

Untersuchungen von Wirkstoffträgersystemen mit Hilfe der Feldgradienten-NMR

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

am Fachbereich Chemie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Alina Leson geb. Bauer
aus Duisburg

Referent: Prof. Dr. Christian Mayer
1. Korreferent: Prof. Dr. Stephan Förster
2. Korreferent: Prof. Dr. Heinz W. Siesler

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis Juli 2007 im Fachgebiet der Physikalischen Chemie an der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. C. Mayer angefertigt.

*Freude an der Arbeit lässt
das Werk trefflich geraten
Aristoteles*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Mayer für die Überlassung des interessanten Themas, für seine fortwährende Unterstützung und Motivation, sowie für sein großes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. S. Förster für die Übernahme des Korreferates und herzlichst für die nette Aufnahme in Hamburg.

Frau A. Rank, Herrn A. Neub, Herrn M. Stolzenburg und Herrn S. Hauschild danke ich für die sehr gute Kooperation, für die vielen Denkanstöße und für die tollen gemeinsamen Tagungen. Es hat viel Spass gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Fachgebiets Physikalische Chemie danke ich für das schöne Arbeitsklima, die leckeren Frühstücke und für die Unterstützung bei jeglichen Fragenstellungen. Besonders danke ich dabei Frau A. Terheiden, Herrn D. Bergmann, Herrn S. Beuermann und Herrn J. Linders. Des weitern danke ich Herrn M. Zähres für den unermüdlischen Einsatz in Bezug auf NMR und Mikroskopie und allen Bachelorkandidaten und Diplomanden für die vielen Ergebnisse.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Volkswagen Stiftung.

Last but not least:

Die Dankbarkeit die ich meinem Mann Marcel und meiner Familie schulde kann ich hier gar nicht zum Ausdruck bringen. Ohne Eure Unterstützung wäre ich nie so weit gekommen. Ich danke euch für diese Unterstützung, eure Aufmunterungen und euer immer währendes Interesse an meiner Arbeit, auch wenn Ihr nicht immer alles verstanden habt. ☺

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
2	<u>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</u>	4
2.1	Von Blockcopolymeren zu Vesikeln	4
2.1.1	Blockcopolymerere	4
2.1.2	Selbstorganisation von Blockcopolymeren	11
2.1.3	Darstellung von Vesikeln	13
2.1.4	Charakterisierung von Vesikeln	15
2.2	Weitere Wirkstoffträgersysteme	19
2.2.1	Liposomen ^[60]	22
2.2.2	Polymer-Nanopartikel ^[60]	24
2.3	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie ^[74]	26
2.3.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	26
2.3.2	Gepulste Feldgradienten-NMR (PFG-NMR)	30
3	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	38
3.1	Synthesen der Blockcopolymerere	38
3.1.1	Synthese und Reinigung von Poly(2-vinylpyridin-block-ethylenoxid) P2VP-PEO ^[8]	38
3.1.2	Synthese und Reinigung von Poly(isopren-block-ethylenoxid) PI-PEO und Poly(butadien-block-ethylenoxid) PB-PEO ^[8]	39
3.1.3	Synthese und Reinigung von Poly(laktid-block-ethylenoxid) PLA-PEO ^[90]	39
3.2	Vesikel aus Blockcopolymeren und Lipiden	40
3.2.1	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus P2VP-PEO	40
3.2.2	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PI-PEO ^[92]	41
3.2.3	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PLA-PEO ^[92]	42
3.2.4	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PB-PEO	42
3.2.5	Herstellung von Vesikeln (Liposomen) aus Ei-Phosphatidylcholin (EPC) und Cholesterol	43
3.3	Untersuchungen mit gepulster Feldgradienten-NMR	44
3.4	Zeitaufgelöste ¹ H-PFG-NMR-Methode	46
3.5	Untersuchung des Austauschverhaltens aus Vesikeln	48
3.5.1	Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten	48
3.5.2	Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten	49
3.5.3	Einfluss von Additiven auf das Austauschverhaltens	50
3.5.4	Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten	50

3.6	Verwendete Chemikalien und Geräte	51
3.6.1	Verwendete Chemikalien	51
3.6.2	Verwendete Geräte	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Herstellung und Charakterisierung der Vesikelsysteme	53
4.1.1	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus P2VP-PEO	53
4.1.2	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PI-PEO ^[92]	54
4.1.3	Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PLA-PEO ^[92]	56
4.2	Untersuchungen mit gepulster Feldgradienten-NMR	58
4.3	Austauschverhalten aus P2VP-PEO Vesikeln	59
4.3.1	Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten	60
4.3.2	Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten	63
4.3.3	Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten	65
4.3.4	Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten	68
4.4	Austauschverhalten aus PI-PEO Vesikeln	73
4.4.1	Austauschverhalten von Wasser	73
4.4.2	Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten	73
4.4.3	Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten	74
4.4.4	Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten	78
4.5	Austauschverhalten aus PLA-PEO Vesikeln	82
4.5.1	Austauschverhalten von Wasser	82
4.5.2	Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten	83
4.5.3	Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten	84
4.5.4	Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten	87
4.6	Austauschverhalten aus PB-PEO Vesikeln	90
4.6.1	Austauschverhalten von Wasser	90
4.6.2	Einfluss der Temperatur auf das Austauschverhalten	90
5	DISKUSSION	92
5.1	Herstellung und Charakterisierung der Vesikelsysteme	92
5.2	Interpretation der ¹ H-PFG-NMR Messungen	95
5.3	Zeitaufgelöste ¹ H-PFG-NMR-Messung	98
5.4	Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten	99

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>III</u>
5.4.1 Einfluss des Radius	100
5.4.2 Einfluss der Bilayerdicke	101
5.4.3 Einfluss des verwendeten Blockcopolymers	102
5.5 Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten	105
5.5.1 Einfluss des hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde	105
5.5.2 Einfluss der Polarität der verwendeten chemischen Sonde	106
5.6 Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten	107
5.7 Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten	110
5.7.1 Einfluss der Temperatur	110
5.7.2 Einfluss des pH-Werts	112
<u>6 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>114</u>
<u>7 LITERATUR</u>	<u>117</u>
<u>8 ANHANG</u>	<u>121</u>
8.1 Abbildungsverzeichnis	121
8.2 Tabellenverzeichnis	126

DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNM	Dynamic nanosizing microscopy
DPMK	Diphenylmethylkalium
EO	Ethylenoxid
EPC	Ei-Phosphatidylcholin
GPC	Gelpermeationschromatographie
GUV	Giant unilamellar vesicles
LUV	large unilamellar vesicles
M_n	Zahlenmittel der Molmassenverteilung
M_w	Gewichtsmittel der Molmassenverteilung
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption, time of flight
MLV	multilamellar large vesicles
MVV	multivesicular vesicles
NMR	kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OLV	oligolamellar vesicles
P2VP	Poly(2-vinylpyridin)
P2VP-PEO	Poly(2-vinylpyridin-block-ethylenoxid)
PACA	Polyalkylcyanoacrylat
PB	Polybutadien
PB-PEO	Poly(butadien-block-ethylenoxid)
PD	Polydispersität
PEG400MMEMMA	Poly(ethylenglycol)-400-monomethylethermono-methacrylat
PEO	Polyethylenoxid
PFG-NMR	Gepulste Feldgradienten NMR
PI	Polyisopren
PI-PEO	Poly(isopren-block-ethylenoxid)
PLA	Polylaktid
PLA-PEO	Poly(laktid- <i>block</i> -ethylenoxid)
ppm	parts per million
PVA	Polyvinylalkohol
SANS	Neutronenkleinwinkelstreuung
SUV	small unilamellar vesicles
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VPG	Vesikuläre Phospholipidgele

1 Einleitung

In der Pharmazie werden immer neue Verfahren zur Überführung eines Wirkstoffes in eine Arzneiform gesucht, welche nicht nur bequem zu applizieren ist, sondern auch die Gewähr bietet, dass der Wirkstoff nach der Verabreichung therapiegerecht freigegeben wird. Mit Hilfe von so genannten „drug-delivery“-Systemen soll am Wirkungsort ein für die Therapie optimaler Konzentrationsverlauf erreicht werden, wobei die Konzentration des Wirkstoffs am Wirkungsort unmittelbar nach der Applikation rasch ansteigen und mit Erreichen der gewünschten Wirkstoffkonzentration in ein Plateau übergehen soll. Dieses Plateau sollte bei optimaler Anwendung über eine bestimmte Zeit einen annähernd konstanten Wirkstoffspiegel garantieren^[1].

Als Wirkstoffträgersysteme sind Liposomen weitläufig untersucht. Dies sind sphärisch gekrümmte Membranlamellen, die einen wässrigen Innenraum von einer kontinuierlichen wässrigen Phase abtrennen (siehe Abbildung 1.1).

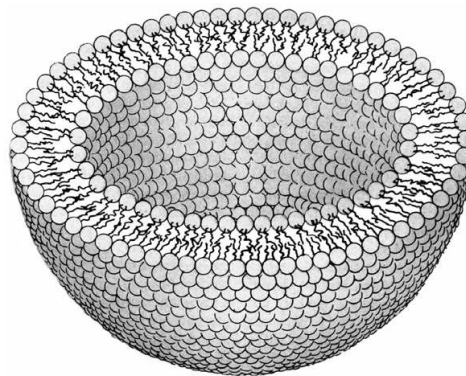


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Liposoms^[2]

Mit Hilfe der Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl und der Größe der Liposomen kann der Beladungsgrad mit Wirkstoffen variiert und die Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden. Für hydrophile Wirkstoffe stellen die Membranen eine Permeationsbarriere dar, so dass vor allem bei multilamellaren Liposomen eine verlangsamte Wirkstoffabgabe erreicht wird und sich damit ein Depoteffekt ergibt. Ein großer Vorteil dieser Systeme ist die hohe Bioakzeptanz aufgrund der verwendeten, natürlichen Grundbausteine (Phospholipide). Ein großer Nachteil hingegen ist es, dass Liposomen vom Immunsystem innerhalb weniger Minuten als körperfremd erkannt, opsonisiert (Anlagerung von bestimmten Proteinen) und durch die Makrophagen in Leber und Milz aus dem Blutstrom eliminiert werden^[1].

Ähnliche Membranvesikel wie Liposomen sind die Polymersomen, die auch als Wirkstoffträger (englisch: drug carrier) eingesetzt werden können. Bei den Polymersomen, also Vesikeln aus Blockcopolymeren, besteht die Membran ebenfalls aus einer Doppelschicht von Molekülen, die an einer Seite hydrophobe und an der anderen Seite

hydrophile Eigenschaften aufweisen. Ein großer Vorteil dieser Vesikel ist, dass als hydrophiler Teil der Membran Polyethylenoxid verwendet werden kann. Über diese Substanz ist bekannt, dass sie einen maskierenden Effekt im Körper hat, was dazu führt, dass die Wirkstoffträgersubstanzen nicht so schnell vom Immunsystem als Fremdstoff erkannt werden. Dieser „stealth effect“ wurde schon bei Liposomen benutzt und erhöhte damit die Aufenthaltsdauer der Liposomen im Körper von wenigen Minuten auf bis zu 20 Stunden^[3].

Die wichtigste Eigenschaft aller Wirkstoffträgersysteme stellt die Permeabilität der Membran dar. Je größer diese Permeabilität ist, desto schneller wird ein Wirkstoff freigesetzt. Daher ist es sehr interessant diese Permeabilität zu bestimmen und sie in definierten Grenzen zu beeinflussen.

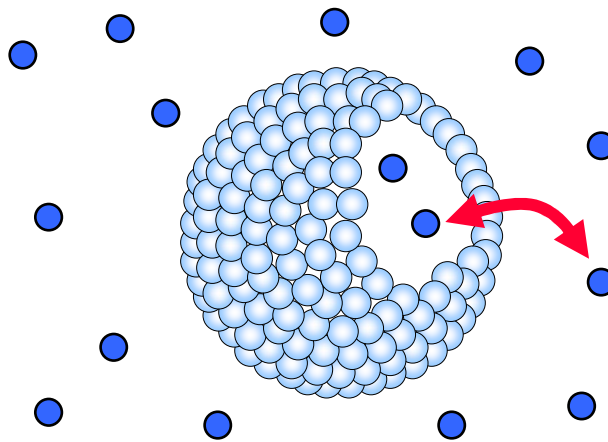


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Austausches von Molekülen durch eine Polymersomen-Membran. So sind z. B. schaltbare Systeme, welche ihre Permeabilität aufgrund von äußeren Einflüssen wie Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen anpassen, zum jetzigen Zeitpunkt wissenschaftlich sehr bedeutsam. Daher ist es für die Untersuchung von Wirkstoffträgersystemen nötig, eine Methode zu verwenden, mit welcher es möglich ist Permeabilitäten oder entsprechende Verweilzeiten von eingekapselten Molekülen zu bestimmen. Als geeignete Methode dafür bietet sich die kernmagnetische Resonanzspektroskopie mit gepulsten Feldgradienten (englisch: PFG-NMR, pulsed-field-gradient nuclear magnetic resonance) an. Mit dieser Methode ist es möglich die räumlichen Molekülbewegungen in der Probe während einer vorgegebenen Zeit zu erfassen. Durch diese Bewegungen werden Signalverluste verursacht, die die Berechnung der Diffusionskoeffizienten ermöglicht.

Des Weiteren ist es mit Hilfe dieser Methode möglich, eine eingekapselte Substanz von einer frei beweglichen Substanz zu unterscheiden. Somit kann die Verweildauer sowie das relative eingekapselte Volumen von jeder chemischen Substanz untersucht werden. Im Gegensatz zu weiteren analytischen Verfahren kann auf eine Markierung der verwendeten Sonden, z. B.

durch Fluoreszenz oder Radioaktivität, verzichtet werden. Bei der Beobachtung im thermischen Gleichgewicht können allerdings nur sehr schnelle Austauschphänomene untersucht werden. Aus diesem Grund wird im Verlauf dieser Arbeit eine auf der PFG-NMR beruhende, zeitaufgelöste Messmethode entwickelt und optimiert.

Mit Hilfe dieser beiden PFG-NMR Methoden werden in der vorliegenden Arbeit Vesikel aus vier verschiedenen Blockcopolymeren im Hinblick auf ihre Eignung als Wirkstoffträgersysteme untersucht. Dazu werden Vesikel aus den folgende Blockcopolymeren dargestellt: Poly(2-vinylpyridin-block-ethylenoxid) (P2VP-PEO), Poly(isopren-block-ethylenoxid) (PI-PEO), Poly(butadien-block-ethylenoxid) (PB-PEO) und Poly(laktid-*block*-ethylenoxid) (PLA-PEO). Anhand von Vesikeln aus (P2VP-PEO) werden die Abhängigkeiten des Austauschverhaltens von den Eigenschaften der Vesikel und den verwendeten chemischen Sonden untersucht. Weitergehend wird der Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf die Permeabilität der Vesikelmembran analysiert. Aufbauend auf diesen Resultaten werden weiterreichende Versuche an Vesikeln aus PI-PEO, PB-PEO und PLA-PEO durchgeführt. Neben der Untersuchung dieser Austauschphänomene wird als Nebenaspekt dieser Arbeit auch bestimmt welche Darstellungsmethode zu Vesikelsystemen mit optimierten Größenverteilungen führt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Von Blockcopolymeren zu Vesikeln

2.1.1 Blockcopolymere

Polymere (griechisch: *poly*, viel; *meros*, Teil) sind chemische Verbindungen, die aus einer großen Anzahl so genannter Monomereinheiten aufgebaut sind und in verschiedene Gruppen unterteilt werden können. Im einfachsten Fall besteht ein Polymer nur aus einer sich wiederholenden Monomereinheit A, wobei von einem Homopolymer gesprochen wird. Sollte sich ein Polymer aus mindestens zwei verschiedenen Monomereinheiten zusammensetzen, die linear oder verzweigt miteinander verknüpft sind, so entsteht ein Copolymer (siehe Abbildung 2.1).

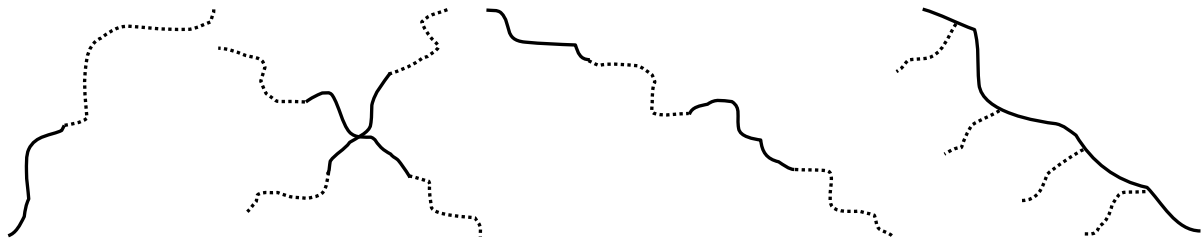


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Verknüpfungen von verschiedenen Monomerblöcken in Copolymeren

Weiterführend existieren auch Blockcopolymere $[A]_n[B]_n$, bei denen homopolymere Abschnitte $[A]_n$ und $[B]_n$ in Blöcken miteinander verknüpft sind. Diese Verknüpfungen haben zur Folge, dass die chemischen Eigenschaften der einzelnen Monomereinheiten miteinander vereint werden. Weist z. B. im Fall eines Di-Blockcopolymers, also in einem Blockcopolymer aus zwei Homopolymerblöcken, ein Homopolymer hydrophobe und das andere hydrophile Eigenschaften auf, so entsteht ein amphiphiles Blockcopolymer. Diese Amphiphilie (griechisch: *ampho*, beides; *philos*, liebend) ist für die Grenzflächen-stabilisierende Eigenschaft bestimmter Blockcopolymere verantwortlich, womit es nicht nur möglich ist, eine Wasser/Öl-Grenzschicht zu stabilisieren; es konnten auch schon Grenzflächen unterschiedlicher Kohäsionsenergien wie Polymer/Polymer oder Polymer/Metall stabilisiert werden^[4]. Allerdings spielt nicht nur die Wahl der Homopolymere eine große Rolle für die Eigenschaften des späteren Blockcopolymers, auch die Verknüpfung und die Länge der einzelnen Bausteine ist wichtig. Hergestellt werden Blockcopolymere z. B. durch eine nachträgliche Verknüpfung zweier endfunktionalisierter Homopolymere. Bei dieser Art der Reaktion verbleiben jedoch, aufgrund eines unvollständigen Reaktionsumsatzes, meist Homopolymere im Produkt zurück, welche bei der weiteren Verwendung störend wirken. Ein zweiter Weg ist die sequenzielle Polymerisation verschiedener Monomere.

