen Masterstudentin Zheqiong Qi danke ich für die Durchführung der Experimente zu Cd- und Cu-haltigen Polymersomen sowie für die Unterstützung bei den Untersuchungen zur Reduktion von DMSO.
- Meinen ehemaligen AC V-Praktikanten Nico Überschaar, Helena Krug und Peter Schneider sowie Matthias Köhler (studentische Hilfskraft) bin ich für ihr Engagement und ihre Unterstützung bei verschiedenen Teilprojekten zu Dank verpflichtet.
- Prof. Dr. S. Förster und Dr. Volkan Filiz von der Universität Hamburg danke ich für die Bereitstellung des 1,2-Polybutadien-polyethylen-block-Copolymers und für wertvolle Hinweise.
- Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Weigand danke ich für die vielen Gespräche, Anregungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

- Dr. Sandor Nietzsche und besonders Frank Steiniger danke ich für die Durchführung vieler elektronenmikroskopischer Untersuchungen und hilfreiche Anregungen.
- Dr. Wolfgang Poppitz danke ich für die Mithilfe bei der Methodenentwicklung für die Analyse der DMSO-Experimente sowie für die Unterstützung bei GC-, MS- sowie IR-Untersuchungen.
- Kristin Schäfer und Susanne Spangenberg danke ich für die Durchführung der FAAS-Untersuchungen.
- Frau C. Apfel danke ich für die Durchführung der Röntgenpulverdiffraktometrie sowie Dr. Jochen Schmitt für die BET-Untersuchungen.
- Dem *Evangelischen Studienwerk Villigst* danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums sowie die anregenden und horizonterweiternden Bildungsangebote. Der *Studienstiftung des deutschen Volkes* danke ich für die ideelle Förderung während meiner Doktorarbeit.
- Antje, meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für die Begleitung und Unterstützung in den zurückliegenden Jahren, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen

### Publikationen

1. Schubert, K.; Alpermann, T.; Niksch, T.; Görls, H.; Weigand, W. *Synthese und Charakterisierung funktionalisierter  $\beta$ -Hydroxydithiozimsäuren und deren Ester. Komplexchemisches Verhalten gegenüber Nickel(II), Palladium(II) und Platin(II).* *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2006**, *632*, 1033-1042.
2. Alpermann, T.; Holmlid, L. *Confocal laser microspectroscopic Rabi-flopping study of an iron oxide emitter surface used for Rydberg matter generation.* *Spectrochimica Acta Part A* **2007**, *67*, 877-885.
3. Dörr, M.; Alpermann, T.; Weigand, W. *The FeS / H<sub>2</sub>S System as a Possible Primordial Source of Redox Energy.* *Orig. Life Evol. Biosph.* **2007**, *37*, 329-333.
4. Alpermann, T.; Weigand, W. *Encyclopedia of Time*; Birx, H. J., Hrsg.; Sage, Thousand Oaks, California, USA, **2008**; Kapitel Evolution, Chemical, 455-464.
5. Apfel, U.-P.; Rudolph, M.; Apfel, C.; Robl, C.; Langenegger, D.; Hoyer, D.; Jaun, B.; Ebert, M.-O.; Alpermann, T.; Seebach, D.; Weigand, W. *Reaction of Fe<sub>3</sub>(CO)<sub>12</sub> with octreotide - chemical, electrochemical and biological investigations.* *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 3065-3071.
6. Alpermann, T.; Rüdell, K.; Rieger, R.; Knoepffler, N.; Fahr, A.; Weigand, W. *Workshop Open Questions about the Origin of Life 2009; On Question 3: Heterotrophic Versus Autotrophic Scenarios.* *Orig. Life Evol. Biosph.* **2010**, *40*, 402-406.
7. Alpermann, T.; Rüdell, K.; Rieger, R.; Steiniger, F.; Nietzsche, S.; Filiz, V.; Förster, S.; Fahr, A.; Weigand, W. *Polymersomes containing iron sulfide (FeS) as primordial cell model.* *Orig. Life Evol. Biosph.* **2011**, *41*, 103-119.