Bevorzugte Verfahren hierfür sind lebende bzw. kontrollierte Polymerisationen, wie anionische, kationische, lebende radikalische und Gruppen-Transferpolymerisation^[5].

Als Standarddarstellung von Blockcopolymeren im technischen Maßstab hat sich die erstmals 1956 von Szwarz beschriebene anionische Polymerisation etabliert^[6]. Die Besonderheit dieser Art der Polymerisation liegt darin, dass sie unter Ausschluss von Luft, Feuchtigkeit und Verunreinigungen ohne Abbruchreaktionen durchgeführt werden kann. Die aktiven Kettenenden ermöglichen es, nach vollständiger Umsetzung durch Zugabe weiterer Monomere die Polymerisation fortzusetzen^[7]. Wie jede Polymerisationsreaktion besteht auch die anionische Polymerisation aus Initiierungs-, Wachstums- und Abbruchreaktion. Der lebende Charakter zeigt sich durch die Abwesenheit von Übertragungs- und Abbruchreaktionen. Jedes Initiator-molekül erzeugt eine wachsende Polymerkette und jeder Wachstumsschritt erhöht den Polymerisationsgrad um 1. Der Polymerisationsgrad P_n ist daher proportional zum Umsatz u und zum molaren Verhältnis der Startkonzentration des Monomers M $[M]_0$ und des Initiators I $[I]_0$.

$$P_n = \frac{[M]_0}{[I]_0} \cdot u \quad [2.1]$$

Wenn alle Ketten durch einen schnellen Initiierungsschritt gleichzeitig gestartet werden, entsteht eine enge Molmassenverteilung mit einer Polydispersität $PD_1 < 1,1$.

$$PD_1 = \frac{M_w}{M_n} = 1 + \frac{P_n}{(P_n + 1)^2} \approx 1 + \frac{1}{P_n} \quad \text{für } P_n \gg 1 \quad [2.2]$$

M_w = Gewichtsmittel der Molmassenverteilung

M_n = Zahlenmittel der Molmassenverteilung

Zu den mit dieser Art der Polymerisation verwendbaren Verbindungen gehören Vinylverbindungen, die durch elektronenziehende oder delokalisierende Substituenten das Carbanion stabilisieren können. Außerdem können cyclische Verbindungen wie Laktame, Laktone, Oxirane und Siloxane unter Ringöffnung polymerisiert werden. Als Initiatoren werden Brønstedt- oder Lewis-Basen (z. B. Alkalialkyle und -aryle, Alkoholate und Alkalimetalle) eingesetzt. Dabei regt ein Initiator ein ungesättigtes Monomer umso leichter zur Polymerisation an, je größer sein pK_a -Wert ist. Neben dieser Basizität spielen allerdings auch sterische Effekte, die Resonanzstabilisierung der Initiatoranionen und die Komplexierung der Gegenionen durch das Lösungsmittelmolekül oder Monomere eine Rolle. Zur Initiierung von Vinylmonomeren werden hauptsächlich Lithiumorganyle eingesetzt, da sie eine geringe Elektronenaffinität und -negativität aufweisen und die Doppelbindung direkt nucleophil angreifen. Durch die Zugabe eines zweiten Monomers zur Anionenlösung entstehen Diblockcopolymere und durch Zugabe eines Abbruchreagenzes, z. B. Wasser, wird die Reaktion kontrolliert beendet. Der kontrollierte Abbruch eignet sich außerdem zur

Funktionalisierung der Polymerketten. Durch Zugabe eines Elektrophils lassen sich so gezielt Endgruppen einführen, welche das Polymer für weitere Umsetzungen zugänglich machen. Auch die Wahl eines entsprechenden Initiators ermöglicht das Einführen funktioneller Gruppen^[8].

In dieser Arbeit werden mehrere im Arbeitskreis Förster an der Universität Hamburg hergestellte Blockcopolymere verwendet. Der Hauptteil der Untersuchungen wird an Poly(2-vinylpyridin-*block*-ethylenoxid) (P2VP-PEO) durchgeführt.



Abbildung 2.2: Chemische Strukturen von Poly(2-vinylpyridin) und Polyethylenoxid

Die Verwendung von Poly(2-vinylpyridin) (P2VP) als Block in sequentiell anionisch polymerisierten Blockcopolymeren ist seit längerem in der Literatur bekannt^[9-11]. Auch wurde bereits über die Verbindung mit Poly(ethylenoxid) (PEO) berichtet^[12]. Das resultierende Blockcopolymer P2VP-PEO ist ein amphiphiles Molekül, welches durch die Überführung von P2VP in ein Polykation vollständig hydrophil wird. Im experimentellen Teil wird die in der Arbeitsgruppe Förster durchgeführte Synthese dieses Blockcopolymer ausführlich beschrieben^[8].

Neben P2VP-PEO werden auch Blockcopolymere aus Poly(butadien-*block*-ethylenoxid) (PB-PEO) und Poly(isopren-*block*-ethylenoxid) (PI-PEO) verwendet. Diese Blockcopolymere sind amphiphil und für ihre spontane Selbstorganisation in selektiven Lösungsmitteln bekannt^[13]. Eine weitere Besonderheit liegt in der Doppelbindung der Seitenketten der PB- bzw. PI-Blöcke, wodurch Vernetzungsreaktionen möglich sind^[14]. Diese Blockcopolymere werden ebenfalls über anionische Polymerisation hergestellt. Dabei sind aufgrund verschiedenster Verknüpfungsmöglichkeiten viele unterschiedliche Polymerstrukturen zugänglich. Untersuchungen haben ergeben, dass die Polymerisation in unpolaren Lösungsmitteln wie Cyclohexan eine Bevorzugung der 1,4-Verknüpfung zur Folge hat. In polaren Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran (THF) wird das Kation durch die Lösungsmittelmoleküle komplexiert, wodurch ein getrenntes Ionenpaar ausgebildet wird. Dadurch verläuft die Polymerisation schneller und es entsteht eine 1,2-Verknüpfung^[8].

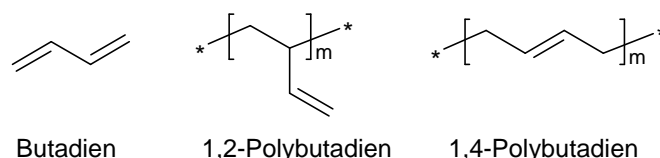


Abbildung 2.3: Mögliche Polymerstrukturen von Butadien

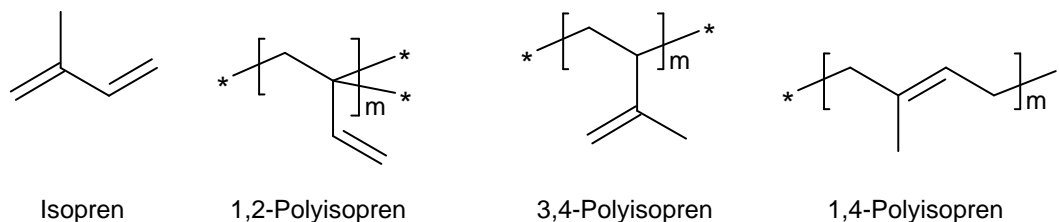


Abbildung 2.4: Mögliche Polymerstrukturen von Isopren

Für die Blockcopolymersynthese zu PB-PEO und PI-PEO spielt die Wahl des Gegenions ebenfalls eine wichtige Rolle. In diesem Fall stellt Butyllithium den Standardinitiator für die PB/PI-Polymerisation dar. Folglich sind verschiedene Techniken entwickelt worden, um eine Blockcopolymersynthese zu erreichen. Die Erste ist eine Zweistufenreaktion und beruht auf der Polymerisation von PB/PI mit einem Lithiumkation als Gegenion, wobei der Kreuzschritt durch Endfunktionalisierung mit EO, Isolation des OH-funktionalisierten PB/PI-Blockes und Reinitiiierung mit einem Kaliumorganyl (z. B. Cumylkalium, Kaliumnaphthalid) vollzogen wird. Eine Einstufenreaktion wurde erstmals von Förster et al. vorgestellt^[15]. Dabei wird das Lithiumkation durch effektive Komplexierung mit der starken Phosphazenenbase $t\text{-BuP}_4$ in ein weiches Kation überführt, wodurch bei der EO-Polymerisation ein solvatgetrenntes Ionenpaar vorliegt, welches die nötige Reaktivität aufweist^[16]. Die Anwesenheit der Phosphazenenbase ist bei der Polymerisation von Butadien und Isopren ebenfalls von Vorteil, da dadurch die Polymerisation beschleunigt, sowie die Ausbildung von 1,2- bzw. 3,4-verknüpften Monomeren unterstützt wird.

Ein weiteres interessantes Blockcopolymer stellt das Poly(laktid-*block*-ethylenoxid) (PLA-PEO) dar. Das Polylaktid führt zu biologisch abbaubaren Polymeren, welche besonders für eine potentielle Anwendung der Blockcopolymere in der Medizin wichtig sind. In der Literatur sind mehrere Blöcke bekannt, die mit Polylaktid zu amphiphile Blockcopolymere umgesetzt werden können^[17, 18]. In der vorliegenden Arbeit wird Polyethylenoxid (PEO) als hydrophiler Block verwendet, da es sehr gut wasserlöslich, medizinisch absolut unbedenklich und von der „food and drug administration“ (FDA) für den pharmazeutischen Einsatz zugelassen ist. Die Synthese von Poly(laktid-*block*-ethylenoxid) findet in einer sequentiellen Reaktion statt, welche in THF durchgeführt wird, wodurch die Polymerisation beschleunigt wird. Diese findet in zwei getrennten Schritten statt. Zu Beginn wird Ethylenoxid getrocknet, gereinigt und anschließend mit einem geeigneten Initiator z. B. Diphenylmethyl-Kalium initiiert. Zu dem entstandenen PEO wird anschließend Laktid, welches zuvor in trockenem THF gelöst wurde, mit einer Umdrucknadel unter Schutzatmosphäre in den Reaktorkolben überführt.

Die Synthesevorschriften dieser drei Blockcopolymere sind ebenfalls im experimentellen Teil zusammengefasst.

Charakterisiert werden die Blockcopolymeren mit Hilfe verschiedener Analysemethoden. Hauptsächlich werden Größenausschlusschromatographie (GPC), MALDI-TOF-Massenspektrometrie und kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) verwendet. Mit Hilfe der GPC (englisch: SEC: size exclusion chromatographie) wird die Molmasse bzw. die Molmassenverteilung von Polymeren ermittelt^[19-21]. Dabei werden die zu untersuchenden Proben mittels eines Eluenten mit konstanter Fließgeschwindigkeit durch mehrere, hintereinander geschaltete, gepackte Säulen gespült.

Wird die Probenlösung auf die Säule aufgetragen, so werden die Moleküle durch das Lösungsmittel in die Poren des Trägermaterials gespült und verweilen dort in Abhängigkeit vom Porendurchmesser des Trägermaterials und vom hydrodynamischen Radius der Makromoleküle. Somit hängt die Elutionszeit, also die Zeit, die die Moleküle zum Durchlaufen der Säule brauchen, vom hydrodynamischen Radius und daher von der Molmasse der Polymere ab. Als Detektoren werden in der Regel Differentialrefraktometer und UV-Detektoren eingesetzt. Zur Bestimmung der Molmasse mit diesen Detektoren ist, wie in der Chromatographie üblich, eine Kalibration mit Hilfe entsprechender Standards notwendig. Dabei kommen engverteilte Polymerstandards zum Einsatz, deren Molmasse mit Absolutmethoden wie z. B. Lichtstreuung bestimmt worden sind. Die folgende Graphik zeigt die Molmassenverteilung eines P2VP-Monomers und eines P2VP-PEO-Blockcopolymeren^[8].

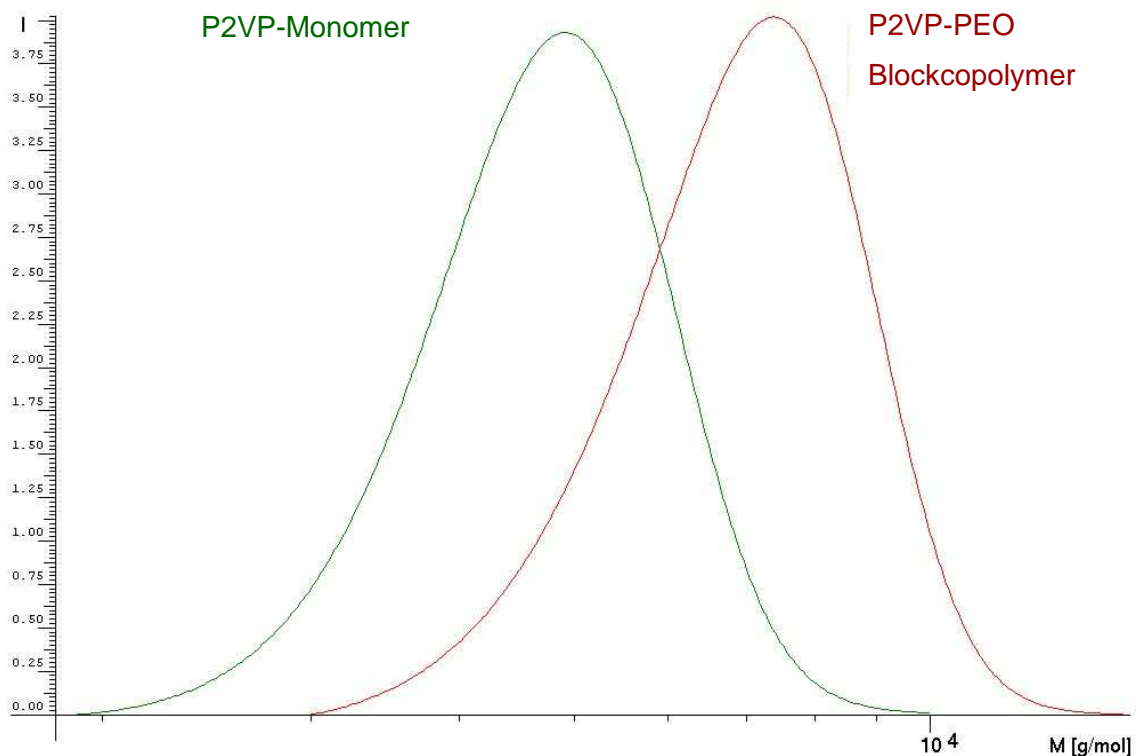


Abbildung 2.5: Molmassenverteilung eines P2VP-Monomers und eines P2VP-PEO Blockcopolymeren ermittelt mittels GPC^[8]

Mit Hilfe der MALDI-TOF (MALDI: matrix assisted laser desorption/ionization, TOF: time-of flight) Massenspektroskopie lassen sich vor allem Molmassen von hochmolekularen Stoffen bestimmen, da die Moleküle im Laufe der Messung nicht zerstört werden. Die verwendete Matrix zeichnet sich durch gute Absorptionseigenschaften im UV-Bereich aus, welche in der Regel durch eine Vielzahl konjugierter Doppelbindungen erreicht wird. Durch Laseranregung kann diese Matrix soviel Energie aufnehmen, dass es im Hochvakuum des Spektrometers zur Verdampfung kommt, wobei die Probenmoleküle mit in die Gasphase übergehen. Durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) und deren Salze (z. B. AgTFA) werden die Probenmoleküle ionisiert und können so in einem angelegten elektrischen Feld beschleunigt werden. Je nach Molmassen bzw. dem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) werden die Ionen der Probe unterschiedlich stark beschleunigt und von einem Flugzeitanalysator detektiert. Abbildung 2.6 zeigt die beteiligten Bauteile des Massenspektrometers.

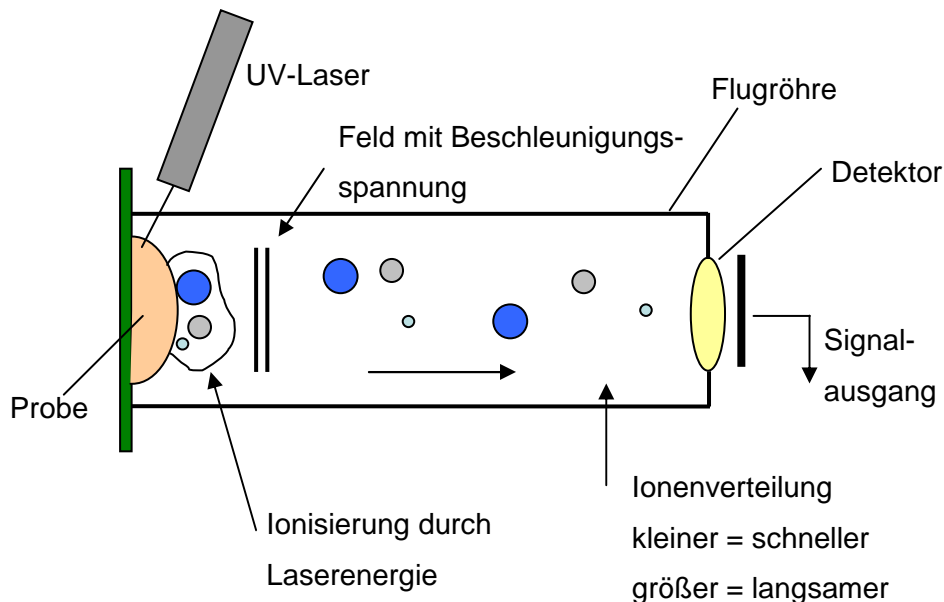


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Vorgänge in einem MALDI-TOF-Spektrometers^[22]

Die Kalibrierung des Detektors für die Korrelation von Flugzeit und Masse wird mit Peptidmischungen bekannter Zusammensetzung durchgeführt, da Peptide monodispers und in allen Molmassenbereichen zugänglich sind. Somit ist nicht die chemische Ähnlichkeit der Kalibriersubstanzen zum Analyten, sondern deren vergleichbare Molmasse entscheidend. Damit ein verwertbares Signal/Rausch-Verhältnis erhalten werden kann, sollten die Polymere nicht zu polydispers sein. Für die Auswertung werden mehrere Einzelspektren aufsummiert, um ein repräsentatives Spektrum zu erhalten. Ferner müssen bei der Beurteilung der Spektren Diskriminierungseffekte berücksichtigt werden. Bei Polymermischungen bzw. auch bei Blockcopolymeren tritt eine Stoffdiskriminierung auf, die in der zum Teil stark unterschiedlichen Wahrscheinlichkeit zur Desorption und Ionisation begründet liegt. So können im Spektrum nicht immer alle in der Probe befindlichen Polymere gefunden werden und eine Aussage über die Polydispersität der Probe ist eher

unzuverlässig. Vorteile der Methode liegen jedoch im geringen Probenbedarf und der hohen Auflösung der Molmasse von einzelnen Polymerketten, die besonders in der Endgruppenbestimmung hilfreich ist^[8]. In Abbildung 2.7 ist das MALDI-TOF-Spektrum von P2VP und P2VP-PEO dargestellt. Die Überlagerung zeigt auch hier deutlich die Verschiebung des Blockcopolymers zu höheren Molmassen im Vergleich zum Homopolymer P2VP.

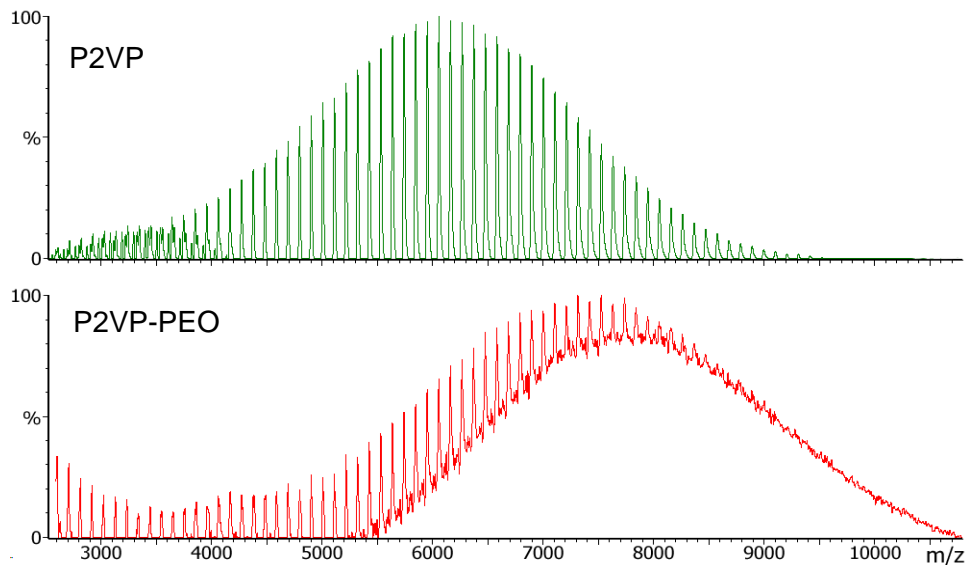


Abbildung 2.7: MALDI-TOF-Spektrum eines P2VP-Monomers und eines P2VP-PEO Blockcopolymers^[8]

Die dritte Charakterisierungsmethode, die NMR, wird in Kapitel 2.3 ausführlich vorgestellt, da sie in dieser Arbeit die Hauptuntersuchungsmethode darstellt. Im Folgenden soll nur zur Vollständigkeit ein NMR-Spektrum von P2VP-PEO wiedergegeben werden.

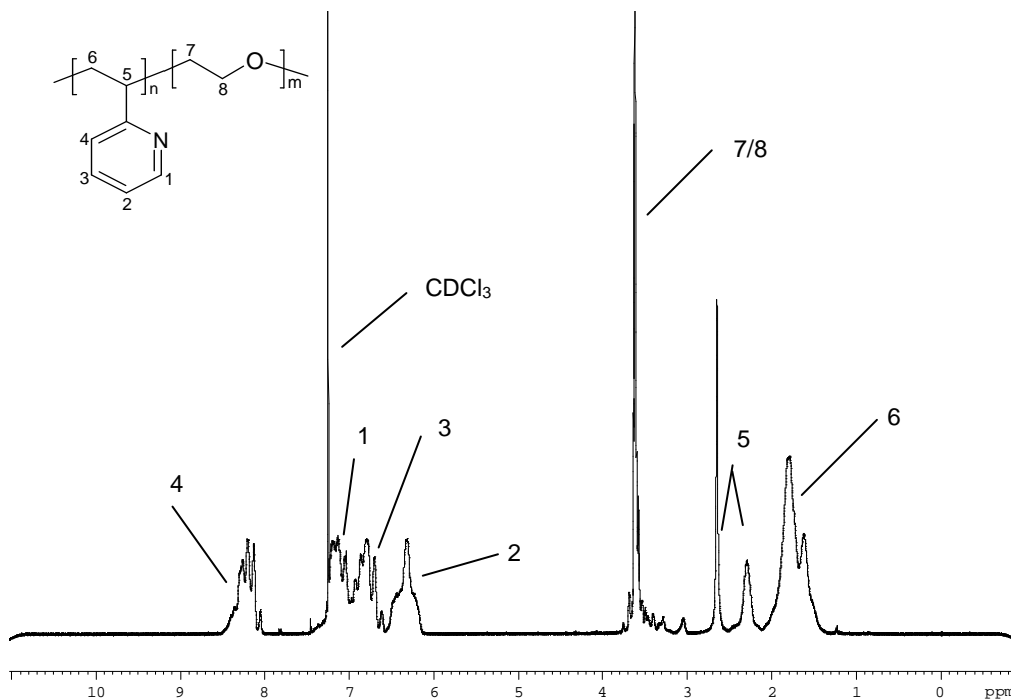


Abbildung 2.8: ¹H-NMR-Spektrum eines P2VP-PEO Blockcopolymers in CDCl₃ bei 500 MHz

2.1.2 Selbstorganisation von Blockcopolymeren

Wie bereits beschrieben, weisen amphiphile Blockcopolymeren in selektiven Lösungsmitteln den Drang zur Selbstorganisation auf^[13]. Dabei entstehen aus den Komponenten durch nichtkovalente Kräfte spontan definierte Strukturen (englisch: self-assembly)^[23].

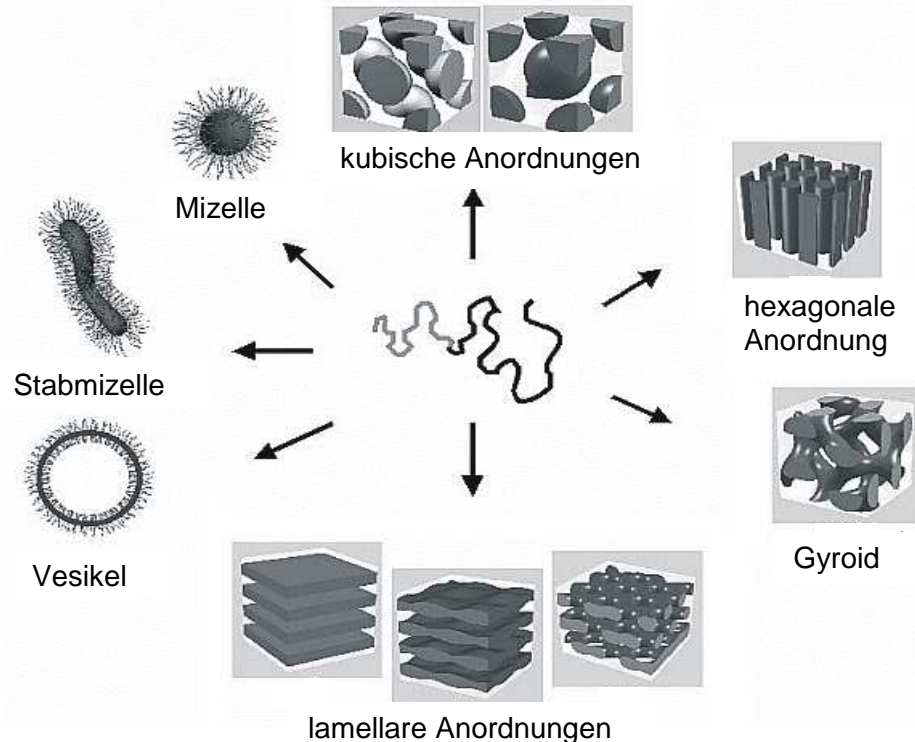


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Überstrukturen von amphiphilen Molekülen^[23]

Das bekannteste Beispiel für diese Art der Anordnung ist die Mizellenbildung von Tensiden in wässriger Lösung. Tenside sind ebenfalls amphiphile Moleküle, die aus einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette und einer hydrophilen Kopfgruppe bestehen. Um energetisch ungünstige Wechselwirkungen der hydrophoben Kette mit Wasser zu umgehen, lagern sich mehrere Tensidmoleküle oberhalb einer kritischen Konzentration spontan zu Mizellen mit definierter Form und Größe zusammen. Israelachvili hat ein Modell für niedermolekulare Tenside entwickelt, welches aus geometrischen Überlegungen eine Vorhersage über die Mizellstruktur erlaubt^[24].

$$P = \frac{V}{a \cdot l_c} \quad [2.3]$$

P = Packungsparameter

V = Volumen eines Tensidmoleküls

a = mittlere Flächenbedarf der Kopfgruppe an der Oberfläche

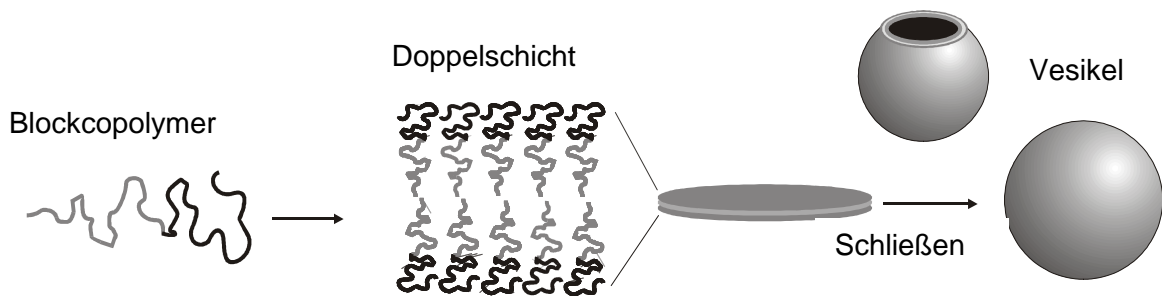
l_c = Konturlänge der hydrophoben Gruppe

Mit Hilfe des so berechneten Packungsparameters ist eine Aussage über die Aggregatstruktur möglich.

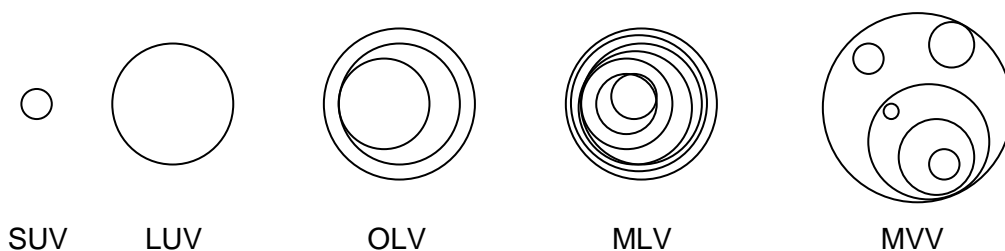
Tabelle 2.1: Abhängigkeit der Struktur vom Packungsparameter ^[25-27]

Packungsparameter P	Molekülgeometrie	Aggregatstruktur
$< \frac{1}{3}$	Kegel	Sphärische Mizellen
$\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$	Stumpfer Kegel	Zylindrische Mizellen
$\frac{1}{2} - 1$	Stumpfer Kegel	Vesikel, gekrümmte Doppelschichten
1	Zylinder	Planare Doppelschichten (Bilayer)

Dieses Model ist auch auf amphiphile Blockcopolymeren übertragbar. So bilden diese bei $P=1/2-1$ Vesikel, bzw. eine hohlkugelartige Struktur, deren Hülle aus einer Doppelschichtanordnung des Amphiphils besteht.

**Abbildung 2.10:** Schematische Darstellung der Vesikelbildung ^[25]

Aus den einzelnen Blockcopolymeren bilden sich zuerst stetig wachsende Doppelschichten. Ab einer bestimmten Größe schließt sich diese Scheibe zu einer Kugel, welche die so genannten Vesikel darstellt. Die Morphologie dieser Vesikel kann sehr stark variieren. Sie werden in der Regel je nach Größe und Form in Klassen wie SUV (small unilamellar vesicles, 20-100 nm), LUV (large unilamellar vesicles, > 100 nm), OLV (oligolamellar vesicles, 0,1-1 μm), MLV (multilamellar large vesicles, > 0,5 μm) oder MVV (multivesicular vesicles, > 1 μm) zusammengefasst. Vesikel aus Blockcopolymeren können auch noch größere Dimensionen annehmen, dann ordnet man sie der Klasse der GUV (giant unilamellar vesicles, > 1 μm) zu ^[1].

**Abbildung 2.11:** Mögliche Morphologien der Vesikel

2.1.3 Darstellung von Vesikeln

Zur Darstellung von Vesikeln existieren verschiedene Verfahren. Man unterteilt diese Methoden in lösungsmittelfreie Darstellungen und Techniken mit organischen Lösungsmitteln. Generell können alle für Liposomen beschriebenen Darstellungsmethoden auch für Vesikel angewendet werden.

Bei der lösungsmittelfreien Darstellung, dem so genannten „film swelling“, welche erstmalig 1969 von Reeves et al. publiziert wurde, wird ein Film des Amphiphilen auf einer festen Oberfläche aufgebracht^[28]. Dazu wird das Blockcopolymer in einem Lösungsmittel gelöst und auf eine Oberfläche, meist Glas^[29-32] oder raues Teflon^[33, 34], aufgetragen. Das Lösungsmittel wird anschließend durch Verdampfen entfernt. Im zweiten Schritt wird ein wässriger Puffer hinzugegeben, welcher eine Hydratation des Polymerfilms zur Folge hat. Der Mechanismus des Aufquellens wird wie folgt beschrieben. Wasser dringt durch Defekte in den Polymerlayer ein. Es entstehen Aufwölbungen, welche sich unter Bildung von Vesikeln von der Oberfläche ablösen^[35]. Bewegung unterstützt diesen Prozess, so dass er durch Rühren oder Schütteln optimiert werden kann.

Eine andere Methode, das so genannte „bulk swelling“, unterscheidet sich von der „film swelling“ Methode nur in dem Punkt, dass das Polymer direkt als Feststoff hydratisiert wird und nicht erst als Film aufgebracht werden muss. Bei dieser Methode ist eine schnelle und lange Bewegung der Probe unabdingbar^[29, 31, 36-38]. Als beste Technik zur Herstellung von GUVs erweist sich die Elektroformation^[34, 36, 39]. Diese Methode ähnelt der „film swelling“ Methode, nur dass der Polymerfilm auf ein Elektrodenpaar aufgebracht wird, das aus Indium-Zinnoxid beschichteten Glassplatten^[40] oder Golddrähten^[41] besteht. Nach Zugabe des Puffers wird ein Strom angelegt, welcher die Hydratation erleichtert. Durch das elektrische Feld wird die Vesikelbildung begünstigt, da die Oberflächenspannung der Membran herabgesetzt wird, und somit mehr Defekte in der Layerstruktur entstehen^[42].

Bei der Darstellung von Vesikeln mit organischen Lösungsmitteln gibt es ebenfalls mehrere Möglichkeiten. Bei einer Darstellung wird das Polymer in einem Lösungsmittel gelöst und anschließend tropfenweise unter starkem Rühren einem Puffer zugeführt^[43]. Dies führt zu einer Dispersion von Vesikeln mit einer breiten Größenverteilung. Diese Polydispersität kann durch mehrfache Extrusion vermindert werden^[44]. Dieses Verfahren wurde in der Arbeitsgruppe Förster optimiert. Zur Zugabe des gelösten Polymers wird ein Standardtintenstrahldrucker benutzt. In die Tintenpatrone wird eine alkoholische Polymerlösung gegeben und mit Hilfe eines Druckauftrags von drei schwarzen Seiten gleichmäßig in Wasser eingespritzt. Abbildung 2.12 zeigt eine schematische Darstellung dieser Methode.

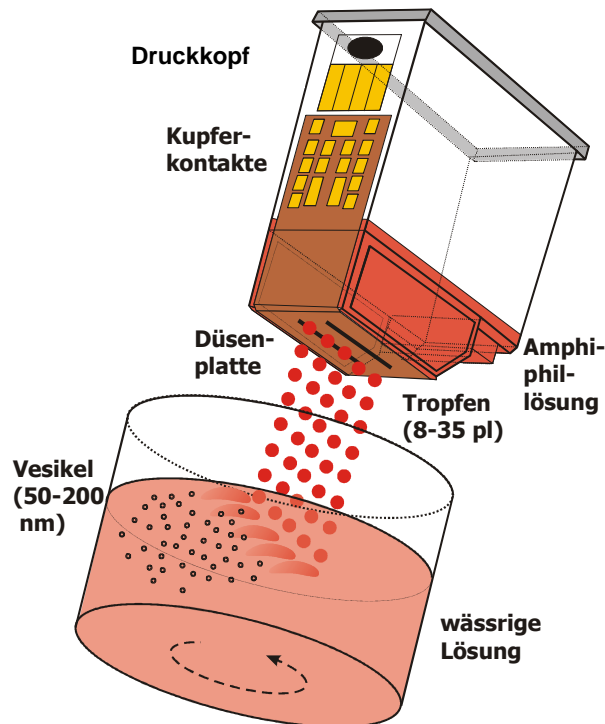


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der „Tintenstrahldrucker“-Methode^[45]

Charakterisierungen der entstehenden Vesikel zeigen, dass diese eine mittlere Größe von 100 nm mit einer Polydispersität PD_2 von unter 0,2 aufweisen^[45, 46].

$$PD_2 = \frac{M_n}{M_w} \quad [2.4]$$

Bei einer anderen Darstellungsmöglichkeit der „reverse-phase evaporation“, auch Chloroform-Methode genannt, wird das Polymer in Chloroform oder anderen organischen Lösungsmitteln gelöst und mit einer wässrigen Phase vermischt. Das Zweiphasensystem wird solange gerührt oder mit Ultraschall behandelt, bis ein Einphasensystem entsteht. Durch den hohen Dampfdruck des Chloroforms bei Raumtemperatur verdampft es langsam aus dem System, so dass das Polymer in der wässrigen Phase zurück bleibt. Es entstehen große, polydisperse Vesikel, die durch weitere Behandlung wie Extrusion, Dialyse oder Ultraschall verkleinert werden können^[43, 47].

Eine weitere Methode, welche nicht für alle Blockcopolymeren anwendbar ist, ist die so genannte „pH-Methode“. Diese Methode wird bei Polymeren wie Poly(2-vinylpyridin-*block*-ethylenoxid) angewendet, da hier durch Protonierung des Stickstoffatoms die hydrophoben Eigenschaften des Blockes in hydrophile Eigenschaften umgewandelt werden. Das feste Polymer löst sich sehr gut in Säure; durch langsames steigern des pH-Wertes werden die Pyridinylgruppen deprotoniert und erhalten somit wieder hydrophobe Eigenschaften. Als Konsequenz bilden sich Vesikel aus dem nun amphiphilen Blockcopolymer. Über diese Methode hergestellten Vesikel sind in der Regel kleiner als Vesikel, die über die „bulk swelling“- oder die Chloroform-Methode hergestellt werden^[48].