### Poster

1. Alpermann, T.; Rüdell, K.; Rieger, R.; Steiniger, F.; Nietzsche, S.; Fahr, A.; Weigand, W. *SYNTHCELLS - Investigation of a Polymersome Based Prebiotic Cell Model.* auf der Jahrestagung der DPhG 2009, Jena, 28. September - 01. Oktober 2009

**Vorträge**

1. Alpermann, T.; Rüdell, K.; Fahr, A.; Weigand, W. *Constructing Models of Possible First Primitive Cells.* im Rahmen von *Organometallic Complexes of Sulphur or Selenium Ligands: Jena-Irbid Relationship*, Irbid (Jordanien), 6.-8. Oktober 2008
2. Alpermann, T. *Modellierung möglicher primordialer Protozellen.* beim *7. Mittel-deutschen Anorganiker-Nachwuchs Symposium*, Chemnitz, 23. September 2009

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Hannover, den 18.05.2012

.....

Theodor Alpermann

# Supplement

### Berechnung des internen Volumens von monodispersen POPC-Liposomendispersionen (aus 10 mg POPC)

Verwendung des tatsächlichen Radius von Liposomen; hydrodynamischer Radius (aus PCS-Messungen) nur Näherung

| Außenradius der Liposomenmembran | Innenradius der Liposomenmembran | äußere Oberfläche der Liposomenmembran | innere Oberfläche der Liposomenmembran | Aggregationszahl (Anzahl POPC-Moleküle pro Liposom) | Anzahl der Liposomen | Internes Volumen   | Internes Volumen    |
|----------------------------------|----------------------------------|--|--|---|----------------------|--------------------|---------------------|
| $R_{out}$ (in nm)                | $R_{in}$ (in nm)                 | $A_{out}$ (in $nm^2$ )                 | $A_{in}$ (in $nm^2$ )                  | $N_{agg}$   | $N_{Lipo}$           | $V_i$ (in $nm^3$ ) | $V_i$ (in $\mu l$ ) |
| 20                               | 16,3                             | 5026,5                                 | 3338,8                                 | 11618   | 6,82E+14             | 1,24E+19           | 12,4                |
| 30                               | 26,3                             | 11309,7                                | 8692,0                                 | 27780   | 2,85E+14             | 2,17E+19           | 21,7                |
| 40                               | 36,3                             | 20106,2                                | 16558,6                                | 50923   | 1,56E+14             | 3,12E+19           | 31,2                |
| 50                               | 46,3                             | 31415,9                                | 26938,4                                | 81048   | 9,78E+13             | 4,06E+19           | 40,6                |
| 60                               | 56,3                             | 45238,9                                | 39831,5                                | 118153  | 6,71E+13             | 5,01E+19           | 50,1                |
| 70                               | 66,3                             | 61575,2                                | 55237,9                                | 162240  | 4,88E+13             | 5,96E+19           | 59,6                |
| 80                               | 76,3                             | 80424,8                                | 73157,5                                | 213309  | 3,71E+13             | 6,91E+19           | 69,1                |
| 100                              | 96,3                             | 125663,7                               | 116536,6                               | 336389  | 2,36E+13             | 8,81E+19           | 88,1                |
| 150                              | 146,3                            | 282743,3                               | 268966,7                               | 766264  | 1,03E+13             | 1,36E+20           | 135,6               |
| 200                              | 196,3                            | 502664,8                               | 484228,6                               | 1370671   | 5,78E+12             | 1,83E+20           | 183,2               |

$$R_{in} = R_{out} - 2 * l \quad A_{out} = 4 * \pi * R_{out}^2 \quad A_{in} = 4 * \pi * R_{in}^2 \quad N_{agg} = (A_{in} + A_{out}) / a_0$$

$$V_i = N_{Lipo} * 4/3 * \pi * R_{in}^3$$

$$N_{Lipo} = N_A * m_{POPC} / (M_{POPC} * N_{agg})$$

### Parameter

| Platzbedarf einer POPC-Kopfgruppe $a_0$ (in $nm^2$ ) | Länge eines POPC-Moleküls $l$ (nm) | $M_{POPC}$ (g/mol) | eingesetzte Masse an POPC $m_{POPC}$ (g) |
|--|------------------------------------|--------------------|--|
| 0,72   | 1,85                               | 760                | 0,01                                     |