2.1.4 Charakterisierung von Vesikeln

Zur Charakterisierung von Vesikeln haben sich einige Methoden etabliert. Als Standardmethode zur Bestimmung der Radien und der Polydispersitäten von Vesikeldispersionen kristallisieren sich die so genannten „scattering“ Methoden heraus. Man unterscheidet dabei die dynamische Lichtstreuung (englisch: DLS: dynamic light scattering) und die statische Lichtstreuung (englisch: SLS: static light scattering). Es soll im Folgenden nur kurz das Prinzip dieser Methoden erklärt werden. Weiterführende Informationen dazu können der Literatur entnommen werden^[49-53].

Bei diesen Charakterisierungsmethoden wird monochromatische Strahlung ausgehend von einer Strahlungsquelle durch ein Kollimationssystem geleitet und auf die Vesikelprobe gerichtet. Der Großteil der Strahlung tritt unverändert aus der Probe aus und wird von einem Primärstrahlfänger aufgenommen. Die wesentlich schwächere Streustrahlung wird von einem Detektor registriert. Dieser kann beweglich sein, um bei verschiedenen Streuwinkeln zu messen (z. B. SLS). Mit Hilfe einiger Annahmen, wie z. B. einer unendlichen Verdünnung und der Brownschen Molekularbewegung^[54], kann über die Stokes-Einstein-Beziehung^[55] der mittlere Radius der Vesikel bestimmt werden.

Die Brownsche Molekularbewegung wurde erstmalig 1828 von dem englischen Botaniker Brown beobachtet. Dabei handelt es sich um eine eigentümliche Zitterbewegung von mikroskopisch kleinen, in Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, welche man zuerst als Lebendigkeit der Teilchen deutete^[54].

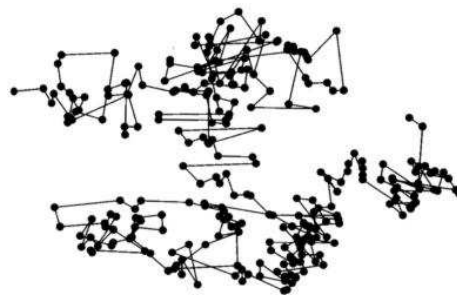


Abbildung 2.13: Zweidimensionales Schema der Brownschen Molekularbewegung eines Teilchens in Wasser

Später interpretierte Einstein dieses Verhalten als eine durch Wärme verursachte Bewegung im molekularen Bereich. Daraus entwickelte er 1905 die molekularkinetische Theorie der Wärme und stellte folgende Gleichung auf, die die Abhängigkeit der Bewegungen der Teilchen von der Temperatur, Viskosität und ihrer Größe darstellt:^[55]

$$R_H = \frac{R \cdot T \cdot \Delta}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot S^2} \quad [2.5]$$

R_H = hydrodynamischer Teilchenradius, η = Viskosität des Mediums, N_A = Avogadro-Konstante,
 Δ = Diffusionszeit, S = gemessene räumliche Verschiebung der Teilchen, welche sie in der Zeit Δ erfahren,
 T = Temperatur, R = allgemeine Gaskonstante.

Zusammen mit der aus dem ersten Fick'schen Gesetz hergeleiteten Einstein-Smoluchowski-

Beziehung $D = \frac{\overline{S^2}}{2 \cdot \Delta}$ ergibt sich für den hydrodynamischen Radius die so genannte Stokes-

Einstein-Beziehung.

$$R_H = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot D} \quad [2.6]$$

D = Diffusionskoeffizient

Ebenfalls auf dem Prinzip dieser Brownschen Molekularbewegung beruht die im Arbeitskreis Mayer entstandene „dynamic nanosizing microscopy“ (DNM)^[56-58]. Dieser Methode liegt die Dunkelfeldmikroskopie zugrunde, welche zu den Methoden der Kontrastmikroskopie gehört. Sie vergrößert den Intensitätsunterschied zwischen dem Licht des beobachteten Objekts und dem Licht der Umgebung. Dabei sieht der Betrachter ein dunkles Umfeld und helle Objekte. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wird die Bewegung dieser hellen Objekte, im vorliegenden Fall die zu charakterisierenden Vesikel, in einem definierten Zeitintervall beobachtet und anschließend mit Hilfe einer entsprechenden Software die räumliche Verschiebung der Vesikel pro Zeitintervall berechnet.

Im Idealfall entsteht eine Gaußsche Verteilung der hydrodynamischen Radien der untersuchten Vesikel, welche entsprechend ausgewertet werden können. Vorteil dieser direkten Methode ist, dass mehrere Vesikelgrößen in einer Probe simultan bestimmt werden können.

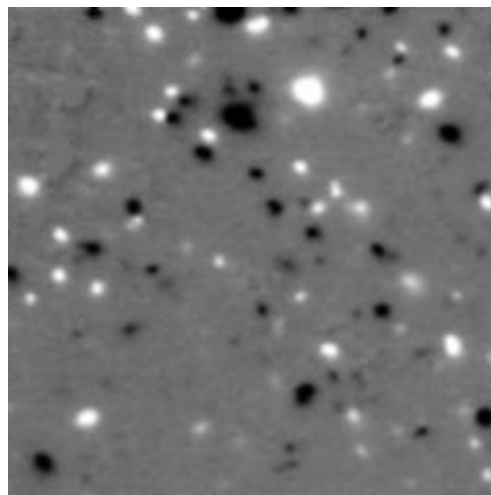


Abbildung 2.14: Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer Vesikeldispersion aus P2VP-PEO nach erfolgter Bildbearbeitung (38,1 μm Seitenlänge im Original)

Es gibt auch weitere optische Methoden, mit deren Hilfe Vesikel charakterisiert werden können. Große Vesikel (ca. 1 μm) können mit Hilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie noch aufgelöst werden (siehe Abbildung 2.15).

Dieses Verfahren nutzt Unterschiede im Lichtbrechungsindex und der Dicke der Objekte zur Erzeugung eines Hell-Dunkel-Kontrasts aus, und zwar ohne die Beleuchtungsapertur und damit das Auflösungsvermögen des Mikroskops wesentlich zu verringern. In einem Medium mit verschiedenen Lichtbrechungsindizes breitet sich Licht mit verschiedener Geschwindigkeit aus, so dass sich beim Durchlaufen eines Objekts, das optisch dichter ist als seine Umgebung, ein Phasenunterschied gegenüber dem Licht der Umgebung ergibt. Mittels eines in der hinteren Brennebene des Objektivs befindlichen optisch dichten Elements wird die Phasenlage des Hintergrundlichts so weit verschoben, dass das Hintergrundlicht bei Interferenz mit dem Objektlicht dieses möglichst weitgehend schwächt. Dadurch erscheint nun das abgedunkelte Objekt vor hellem Hintergrund, was als positiver Phasenkontrast bezeichnet wird. Die Möglichkeit zur Beeinflussung des Hintergrundlichts unabhängig vom Objektlicht wird dadurch erzielt, dass die Aperturblende der Objektbeleuchtung ringförmig ist. Es wird ein Bild dieser Kondensorblende in der hinteren Brennebene des Objektivs erzeugt, wo sich der Phasenring befindet. Als Voraussetzung für das Verfahren gilt daher die Köhlersche Beleuchtung, bei der das Hintergrundlicht parallel den Kondensator verlässt und, soweit es durch das Objekt nicht beeinflusst wird, auch parallel in das Objektiv eintritt.

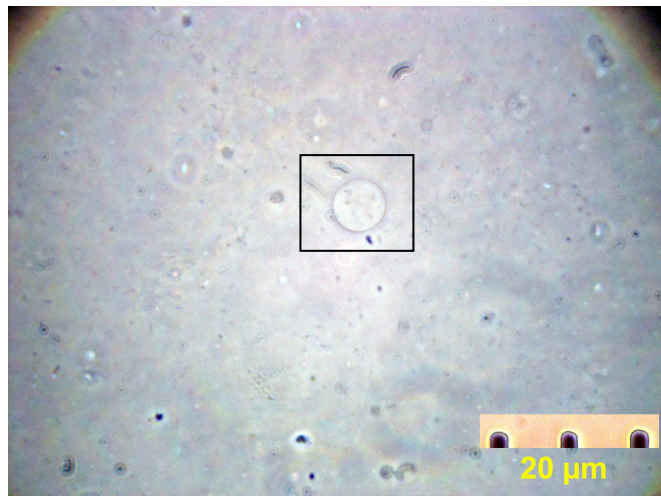


Abbildung 2.15: Phasenkontrastaufnahme einer Vesikeldispersion aus P2VP-PEO ^[59]

Diese beiden beschriebenen mikroskopischen Methoden haben den Vorteil, dass sie die Vesikel unter „physiologischen“ Bedingungen zeigen. Es ist nicht nötig die Proben zu trocknen oder einzufärben. Es besteht aber auch die Möglichkeit, die Strukturen der Polymere mit Hilfe kontraststeigernder Mittel sichtbar zu machen. Dies können beispielsweise Farbstoffe sein, die chemisch an die Blockcopolymere gebunden sind („fluorescence-labeling“) oder auch in die Vesikel eingekapselt werden.

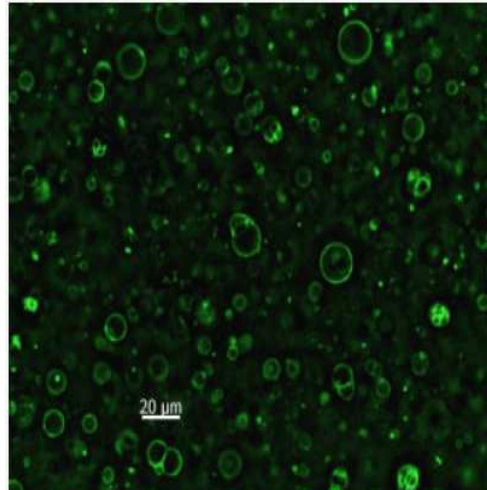


Abbildung 2.16: Fluoresceinmarkierte Vesikel aus P2VP-PEO^[8]

Als aufschlussreichste Methode muss an dieser Stelle noch die Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) erwähnt werden. Der Aufbau des Elektronenmikroskops ist dem des Lichtmikroskops prinzipiell analog. Beide verfügen über eine Lichtbeziehungsweise Elektronenquelle, einen Kondensator, ein Objektiv und ein Projektiv, um das Bild des Objektes in die Bildebene zu übertragen. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass das Elektronenmikroskop nicht über Glaslinsen, sondern über magnetische Linsen verfügt, die den Elektronenstrahl fokussieren. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass es aufgrund der kleinen Wellenlänge der Elektronen möglich ist, wesentlich größere Auflösungen zu erzielen. Der Nachteil ist, dass flüssige Proben für die Präparation eingefroren werden müssen. Mit Hilfe dieser Methode ist es zum einen möglich die Größe der Vesikel zu bestimmen, zum anderen kann auf diese Weise auch die Bilayerdicke der Vesikelmembran gemessen werden.

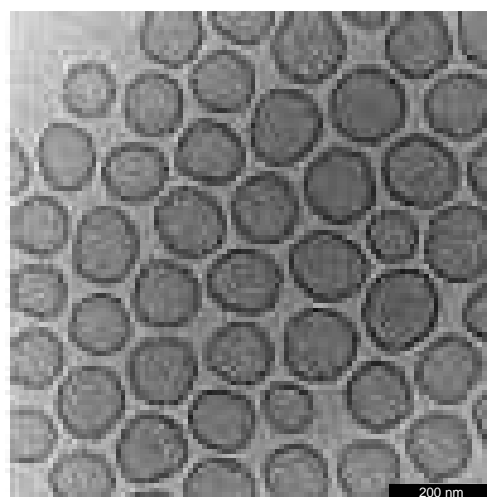


Abbildung 2.17: Cryo-TEM Aufnahme von Vesikeln aus P2VP-PEO

2.2 Weitere Wirkstoffträgersysteme

Schon im sechzehnten Jahrhundert sagte der Arzt und Theologe Paracelsus: „Dosis facit venenum – Die Menge macht das Gift“. Daher hatte Paul Ehrlich bereits Anfang des 20. Jahrhunderts die Idee, Medikamente gezielt an ihren Wirkort zu transportieren. Heutzutage werden immer neue so genannte „drug-targeting“-Systeme oder auch „magic bullets“ entwickelt, um eben dieses zu verwirklichen. Diese Trägersysteme umschließen den Wirkstoff und tragen ihn so geschützt zum Zielgewebe, wo der Wirkstoff freigesetzt wird, ohne im restlichen Körper schädliche Nebenwirkungen zu erzeugen. Dieser Wirkstofftransport stellt eine Teildisziplin der Arzneimittelverabreichung dar, für die sich die englische Bezeichnung „drug-delivery“ eingebürgert hat.

Der Bedarf an diesen Systemen wird immer größer, da sich mit ihnen prinzipiell eine ganze Reihe von Problemen überwinden lassen, die bei der Applikation vieler Wirkstoffe auftreten:

- Der Wirkstoff ist in wässrigen Medien unlöslich.
- Der Wirkstoff reichert sich nicht hinreichend im Zielgewebe an, wohl aber in anderen Gewebearten und führt so zu starken Nebenwirkungen.
- Viele Wirkstoffe sind chemisch labil und werden zersetzt, bevor sie das Zielgewebe erreicht haben.
- Biologische Barrieren, wie z. B. Zellmembranen oder die Blut-Hirn-Schranke, können vom Wirkstoff nicht überwunden werden, so dass der Ort der Wirkung unerreichbar bleibt.

Derzeit gibt es viele Wirkstoffe, die trotz ihres hohen pharmakologischen Potenzials aufgrund der aufgezählten Probleme das Zielgewebe entweder gar nicht oder nur zu einem Bruchteil der verabreichten Menge erreichen und somit als Medikamente nicht zum Einsatz kommen können. Die „intelligenten“ „drug-delivery“-Systeme, nach denen heute geforscht wird, sollen daher den Wirkstoff während des Transports zum Zielgewebe vor dessen Zersetzung schützen, sich passiv oder aktiv im Zielgewebe anreichern („drug targeting“) und die Freigabe des Wirkstoffes mit einem kontrollierten Zeit-Dosis-Profil ermöglichen („controlled release“)^[60]. Es gibt eine Vielzahl von Trägersystemen, deren Eignung für „drug-delivery“-Anwendungen derzeit untersucht wird, wie z. B. Liposomen, Polymer-Nanopartikel, feste Lipid-Nanopartikel, Dendrimere und anorganische Nanopartikel. An dieser Stelle soll eine Auswahl von Systemen beschrieben werden, die in der Literatur in den letzten Jahren besonders intensiv diskutiert wurden^[60, 61].

Tabelle 2.2: Übersicht über aktuelle Wirkstoffträgersysteme^[60]

Delivery System	Merkmale
Liposomen	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Bioakzeptanz aufgrund der natürlichen Komponenten (Phospholipide) • Liposomen-Produkte sind bereits auf dem Markt • Hoher Preis pharmazeutisch nutzbarer Liposomen • Geringe Lagerstabilität
Polymer-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Für eine Vielzahl von Wirkstoffklassen einsetzbar • Überwindung der Blut-Hirn-Schranke • Mangel an geeigneten kostengünstigen industriellen Produktionsmethoden • Zytotoxizität der Zersetzungsprodukte vieler der bislang verwendeten Polymere
Wirkstoff-Nanokristalle	<ul style="list-style-type: none"> • 100% Wirkstoff → keine toxischen Polymer-Abbauprodukte • Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bei geeigneter Beschichtung möglich • Erste Produkte bereits auf dem Markt
Feste Lipid-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Bioakzeptanz physiologischer Lipide • Kostengünstige industrielle Herstellungsverfahren
Polymer-Protein-Konjugate	<ul style="list-style-type: none"> • Erste Produkte bereits auf dem Markt • Nur für Proteine anwendbar
Polymer-Wirkstoff-Konjugate	<ul style="list-style-type: none"> • Dreifachfunktion möglich: „drug-delivery“, Bildgebung, aktive Zielfindung • Geringe Wirkstoff-Beladungskapazität
Dendrimere	<ul style="list-style-type: none"> • Können mit einheitlicher Molekülmasse synthetisiert werden • Beladungskapazität bis zu 25 Gew% • Vielseitiges „delivery“-System, da Wirkstoff, Zielfindungsmolekül und bildgebende Gruppen an die Dendrimere gekoppelt werden können • Dendrimere wandern vergleichsweise schnell wieder aus dem Tumorgewebe heraus
Fullerene	<ul style="list-style-type: none"> • Haben das Potenzial, Grundbausteine für eine neuartige Klasse von Wirkstoffen zu werden • Räumliche Konfiguration der funktionellen Gruppen kann vorgegeben werden

Gold-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Gute Biokompatibilität von Gold • Geringe Forschungsintensität
Magnetische Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Anreicherung über magnetische Felder im Zielgewebe • Einsatz in der Hyperthermie • Möglichkeit der kontrollierten Freigabe des Wirkstoffs
Calciumphosphat-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Hilfsstoff für Impfstoffe und „delivery“ von Proteinen • Entwicklung bereits relativ weit fortgeschritten
Silikat-Nanopartikel	<ul style="list-style-type: none"> • „DNA-delivery“ • Geringe Forschungsintensität

Im Folgenden soll zur Veranschaulichung ein Größenvergleich der vorgestellten Systeme gezeigt werden.