$N_A$  - Avogadro-Zahl ( $6.022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )

für 10 mg POPC

Abb. 70

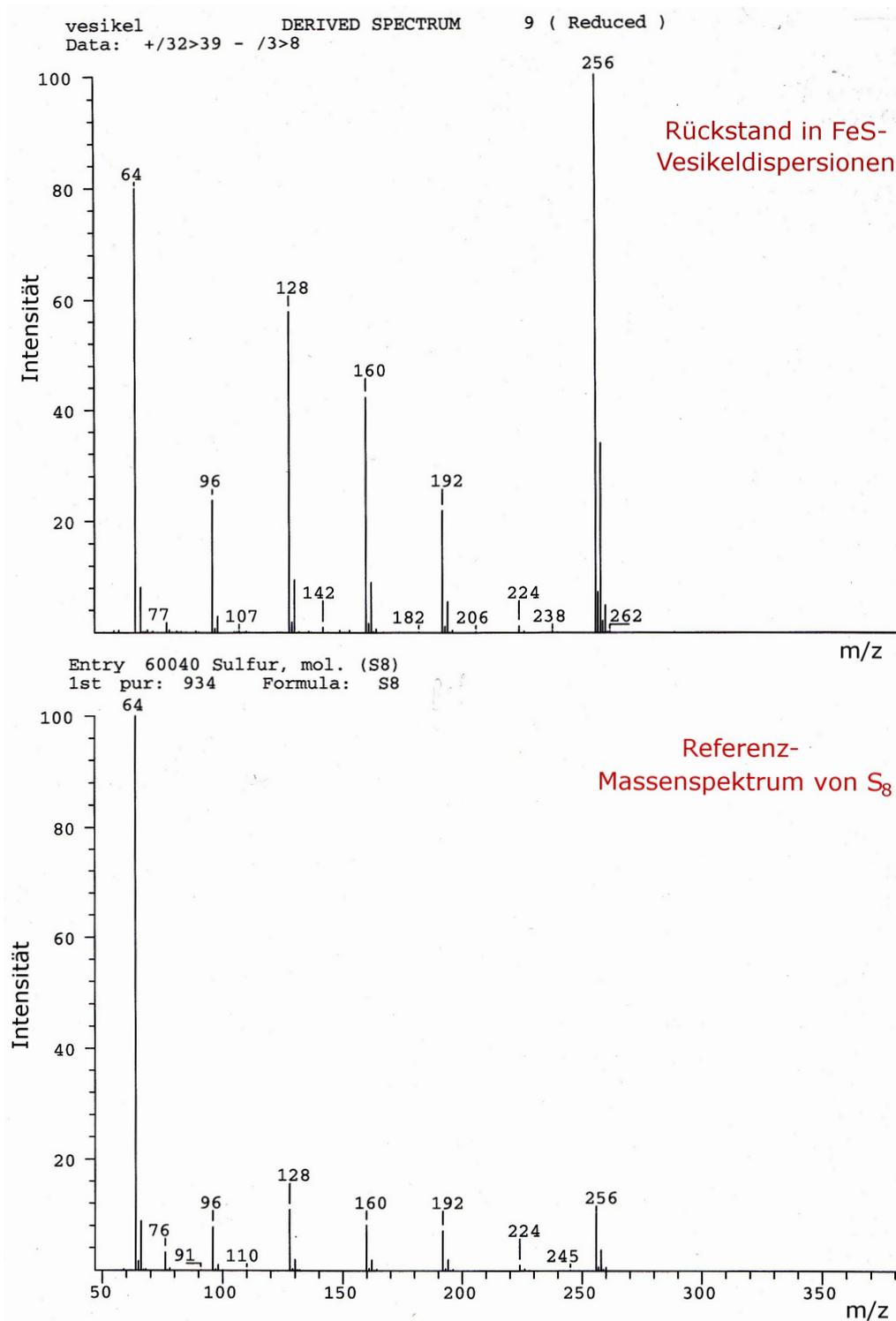


Abb. 71: Massenspektrum des Rückstands aus FeS-Polymersomendispersionen (oben) und Referenz-MS von S<sub>8</sub>