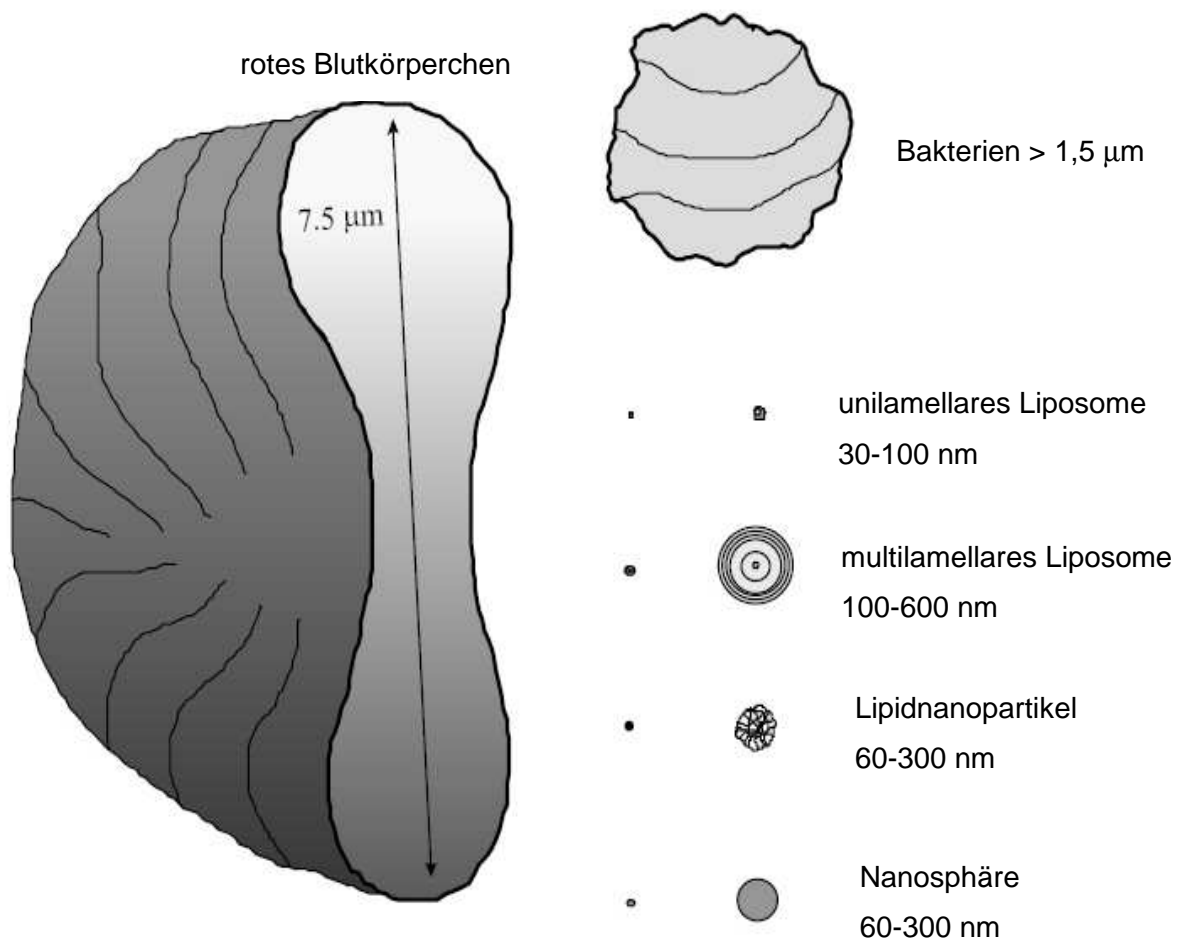


Abbildung 2.18: Größe einiger „drug-delivery“-Systeme mit charakteristischen, durchschnittlichen Durchmessern im Vergleich zu einem roten Blutkörperchen und eines Bakteriums. Dabei ist zu beachten, dass rote Blutkörperchen gerade durch die kleinsten Blutgefäße im Körper wandern können^[62].

In den beiden folgenden Unterkapiteln werden noch einmal zwei wichtige Gruppen der Wirkstoffträgersysteme genauer beschrieben.

2.2.1 Liposomen^[60]

Liposomen bestehen aus Phospholipid-Doppelschichten, welche sich in wässriger Lösung spontan aus amphiphilen Phospholipidmolekülen zusammenlagern (siehe Abbildung 2.19). Bei dieser kugelförmigen Doppelschicht stehen die hydrophilen Enden in Kontakt mit Wasser und die hydrophoben Enden zeigen von beiden Seiten zur Schichtmitte.

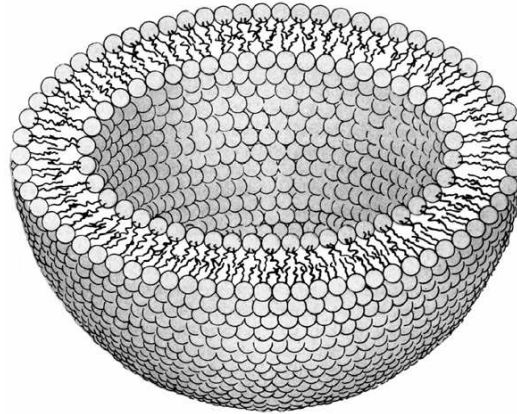


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung eines Liposoms

Man unterscheidet zwei Arten von Liposomen. Zum einen Liposomen, die aus nur einer Lamelle bestehen (Durchmesser ca. 20 nm bis 50 nm) und zum anderen multilamellaren Liposomen, deren Durchmesser bis zu 10 μm betragen kann. Seit ihrer Entdeckung Mitte der 60er Jahre werden Liposomen von vielen Arbeitsgruppen auf ihre Eignung als „drug-delivery“-Systeme hin untersucht. Sie weisen dabei ein besonders breites Anwendungsspektrum auf, da es mehrere Möglichkeiten gibt, Wirkstoffmoleküle zu transportieren: Hydrophile Moleküle können im wässrigen Innenraum eingeschlossen, ionische Moleküle an die Membranen adsorbiert und lipophile Moleküle in den inneren Membranbereich eingelagert werden.

Durch die Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl und der Größe der Liposomen kann der Beladungsgrad mit Wirkstoffen variiert und die Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden^[2]. Für hydrophile Wirkstoffe stellen die Membranen eine Permeationsbarriere dar, so dass vor allem bei multilamellaren Liposomen eine verlangsamte Wirkstoffabgabe erreicht wird und sich damit ein Depoteffekt ergibt. Durch ihre natürlichen Grundbausteine (Phospholipide) besitzen Liposomen eine hohe Bioakzeptanz. Ihre Verabreichung erfolgt bevorzugt intravenös; auch eine orale Gabe ist möglich, jedoch erfordert sie eine Modifizierung der Lipidschicht, um sie vor der Zerstörung im Magen-Darm-Trakt zu schützen. Es wurde bereits früh untersucht, ob Liposomen als „drug-delivery“-Systeme für Krebstherapeutika einsetzbar sind. Es stellte sich jedoch heraus, dass Liposomen vom Immunsystem innerhalb weniger Minuten als körperfremd erkannt, opsonisiert (Anlagerung von bestimmten Proteinen) und durch die Makrophagen in Leber und Milz aus dem Blutstrom eliminiert werden.

In den späten 80er Jahren konnte jedoch eine Lösung für dieses Problem gefunden werden. So gelang es, die Liposomenoberfläche mit sperrigen und wasserlöslichen Liganden, wie z. B. Polyethylenoxid (PEO), zu versehen, die eine Opsonisierung und damit die Aufnahme durch die Makrophagen stark verringern („stealth effect“)^[63]. Somit lässt sich die Halbwertszeit der Blutverweildauer auf bis zu 20 Stunden erhöhen. Werden Liposomen als „drug-delivery“-Systeme für Tumorthapeutika eingesetzt, so nutzt man meistens das so genannte passive „tumor-targeting“ aus. Dieses Prinzip beruht darauf, dass sich Partikel aufgrund der hier erhöhten Permeabilität der Blutgefäße und der vergrößerten Zellzwischenräume von selbst im Tumorgewebe anreichern (Abbildung 2.20).

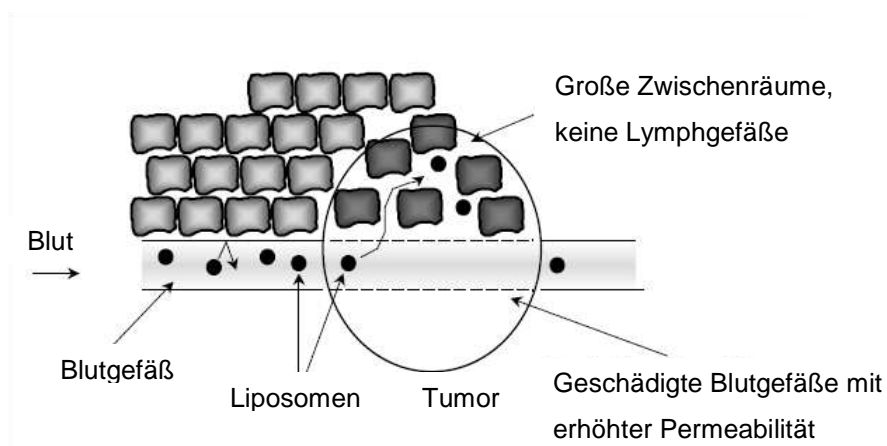


Abbildung 2.20: Anreicherung von Liposomen in einem Tumor aufgrund der erhöhten Permeabilität der Blutgefäße im Tumorgewebe^[64]

Die Freigabe des Wirkstoffs aus den Liposomen kann nach mehreren Mechanismen erfolgen. Eine langsame Abgabe von wasserlöslichen Wirkstoffen erfolgt durch deren Diffusion durch die Lipidmembran. Durch die Wahl geeigneter Lipide oder zusätzlicher Hüllenbestandteile (z. B. Transportproteine) können die Liposomen in Abhängigkeit von einem äußeren Reiz, z. B. pH-Wert, Temperatur, Enzymeinwirkung oder einem elektrischen Feld, „durchlässig“ werden und so den Wirkstoff an das Zielgewebe abgeben.

Obwohl die Liposomen zu den am besten untersuchten „drug-delivery“-Systemen gehören, ist die Anzahl der liposomalen Arzneimittel auf dem Markt immer noch gering. Grund hierfür sind eine Reihe von technischen Problemen, wie die geringe Lagerstabilität für die meisten liposomalen Formulierungen und der hohe Preis pharmazeutisch nutzbarer Liposomen. Die geringe Lagerstabilität der liposomalen Arzneimittel ist durch die langsame Diffusion der wasserlöslichen Wirkstoffe durch die Lipidmembran bedingt. Um dieses Problem, das bei den meisten Tumorthapeutika auftritt, zu überwinden, können die Wirkstoffe in so genannte vesikuläre Phospholipid-Gele (VPG) eingeschlossen werden. VPGs bestehen aus einer Matrix von sehr dicht gepackten Liposomen. Die Konzentration eines Wirkstoffs, der in ein VPG eingebracht wird, ist in den Liposomen als auch in der flüssigen Phase zwischen den Liposomen gleich groß. Da kein Konzentrationsgradient entlang der Liposomen-

membran besteht, ändert sich die Konzentration des Wirkstoffs in den Liposomen auch bei langen Lagerzeiten nicht. Vesikuläre Phospholipid-Gele können auf zwei unterschiedlichen Wegen angewandt werden:

- Sie werden direkt in den Tumor „implantiert“ und stellen so ein Wirkstoffdepot dar,
- Sie werden redispersiert und eine Mischung aus freiem und verkapseltem Wirkstoff wird verabreicht^[64].

2.2.2 Polymer-Nanopartikel^[60]

Anfang der 70er Jahre wurde erstmals versucht, Polymer-Nanopartikel als „drug-delivery“-Systeme einzusetzen, wobei ursprünglich der Transport von Impfstoffen und Antitumormedikamenten im Vordergrund stand^[65, 66]. Als Grundmaterialien für die Polymer-Nanopartikel können verschiedene natürliche oder bioverträgliche synthetische Polymere, wie z. B. Polysaccharide, Polymilchsäure, Polylaktide, Polyacrylate, Polyalkylcyanoacrylate, Polyalkylvinylpyrrolidone oder Acrylpolymere, verwendet werden. Wie bei den Liposomen, hat sich auch bei den Polymer-Nanopartikeln herausgestellt, dass sie bei intravenöser Verabreichung innerhalb kurzer Zeit von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Dieser Effekt führt zu einer starken Einschränkung der Anwendbarkeit der Polymer-Nanopartikel als „drug-delivery“-Systeme, wenn eine gezielte Anreicherung des verkapselten Medikamentes in einem bestimmten Organ erfolgen soll. Die aktuelle Forschung auf diesem Gebiet konzentriert sich daher darauf, das Problem der Phagozytose zu überwinden, indem die Polymer-Nanopartikel mit geeigneten Molekülen beschichtet werden. Versuche mit Polymeren, die Ethoxygruppen enthalten, sind vielversprechend: Die Aufnahme der Partikel durch Makrophagen konnte signifikant reduziert und die Verweilzeit der Polymer-Nanopartikel in der Blutbahn erhöht werden^[63].

Die ersten „drug-delivery“-Systeme aus Polymer-Nanopartikeln sind vor etwa 25 Jahren entwickelt worden, um die Probleme der Liposomensysteme, wie das nicht optimale Wirkstoffaustauschverhalten und die geringe Lagerstabilität, zu überwinden. Auch wenn in den letzten Jahren viele Fortschritte auf dem Gebiet der Polymer-Nanopartikel gemacht wurden, was die Herstellung und die Oberflächenbeschichtung betrifft, so befindet sich im Gegensatz zu den Liposomen derzeit noch kein Medikament auf dem Markt, das Polymer-Nanopartikel als „drug-delivery“-System nutzt. Die Hauptgründe hierfür sind der Mangel an geeigneten kostengünstigen industriellen Produktionsmethoden und die Zytotoxizität vieler der bislang verwendeten Polymere bzw. ihrer Abbauprodukte. Derzeit werden Polymer-Nanopartikel für den Einsatz in der Tumor- und AIDS-Therapie, für die Applikation von Antibiotika und zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke entwickelt. Der Begriff Polymer-Nanopartikel umfasst zwei morphologisch verschiedene Partikeltypen, die Nanosphären und die Nanokapseln.

Nanosphären bilden eine durchgehende Polymermatrix, über die der Wirkstoff verteilt vorliegt. Nanokapseln bestehen hingegen aus einer Polymerhülle, die einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum umschließt. Die beiden Typen unterscheiden sich im Wirkstofffreisetzungprofil. Während bei Nanosphären die Freisetzung des Wirkstoffs mit der Zeit exponentiell abfällt, ist sie bei der Nanokapsel über einen längeren Zeitraum nahezu konstant^[67].

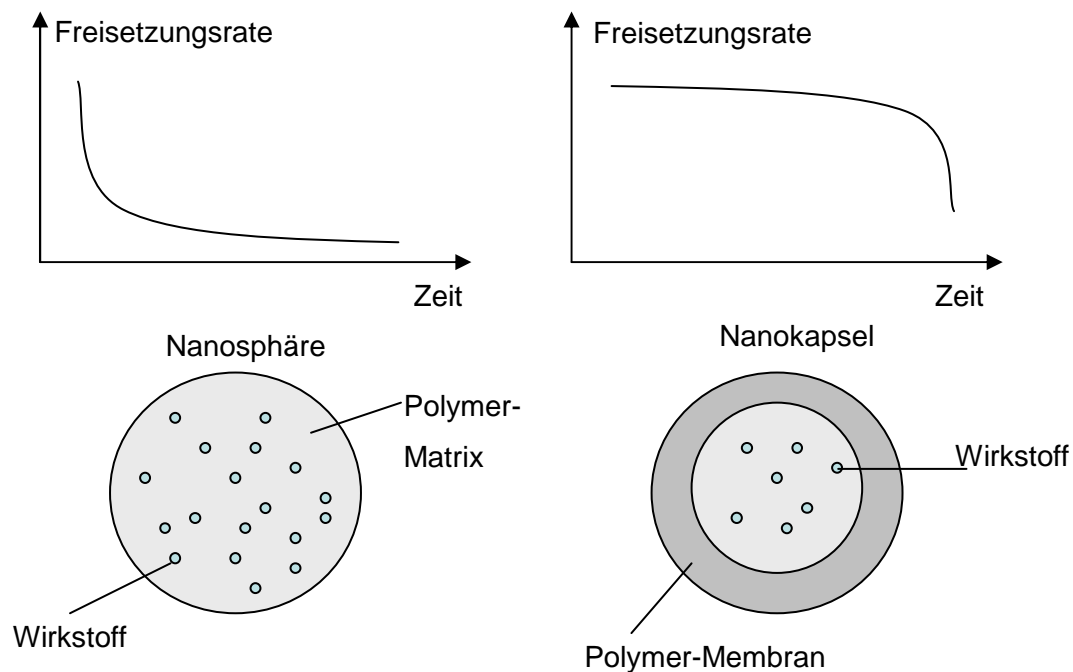


Abbildung 2.21: Wirkstoff-Freisetzungprofil nach Kreuter im Vergleich zwischen Nanosphären und Nanokapseln bei einem diffusionsgesteuerten Prozess.

Im Folgenden soll kurz auf die Herstellung der beiden Partikeltypen eingegangen werden.

Nanosphären

Die ersten Nanosphären wurden aus Polyacrylamid (Birrenbach und Speiser)^[68] und Polyalkylmethacrylaten (Kreuter und Speiser)^[69] Mitte der 70er Jahre hergestellt. Aufgrund der Reaktionsbedingungen und der verwendeten Lösungsmittel waren die Polymerisationsverfahren jedoch nicht für die Verkapselung von empfindlichen Pharmazeutika geeignet. Zudem sind weder Polyacrylamide noch Polyalkylmethacrylate bioabbaubar, was zu Entzündungen des Gewebes führen kann. Ende der 70er Jahre wurde dann von Couvreur ein Verfahren entwickelt, mit dem sich Nanosphären aus Polyalkylcyanoacrylaten (PACA) herstellen ließen^[70, 71]. Polyalkylcyanoacrylate sind biologisch abbaubar und der Polymerisationsprozess läuft unter moderaten Bedingungen ab. Sie schließen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe mit guter Effizienz ein. Bisher wurden diese Partikeltypen vor allem auf ihre Eignung als „drug-delivery“-Systeme für Zytostatika und Antibiotika untersucht^[72].

Nanokapseln

Mitte der 80er Jahre wurden von Al Khouri-Fallouh et al. die ersten Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln in einer Grenzflächenpolymerisation präpariert^[73]. Bei der Herstellung wird das Alkylcyanoacrylat-Monomer in einer wasserfreien, das Öl enthaltende Ethanol-Phase gelöst. Diese organische Phase wird dann in einer wässrigen Tensidlösung dispergiert. Bei Kontakt mit der wässrigen Phase bildet sich eine Öl-in-Wasser-Emulsion. An der Grenzfläche beider Phasen reagiert das amphiphile Monomer in einer anionischen Polymerisation und bildet eine den Ölkern umschließende Membran. Lipophile Wirkstoffe, die in dem Öl der organischen Phase gelöst sind, werden bei der Polymerisation in die Kapseln eingelagert. Die Tensidmoleküle der wässrigen Phase werden zum Teil auf der Partikeloberfläche adsorbiert und führen damit zu einer sterischen Stabilisierung, die eine Clusterung der Partikel verhindert. Für die sterische Stabilisierung können auch Blockcopolymere verwendet werden, die über einen zentralen, relativ hydrophoben Teil und einen terminalen, hydrophilen Kettenteil verfügen, wobei die Adsorption auf der Partikeloberfläche über den hydrophoben Molekülteil erfolgt.

2.3 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie^[74]

2.3.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

1946 gelang den beiden Arbeitsgruppen um F. Bloch und M. E. Packard unabhängig voneinander der erste Nachweis von Kernresonanz-Signalen. Für diese Entdeckung bekamen die beiden gemeinsam den Nobelpreis für Physik im Jahre 1952. Seither ist die NMR-Spektroskopie (englisch: NMR: nuclear magnetic resonance) für Naturwissenschaftler unabdingbar. Die Grundlage dieses Verfahrens liegt im magnetischen Moment μ und damit im gequantelten Drehimpuls P von Atomkernen. Nach quantenmechanischen Rechnungen ist P gegeben als:

$$P = \sqrt{l(l+1)} \cdot \hbar \qquad \hbar = \frac{h}{2\pi} \qquad [2.7]$$

h = Plancksches Wirkungsquantum

l = Kernspin

Diesem Kerndrehimpuls ist das magnetische Moment μ proportional.

$$\mu = \gamma \cdot P \qquad [2.8]$$

Die Proportionalitätskonstante stellt γ , das gyromagnetische Verhältnis dar.

Zusammengefasst ergibt sich:

$$\mu = \gamma \cdot \sqrt{l(l+1)} \cdot \hbar \qquad [2.9]$$

Daraus folgt, dass Kerne mit dem Kernspin $I = 0$ kein magnetisches Moment besitzen und somit in der NMR-Spektroskopie nicht sichtbar sind. Bringt man nun einen Kern mit dem Drehimpuls P und dem magnetischen Moment μ in ein statisches Magnetfeld B_0 , dann präzidieren die Kerne wie ein Kreisel um die Richtung des Magnetfeldes. Die Frequenz dieser Präzessionsbewegung wird als Larmor-Frequenz ω_0 bezeichnet und ist direkt proportional zur Stärke des angelegten Magnetfeldes $\omega_0 = \gamma \cdot B_0$.

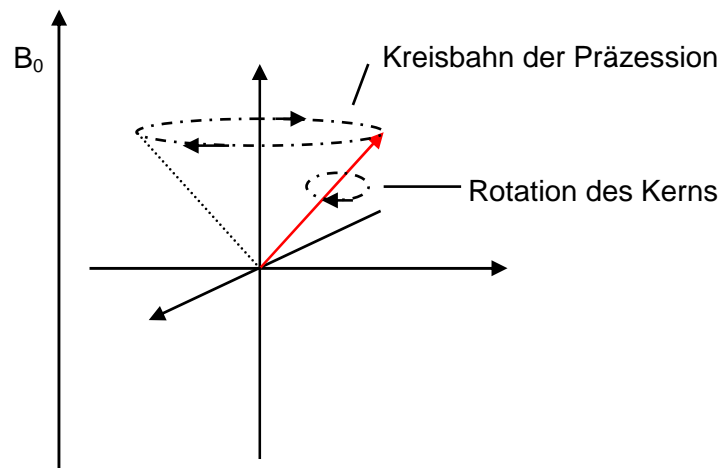


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung der Präzessionsbewegung der Kerne im Magnetfeld B_0 ^[75]

Außerdem orientiert sich P so, dass P_z ein halb- oder ganzzahliges Vielfaches von \hbar ist.

$$P_z = m \cdot \hbar \quad [2.10]$$

In diesem Zusammenhang spricht man auch von Richtungsquantelung.

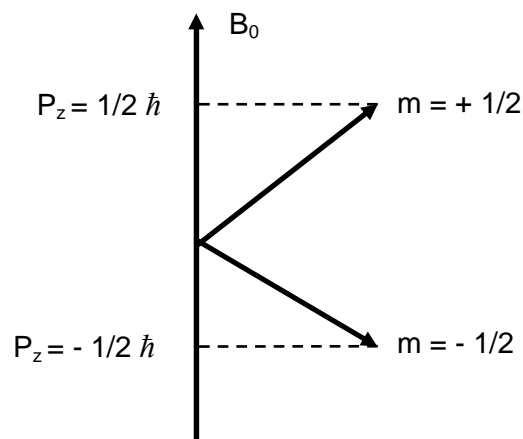


Abbildung 2.23: Richtungsquantelung des Drehimpulses für $I = 1/2$

Es existieren somit für Kerne mit $I = 1/2$ zwei Zustände α und β mit unterschiedlichen Energieniveaus. Diese Energieniveaus werden Zeeman-Niveaus genannt^[76]. Die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Zeeman-Niveaus ist gegeben durch:

$$\Delta E_{\text{pot}} = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \quad [2.11]$$

während der Besetzungsunterschied im thermischen Gleichgewicht durch die Boltzmann-

Verteilung gegeben ist^[77]:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E_{\text{pot}}}{k_B T}} \quad [2.12]$$

In dieser Verteilung ist k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur.

Da bei Protonen der Energieunterschied ΔE_{pot} sehr klein ist, sind die Niveaus nahezu gleich besetzt. Der Überschuss im energieärmeren Niveau liegt nur im Bereich von wenigen tausendstel Promille.

In einem NMR-Experiment werden Übergänge zwischen diesen einzelnen Energieniveaus induziert, indem ein resonantes Radiofrequenzfeld (oszillierendes Magnetfeld) mit der Frequenz ω_0 eingestrahlt wird. Diese Frequenz ω_0 wird so gewählt, dass sie mit der Larmorfrequenz der Kerne übereinstimmt.

$$\Delta E = h \cdot \omega = h \cdot \omega_0 = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \quad [2.13]$$

In diesem Fall bringt ein RF-Feld die Probe aus dem thermischen Gleichgewicht. Die makroskopische Magnetisierung M_{makro} wird in der senkrecht zur Einstrahlrichtung stehenden Ebene um den Winkel θ gedreht. Der Auslenkungswinkel hängt von der Einstrahldauer t_p des Feldes B_1 ab.

$$\theta = \gamma \cdot B_1 \cdot t_p \quad [2.14]$$

In einem sogenannten rotierenden Koordinatensystem (x' , y' , z') wird die makroskopische Magnetisierung M_{makro} im Resonanzfall als ortsfest angesehen^[78]. Wird nun ein Puls mit dem Winkel θ eingestrahlt, so wird das Spinsystem der Probe angeregt und gerät aufgrund der aufgenommenen Energie aus dem Gleichgewicht. Im Fall von $\theta = 90^\circ$ präzidieren alle Kerne in der xy -Ebene und die z -Komponenten der Magnetisierung ist Null. Bei einer Drehung der makroskopischen Magnetisierung um 180° hingegen wird die Besetzung der Energieniveaus umgekehrt.

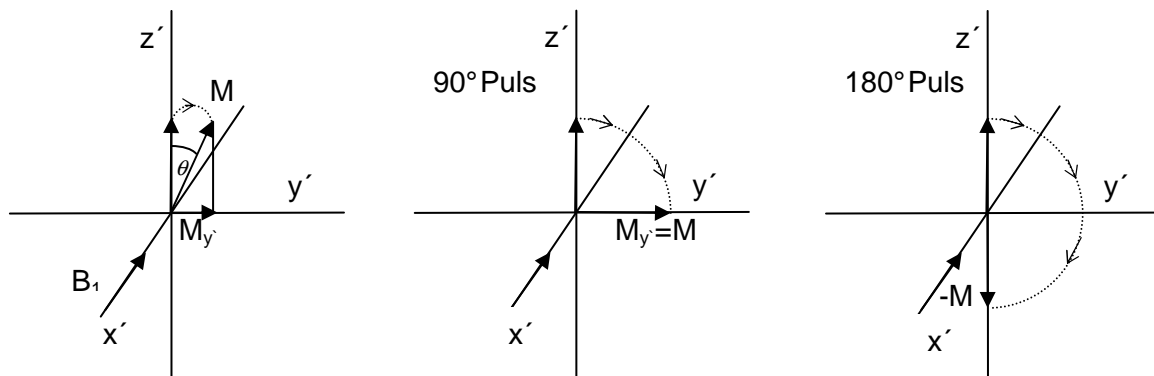


Abbildung 2.24: Richtung der makroskopischen Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem a) nach einem beliebigen Puls, b) nach einem 90° Puls, c) nach einem 180° Puls

Das Spinsystem wird anschließend durch die sogenannte Relaxation in den Gleichgewichtszustand zurückgeführt. Dieser Prozess wird in zwei Vorgänge unterteilt. Man spricht zum einen von der Spin-Gitter-Relaxation (longitudinale Relaxation, T_1), bei der die Energie vom Spinsystem an das umgebende Gitter abgegeben wird und dadurch die Magnetisierung M_{makro} wieder in z -Richtung ausgerichtet wird. Zum anderen von der Spin-Spin-Relaxation (transversale Relaxation, T_2), bei der der Energieaustausch zwischen den einzelnen Spins des Systems stattfindet. Dieser energieerhaltende Entropieprozess führt zu einer Auffächerung der Magnetisierung in der x / y -Ebene und damit zum Verlust der Phasenkohärenz. Dieser Effekt führt somit zum Abbau der Magnetisierung. Beschrieben werden können diese Vorgänge mathematisch mit den empirischen Bloch'schen Gleichungen^[79]:

$$\frac{dM_{\text{makro}}}{dt} = -\frac{M_{\text{makro}} - M_0}{T_1} \quad [2.15]$$

$$\frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2} \quad [2.16]$$

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2} \quad [2.17]$$

Wie bereits beschrieben befindet sich die makroskopische Magnetisierung M_{makro} nach einem 90° Puls in y -Richtung des rotierenden Koordinatensystems und induziert dadurch ein elektrisches Signal in der Empfängerspule. Diese Signalzerfallskurve, das so genannte „free induction decay“ (FID), nimmt aufgrund von Relaxationsprozessen und Feldinhomogenitäten stetig ab. Die Werte des FID werden mit Hilfe einer Fourier-Transformation aus der Zeit- in die Frequenzdomäne umgerechnet, um daraus ein konventionelles NMR-Spektrum (Signalintensität gegen Frequenz) zu erhalten.

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{i\omega t} dt \quad [2.18]$$

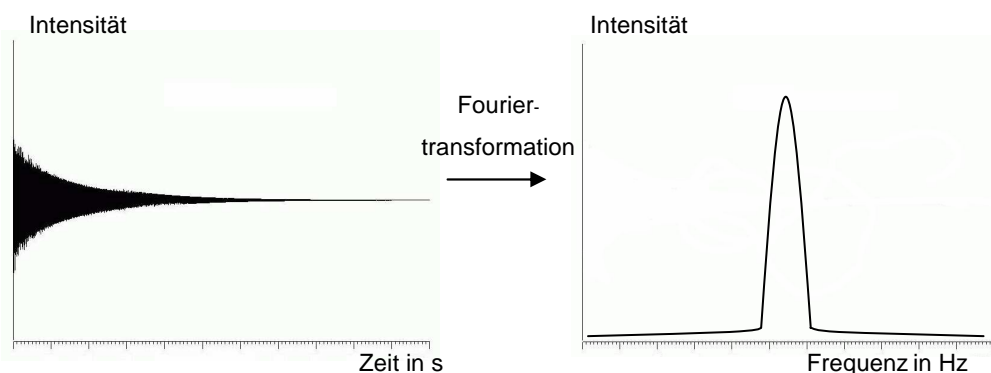


Abbildung 2.25: Schematische Darstellung eines FIDs und dessen fouriertransformierten Frequenzspektrums

Die jeweilige Resonanzfrequenz des untersuchten Kerns wird in charakteristischer Weise von seiner chemischen Umgebung beeinflusst, da das angelegte Magnetfeld B_0 nicht nur mit den Kernen, sondern auch mit den umgebenden Elektronenwolken wechselwirkt. Dadurch wird ein Kreisstrom induziert, der ein zu B_0 entgegengesetztes Feld B' erzeugt. Folglich ist das effektiv wirkende Magnetfeld B_{eff} um B' kleiner als das tatsächlich angelegte Feld B_0 und auch die Resonanzfrequenzen sind im Vergleich mit dem „nackten“ Kern verschoben.

$$B_{\text{eff}} = B_0 - B' = (1 - \sigma) \cdot B_0 \quad [2.19]$$

Hierbei ist σ der dimensionslose Abschirmungstensor^[80].

Eine charakteristische Größe für den betrachteten Kern in seiner chemischen Umgebung stellt die chemische Verschiebung da, welche so definiert ist, dass sie von der Magnetfeldstärke unabhängig ist.

$$\delta_{\text{chem}} = \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}} \cdot 10^6 \quad [2.20]$$

Dabei ist ω die Anregungsfrequenz des betreffenden Kerns und ω_{ref} die Anregungsfrequenz einer Referenzverbindung^[77].

2.3.2 Gepulste Feldgradienten-NMR (PFG-NMR)

Im Allgemeinen besitzt Materie die Tendenz räumliche Konzentrationsunterschiede durch einen Teilchentransport, die so genannte Diffusion, auszugleichen und durch den so erzielten Gleichgewichtszustand das Maximum der Entropie zu erreichen. In Flüssigkeiten unterteilt man diesen Transportprozess in Selbst- und Transportdiffusion. Dabei beruht die regellose Bewegung der Teilchen (Brownsche Molekularbewegung) im Falle der Selbstdiffusion auf lokalen Konzentrations- bzw. Dichteunterschieden, wohingegen die gerichtete Bewegung der Teilchen bei der Transportdiffusion durch makroskopische Dichteunterschiede, welche einen gerichteten Dichtestrom in der Flüssigkeit erzeugen, hervorgerufen wird^[81]. In der vorliegenden Arbeit wird nur die Selbstdiffusion untersucht, so dass auf die Transportdiffusion nicht weiter eingegangen wird. Im Rahmen von PFG-NMR Messungen (englisch: pulsed field gradient nuclear magnetic resonance) wird häufig mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten die Beweglichkeit von Molekülen bewertet. Bei der PFG-Technik wird das vorhandene konstante Magnetfeld B_0 zweimal innerhalb einer Pulssequenz für ein kurzes Zeitintervall von einem zusätzlichen Magnetfeld überlagert, das jeweils einen linearen Magnetfeldgradienten G , den so genannten Feldgradienten-Puls (z. B. in z-Richtung) erzeugt.

$$B = B_0 + G \quad [2.21]$$

Mit Hilfe dieser Feldgradienten-Pulse bewirkt man eine räumliche Abhängigkeit der

Präzessionsfrequenz des Magnetisierungsvektors. Die Larmorfrequenz ist dann gegeben über:

$$\omega(z) = -\gamma (B_0 + Gz) \quad [2.22]$$

M. Vogt hat in seiner Dissertation die Auswirkungen dieser Pulse sehr anschaulich beschrieben^[82]. Daher werden sie hier sehr kompakt erörtert. Zu Beginn ist die Gesamtmagnetisierung entlang der z-Achse orientiert und der erste 90°-RF-Puls dreht sie in die x-y-Ebene, wie bereits in Kapitel 2.3.1 erläutert. Innerhalb des ersten Zeitintervalls τ zum Zeitpunkt t_1 wird der erste Gradientenpuls mit der Länge δ und der Stärke G eingestrahlt. Dadurch erfährt jeder Spin eine Phasenverschiebung, die abhängig von seiner Position in Bezug auf die z-Achse ist.

$$\phi(\Delta z) = \gamma \cdot \delta \cdot G \cdot \Delta z \quad [2.23]$$

Der 180°-Puls invertiert das Vorzeichen der Phasenverschiebung. Der zweite Gradientenpuls kann, wenn keine Diffusion stattfindet, die Helix wieder entfächern und alle Spins wieder in Phase drehen. Daraus resultiert ein maximales Echosignal. Im Falle von Diffusion wird das Auf- und Entfächern der Magnetisierungshelix gestört, was zu einer Verteilung der Phasen führt. Je schneller die Diffusion, desto schlechter die Refokussierung der Spins durch den zweiten Gradientenpuls und desto kleiner wird das Echosignal. Effekte aufgrund einer Begrenzung der Diffusion (gehinderte Diffusion) tragen ebenfalls zum Verlust der Phasenkohärenz bei^[83].

$$I(\Delta, \Delta z) = N(\Delta, \Delta z) \cdot \cos(\gamma \cdot \delta \cdot G \cdot \Delta z) \quad [2.24]$$

Beim PFG-Hahn-Echo nimmt die Spin-Echo-Amplitude mit der transversalen Relaxation T_2 ab. Daher muss man die Diffusionszeit Δ kleiner als T_2 wählen, um ein messbares Signal zu bekommen. Gerade bei Systemen, die eine kurze T_2 -Zeit haben, stellt dies ein Problem dar.

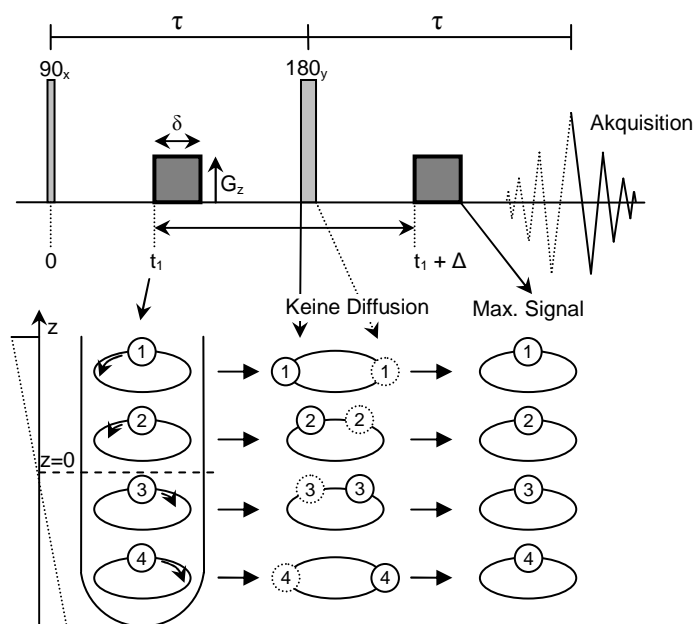


Abbildung 2.26: Die einfachste PFG-Pulsfolge (Hahn-Spin-Echo) und ihre Wirkung auf ein Vier-Spin Ensemble^[83].

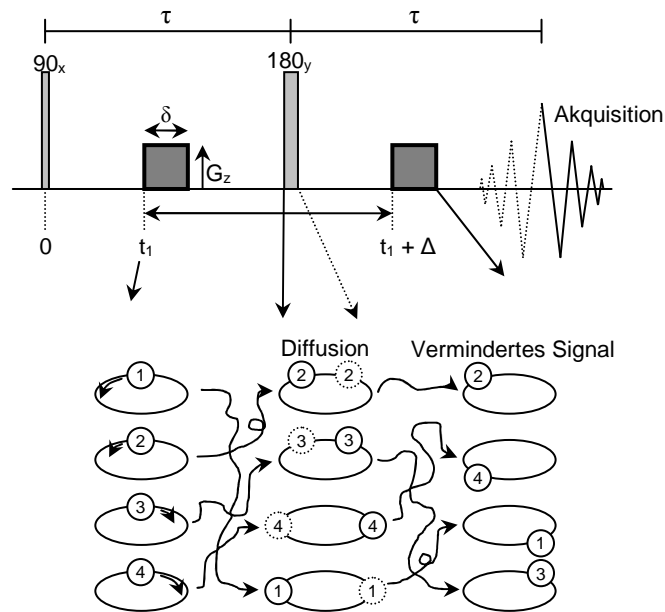


Abbildung 2.27: Die einfachste PFG-Pulsfolge (Hahn-Spin-Echo) und ihre Wirkung auf ein Vier-Spin Ensemble^[83].

Die PFGSTE-Pulsfolge, die auf dem „stimulated echo“ beruht, bietet eine Lösung, indem der 180°-RF-Puls durch zwei 90°-RF-Pulse ersetzt wird. Durch die Trennung der Pulse um die Zeit τ_2 , wird die Gesamtmagnetisierung in z-Richtung verlagert und somit ein Abbau über T_2 -Relaxation verhindert. Die maximale Länge der gewählten Diffusionszeit wird dann durch die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bestimmt, welche meistens um ein Vielfaches länger ist als T_2 .

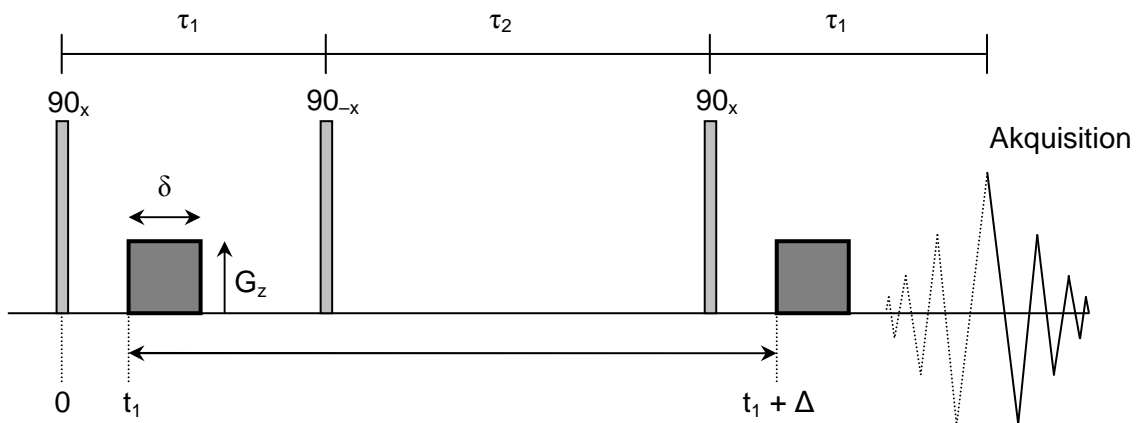


Abbildung 2.28: PFGSTE-Pulsfolge^[84]

Wie bereits beschrieben wird mit Hilfe der Gradientenpulse und der Diffusion der Spins die Echointensität abgeschwächt. In einem entsprechenden NMR-Spektrum hat dies eine von der Gradientenstärke abhängige Abschwächung der Signale zur Folge.

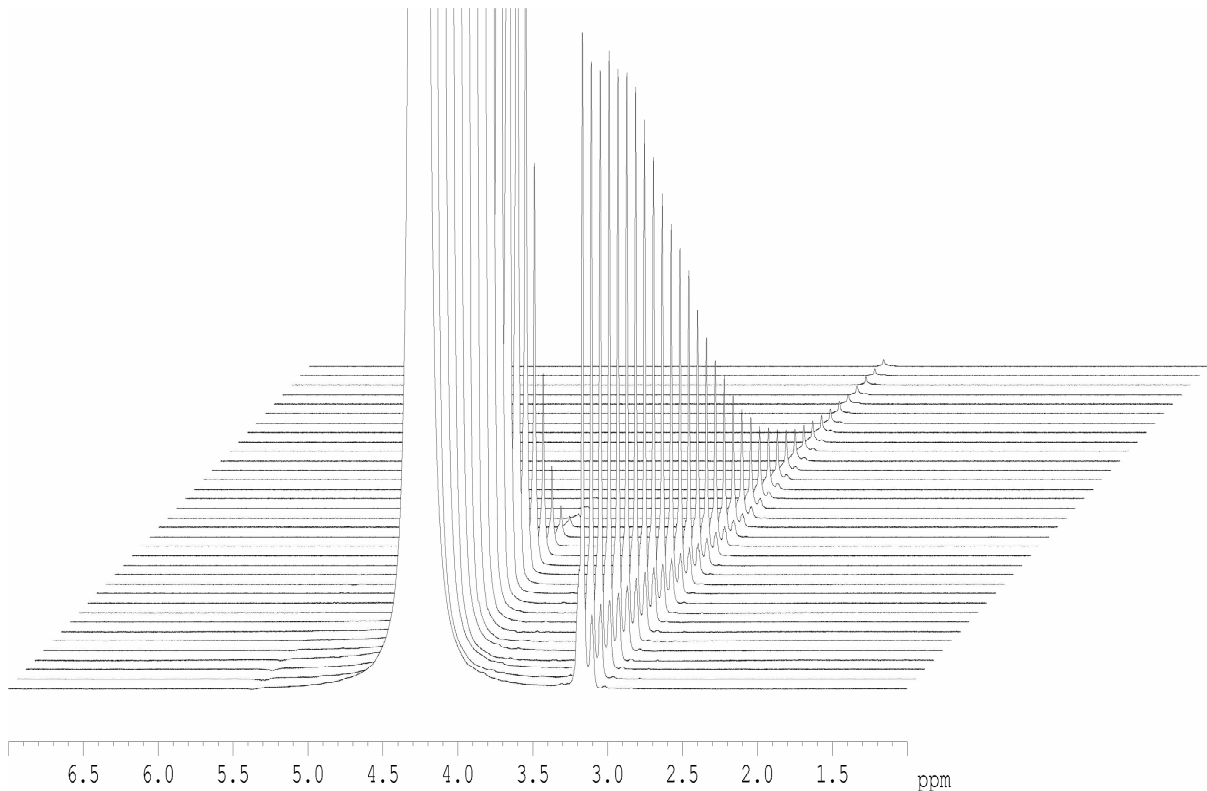


Abbildung 2.29: Signalzerfall von Wasser und Polyethylenoxid in Abhängigkeit von der Gradientenstärke^[85].

Zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten wird im Folgenden eine eindimensionale Lösung betrachtet. Hierbei wird der Feldgradient in z-Richtung erzeugt. Wenn vorausgesetzt wird, dass die Spins frei diffundieren können, also keine Vorzugsrichtung besitzen, kann die Anzahl der Spins, die nach einer Zeit Δ ihre Position bezüglich der z-Achse um Δz verändert haben, durch folgende Gleichung berechnet werden.

$$N(\Delta, \Delta z) = \frac{N_0}{\sqrt{4\pi D\Delta}} \cdot e^{-\frac{\Delta z^2}{4D\Delta}} \quad [2.25]$$

N_0 = Gesamtzahl der Spins

D = Selbstdiffusionskoeffizient

Diese Gleichung kann nun in Gl. 2.22 eingesetzt werden. Es ergibt sich:

$$I(\Delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{N_0}{\sqrt{4\pi D\Delta}} \cdot e^{-\frac{\Delta z^2}{4D\Delta}} \cdot \cos(\gamma \cdot \delta \cdot G \cdot \Delta z) \right) d(\Delta z) \quad [2.26]$$

$$\Rightarrow I(\Delta) = c \cdot N_0 \cdot e^{-\gamma^2 \delta^2 G^2 D \Delta} \quad \text{für } \Delta \gg \delta \quad [2.27]$$

Ist dies nicht der Fall, ist die Diffusionszeit Δ also nicht viel größer als die Gradientenpulsdauer δ , so muss folgende Änderung der Gleichung 2.26 vorgenommen werden.

$$I = c \cdot N_0 \cdot e^{-\gamma^2 \delta^2 G^2 D (\Delta - 1/3 \delta)} \quad [2.28]$$

Mit $I_0 = c \cdot N_0$ [2.29]

erhält man: $\frac{I}{I_0} = e^{-\gamma^2 \delta^2 G^2 D (\Delta - 1/3 \delta)}$ [2.30]

Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wird in einem Diagramm der natürliche Logarithmus von $[I/I_0]$ gegen $[\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)]$ aufgetragen.

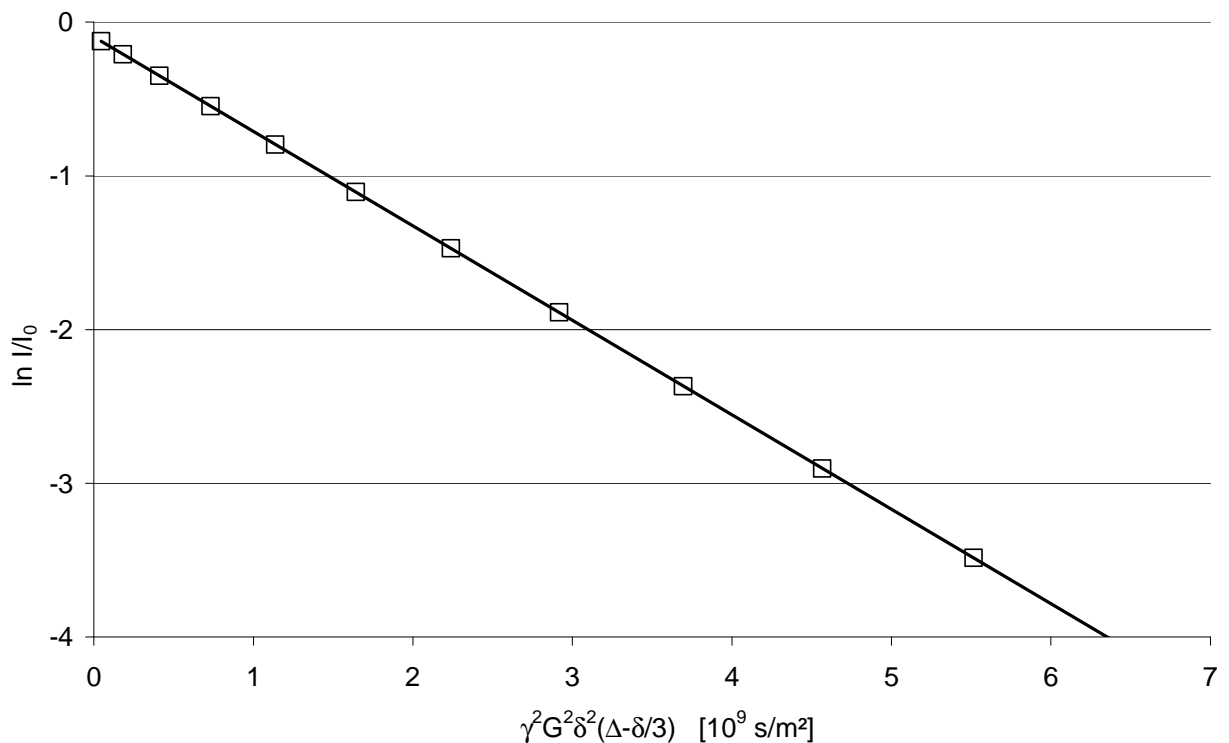


Abbildung 2.30: Diagramm zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der freien Diffusion

Bei dieser Auftragung ergibt sich der Diffusionskoeffizient aus dem Betrag der Steigung der Geraden. Sobald die Diffusion eines Systems durch Hindernisse wie Wände oder Ähnlichem beeinflusst wird, spricht man von gehinderter Diffusion. Diese wird analog zur freien Diffusion mit Hilfe der PFG-NMR bestimmt. In den meisten Fällen liegen freie und gehinderte Diffusion in einem System nebeneinander vor. Abbildung 2.31 zeigt typische Bewegungsmuster von Molekülen in flüssiger Umgebung im Verlauf unterschiedlicher Zeitintervalle.

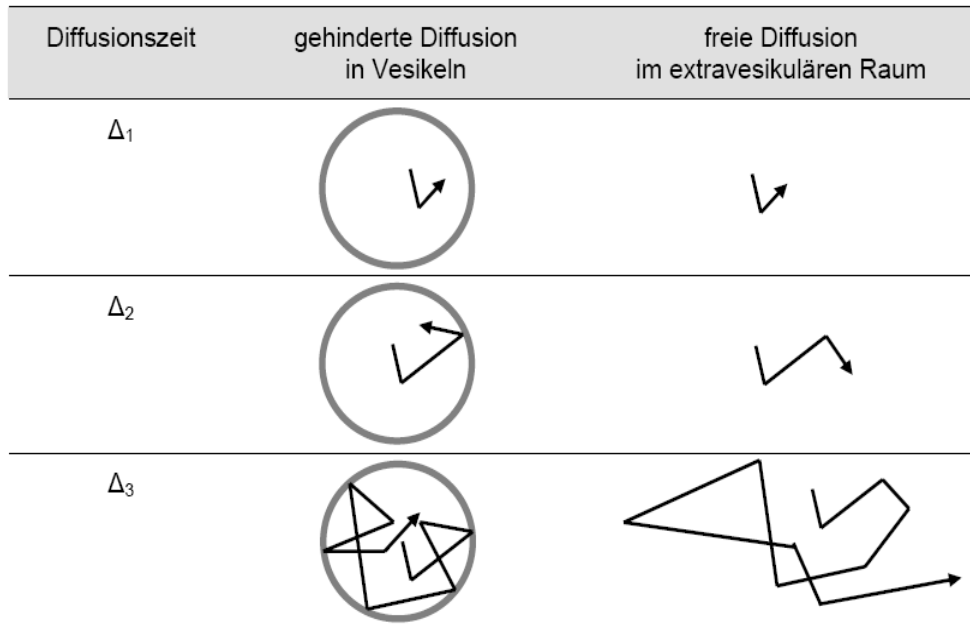


Abbildung 2.31: Typische Bewegungsmuster von Molekülen in flüssiger Umgebung im Verlauf unterschiedlicher Zeitintervalle^[86]

Für ein System in dem beide Diffusionsarten vorliegen, ergibt sich folgende Zerfallskurve für die Auftragung $[\ln I/I_0]$ gegen $[\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)]$.

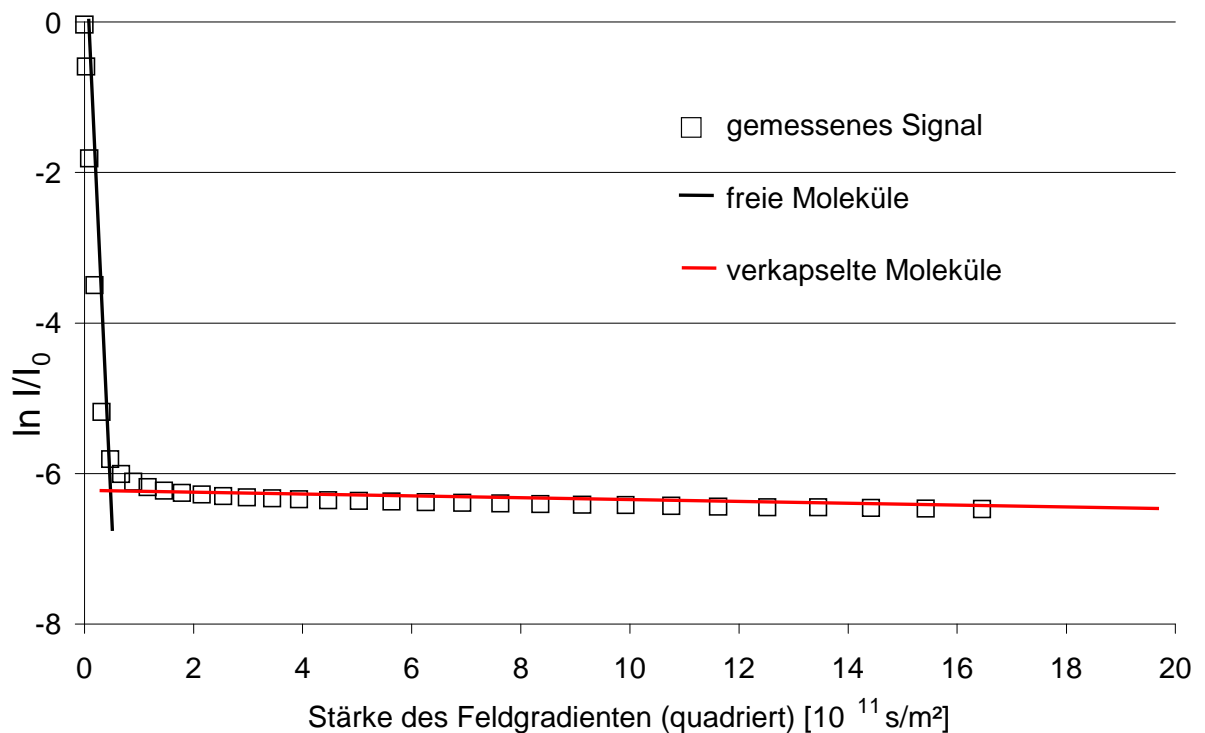


Abbildung 2.32: Abhängigkeit der Signalintensität von der Gradientenstärke für eine teilweise frei, teilweise eingekapselt vorliegende Komponente^[86]

In diesem Fall beobachtet man mit steigender Intensität des Feldgradienten einen Signalzerfall, der aus zwei Anteilen besteht: ein steil zerfallendes erstes Teilstück der Kurve lässt sich den freien Molekülen (schwarz) zuordnen, während der anschließende, flache Verlauf auf den immobilen, eingekapselten Anteil (rot) hindeutet (siehe Abbildung 2.32). Der Anteil der eingeschlossenen Moleküle lässt sich aus der Position des flachen Teilstücks im Diagramm leicht ermitteln: je mehr Substanz sich im Inneren der Kapseln befindet, umso höher liegt das Niveau des abgeflachten Teils der Kurve.

Zur weiteren Auswertung werden mehrere dieser Zerfallskurven durch Variation der Diffusionszeit Δ mittels des beschriebenen „stimulated echo“-Pulsprogrammes detektiert und in einem so genannten „Stejskal-Tanner-Plot“, aufgetragen. Mit Hilfe der auf dem Ansatz von Kärger^[87] beruhenden Funktion für einen biexponentiellen Zerfall werden diese Zerfallskurven gleichzeitig ausgewertet^[88].

$$I_{\text{rel}} = P'_a \exp(-k'_a \cdot \Delta) + P'_b \exp(-k'_b \cdot \Delta) \quad [2.31]$$

Mit:

$$k'_a = C_1 - C_2; \quad k'_b = C_1 + C_2 \quad [2.32]$$

$$P'_a = \frac{1}{2} + \frac{\frac{1}{4} \left[(p_b - p_a)(k_a - k_b) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right]}{C_2}; \quad [2.33]$$

$$P'_b = \frac{1}{2} - \frac{\frac{1}{4} \left[(p_b - p_a)(k_a - k_b) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right]}{C_2} \quad [2.34]$$

$$C_1 = \frac{1}{2} \left(k_a + k_b + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \right); \quad [2.35]$$

$$C_2 = \frac{1}{2} \left[\left(k_a - k_b + \frac{1}{\tau_a} - \frac{1}{\tau_b} \right)^2 + \frac{4}{\tau_a \tau_b} \right]^{1/2} \quad [2.36]$$

$$k_a = \gamma^2 G^2 D'_a \delta^2; \quad [2.37]$$

$$k_b = \gamma^2 G^2 D'_b \delta^2 \quad [2.38]$$

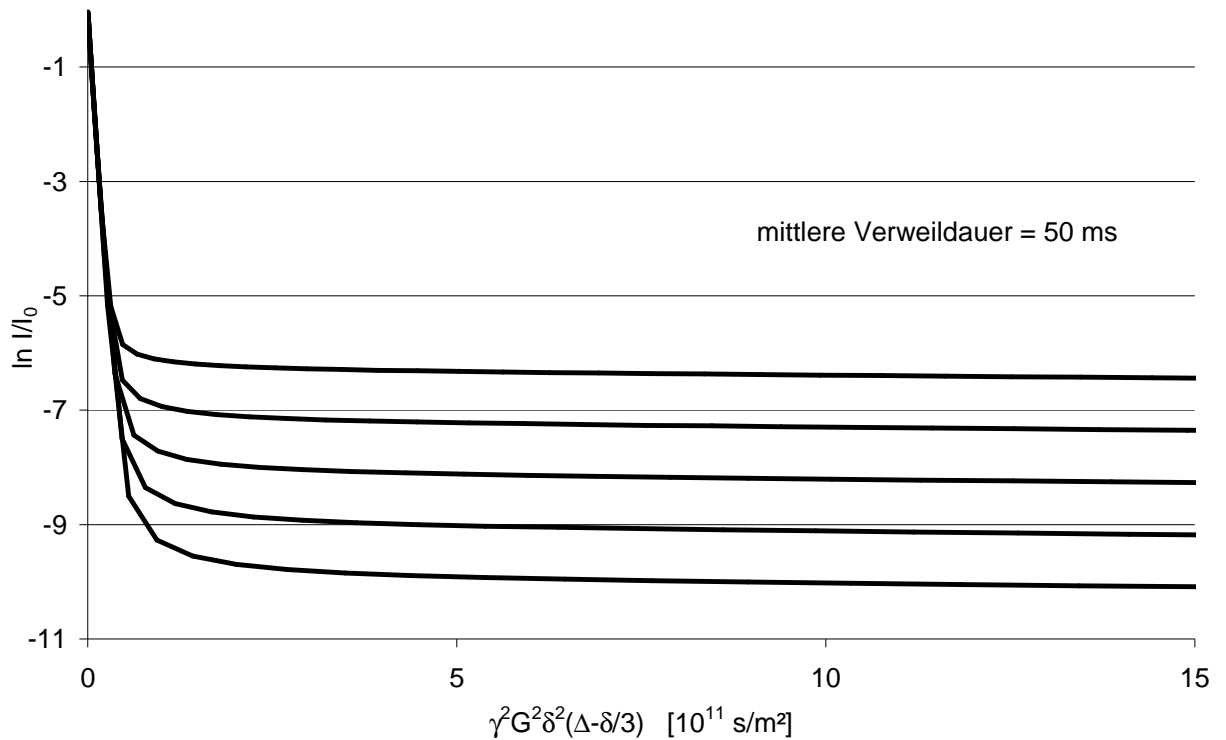


Abbildung 2.33: Stejskal-Tanner-Plot mit berechneten Zerfallskurven mit Δ von 100 bis 300 ms

Mit Hilfe dieser Zerfallsfunktion werden die Werte für die freie Diffusion der Sondenmoleküle (D_a) und für die freie Diffusion der Vesikel (D_b), sowie für die mittlere Verweildauer (τ_b) der untersuchten Substanz in den Vesikeln und die relative Menge an eingekapselter Substanz (p_b) bestimmt.

Der Abstand der entstehenden Zerfallskurven ist dabei abhängig von der detektierten mittleren Verweildauer. Da den entsprechenden Austauschprozessen eine Reaktionskinetik 1. Ordnung zugrunde liegt gilt: je kürzer diese mittlere Verweildauer, desto größer ist der Abstand zwischen den Zerfallskurven. Daraus folgt: je länger der Austausch der Sondenmoleküle dauert, desto näher rücken die Zerfallskurven zueinander. Fallen die erhaltenen Zerfallskurven aufeinander, so ist eine Auswertung des Experimentes nur möglich, wenn die Streuung der erhaltenen Werte unter 0,1 % liegt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Synthesen der Blockcopolymere

Die Synthese der Blockcopolymere wird an der Universität Hamburg von der Arbeitsgruppe Förster mit Hilfe folgender Apparatur durchgeführt.

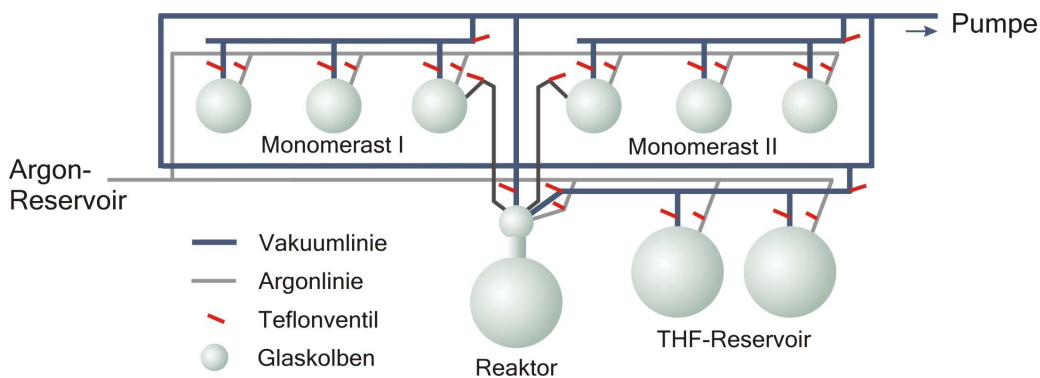


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Apparatur für die anionische Polymerisation^[8]



Abbildung 3.2: Fotografie der Glasapparatur für die anionische Polymerisation^[89]

Die entsprechenden Vorschriften sind im Folgenden angegeben.

3.1.1 Synthese und Reinigung von Poly(2-vinylpyridin-block-ethylenoxid) P2VP-PEO^[8]

Für die anionische Polymerisation wird 2-Vinylpyridin unter Schutzgasatmosphäre über Calciumhydrid und Ethylaluminiumdichlorid getrocknet und anschließend auf -196°C gekühltes, getrocknetes THF kondensiert. Nach Erwärmen auf -110°C wird die Polymerisation in der gerade geschmolzenen, klaren Lösung durch Zugabe von Diphenylmethylkalium (DPMK) initiiert und 10 – 20 min bei -78°C gerührt. Nach Beendigung der Polymerisation wird aus dem Reaktionsgemisch eine Probe zur Charakterisierung des Poly(2-vinylpyridin)-Blockes entnommen. Danach wird Ethylenoxid, welches zur Reinigung von Calciumhydrid, einem Natriumspiegel und n-Butyllithium abkondensiert wird, auf die Reaktionslösung destilliert. Durch Erwärmen auf 40°C wird die ringöffnende Polymerisation des Ethylenoxids gestartet. Nach 3 Tagen bei 40°C kann die Polymerisation durch Zugabe von Wasser abgebrochen, das Polymer in kaltem Diethylether (-50°C) gefällt und nach Filtration im Membranpumpenvakuum getrocknet werden.

3.1.2 Synthese und Reinigung von Poly(isopren-block-ethylenoxid) PI-PEO und Poly(butadien-block-ethylenoxid) PB-PEO^[8]

Phosphazenenbase wird in einen Reaktor überführt und vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wird THF frisch von einem Benzophenon/Kalium-Komplex in den Reaktor einkondensiert und mit flüssigem Stickstoff gefroren. Nach dem Erwärmen auf -110°C wird in die gerade geschmolzene Lösung die entsprechende Menge s-Butyllithium injiziert, um die Bildung des $[\text{t-BuP}_4\text{-Li}]^+$ -Komplexes zu erreichen. Sobald sich eine klare gelbe Lösung gebildet hat, wird frisch von Dibutylmagnesium und n-Butyllithium kondensiertes Isopren auf die etwa -100°C kalte Lösung überführt. Dabei findet die Monomerzugabe in zwei Stufen statt. Zuerst wird durch die Zugabe von etwa der fünffachen Äquivalenzmenge des Initiator-Komplexes eine Initiierung erreicht und nach ca. 15 Min. ein Präpolymer erhalten, zu dem im zweiten Schritt die Restmonomermenge gegeben wird. Die Polymerisation des PI-Blockes ist, abhängig von der geplanten Blocklänge, nach 5 - 6 h bei -78°C beendet. Nun wird Ethylenoxid, welches zur Reinigung nacheinander von Calciumhydrid, einem Natriumspiegel und n-Butyllithium abkondensiert wird, auf die Reaktionslösung destilliert und die Lösung auf 40°C erwärmt. Nach 3 Tagen bei dieser Temperatur wird die Polymerisation durch Zugabe von Wasser abgebrochen, das Polymer in kaltem Aceton (-50°C) gefällt und nach Filtration im Membranpumpenvakuum getrocknet.

Die Synthese von Poly(butadien-block-ethylenoxid) PB-PEO verläuft analog

3.1.3 Synthese und Reinigung von Poly(laktid-block-ethylenoxid) PLA-PEO^[90]

Zur Polymerisation wird Ethylenoxid, nacheinander über Calciumhydrid, einem Natriumspiegel und n-Butyllithium gereinigt und getrocknet. Anschließend wird es auf mit Stickstoff gekühltes, gefrorenes THF kondensiert und die Reaktion mittels eines Methoxyethylkalium-Initiators gestartet. Durch Erwärmen auf 40°C beginnt die ringöffnende Polymerisation des Ethylenoxids und die Reaktionslösung wird 3 Tage bei 40°C gerührt. Danach wird in THF kondensiertes Laktid bei -110°C zur Ethylenoxid-Lösung hinzugegeben und 6 h bei 25°C gerührt. Anschließend wird die Reaktion mittels Isopropanol abgebrochen und das überschüssige THF unter Vakuum abdestilliert. Die Aufarbeitung des Blockcopolymeres geschieht durch Zentrifugation und Lyophilisation.

3.2 Vesikel aus Blockcopolymeren und Lipiden

3.2.1 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus P2VP-PEO

Zur Herstellung von Vesikeln aus P2VP-PEO werden hauptsächlich Polymere mit drei unterschiedlichen Blocklängenverhältnissen verwendet. Die wichtigsten Eigenschaften dieser Blockcopolymere sind in der Tabelle 8.1 im Anhang zusammengefasst. Zur Darstellung von Vesikeln aus diesen Polymeren werden hauptsächlich zwei Methoden verwendet, zum einen die so genannte Chloroform-Methode, zum anderen die neuartige „Tintenstrahldrucker“-Methode^[45], welche im Arbeitskreis Förster an der Universität Hamburg entwickelt wurde. Mit Hilfe der Chloroform-Methode wird eine Lösung mit einer Polymerkonzentration von 2,5 mg/ml hergestellt, indem 25 mg aufgereinigtes P2VP-PEO in einem geöffneten Reaktionsgefäß unter starkem Rühren in 10 ml Chloroform gelöst werden. Anschließend werden 10 ml dest. Wasser hinzu gegeben und die trübe Lösung 3 Tage bei 25°C stark gerührt, bis das organische Lösungsmittel vollständig verdampft ist. Um den Einfluss der Extrusion auf die Größenverteilung der Vesikel zu untersuchen werden einige Proben (jeweils 1 ml) mittels des Extruders LiposoFast™ der Firma Avestin Inc. (Kanada) 20-mal durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porengröße extrudiert.

Mit Hilfe der „Tintenstrahldrucker“-Methode werden Vesikeldispersionen mit einer Polymerkonzentration von ca. 2,5 mg/ml in Wasser hergestellt. Dazu wird eine Ethanollösung mit einer Polymerkonzentration von 10 mg/ml erzeugt. Diese wird in eine Druckerpatrone eines umgebauten Tintenstrahldruckers injiziert. Durch einen Druckauftrag von drei schwarzen Seiten wird diese Polymerlösung nun tröpfchenweise bei 25°C in 4 ml Wasser „gedruckt“. Dabei ist darauf zu achten, dass die wässrige Lösung stark gerührt wird. Abbildung 3.3 zeigt noch einmal zur Verdeutlichung den schematischen Aufbau dieser neuartigen Vesikeldarstellungsmethode.

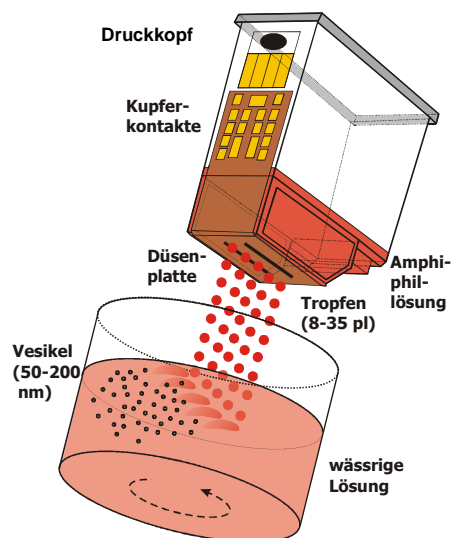


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der „Tintenstrahldrucker“-Methode^[45]

Charakterisiert werden die Vesikel mit Hilfe der DLS (Universität Hamburg), dem Cryo-TEM Verfahren (Universität Freiburg) sowie der DNM. Die Stabilität der hergestellten Vesikel wird mittels DLS an der Universität Hamburg und mittels DNM an der Universität Duisburg-Essen bestimmt^[91].

3.2.2 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PI-PEO^[92]

Voruntersuchungen an der Universität Hamburg ergaben, dass die „Tintenstrahldrucker“-Methode bei diesem Blockcopolymer nur schwer anwendbar ist. Daher wird untersucht, welche der folgenden Darstellungsmethoden zur Herstellung von Vesikeln aus PI-PEO (PI: PEO= 33: 27, $M_w = 3350$ g/mol) geeignet ist. Als Erstes wird die so genannte Chloroform-Methode mit unterschiedlichen Polymerkonzentrationen durchgeführt. Die verschiedenen Versuchsparameter sind in Tabelle 8.2 im Anhang angegeben. Die Versuche werden analog zu Kapitel 3.2.1 durchgeführt.

Als nächste Methode wird die Wasser-Quell-Methode untersucht. Dazu wird die entsprechende Menge an Polymer (Tabelle 8.3 im Anhang) in einem verschlossenen Gefäß unter starkem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers in Wasser dispergiert und 14 Tage bei 25°C kräftig gerührt.

Des Weiteren werden Versuche mit der so genannten Film-Hydratationsmethode durchgeführt. Dazu wird die entsprechende Menge an Polymer (siehe Tabelle 8.4 im Anhang) in Chloroform (jeweils 5 ml) gelöst und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers unter schneller Rotation im Wasserstrahlvakuum langsam eingeengt, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft ist. Der an der Kolbenwand haftende Film wird mit der angegebenen Menge Wasser überschichtet und für 48 h bei Normaldruck und 25°C weiter rotiert.

Als letzte Methode wird die „Tintenstrahldrucker“-Methode untersucht, wobei mit den in der folgenden Tabelle aufgelisteten Versuchsbedingungen (analog zu Kapitel 3.2.1) vorgegangen wird.

Tabelle 3.1: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der „Tintenstrahldrucker“-Methode

Polymermenge [mg]	Wasser [ml]	Polymerkonzentration [mg/ml]
50,3	5	10,1 ^a
59,3	5	11,9 ^b
77,3	8	9,7 ^b
82,9	2	41,5 ^b
618,7	8	77,3 ^b

^a 10 mL Aceton, ^b 10 mL THF

3.2.3 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PLA-PEO^[92]

Zu Beginn wird untersucht, welche Darstellungsmethode zur Herstellung von Vesikeln aus PLA-PEO (PLA: PEO = 100: 50, $M_w = 5760$ g/mol) geeignet ist. Auch bei diesem Polymer ergaben Voruntersuchungen an der Universität Hamburg, dass die „Tintenstrahldrucker“-Methode schwer anwendbar ist.

Als Erstes wird die so genannte Chloroform-Methode mit unterschiedlichen Polymerkonzentrationen (siehe Tabelle 8.5 im Anhang) durchgeführt. Dazu wird die angegebene Polymermenge in Chloroform unter Rühren bei 25°C gelöst, mit dest. Wasser überschichtet und ca. 3 Tage bei 25°C gerührt, bis das organische Lösemittel vollständig verdampft ist.

Als nächste Methode wird die Wasser-Quell-Methode untersucht. Dazu werden 50,8 mg des PLA-PEOs in 10 ml Wasser mittels eines Magnetrührers dispergiert und 14 Tage bei 25°C kräftig gerührt.

Des Weiteren werden Versuche mit der so genannten Film-Hydratationsmethode durchgeführt. Dazu werden 20 mg Polymer in 5 ml Chloroform gelöst und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers unter schneller Rotation im Wasserstrahlvakuum langsam eingeengt, bis das gesamte Lösungsmittel verdampft ist. Der an der Kolbenwand haftende Film wird mit 8 ml Wasser überschichtet und für 48 h bei Normaldruck und 25°C weiter rotiert. Anschließend wird die Lösung durch einen Spritzenaufsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 μm filtriert.

Alle Vesikelproben werden im Anschluss mittels DNM auf ihre Größenverteilung untersucht.

3.2.4 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PB-PEO

Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit des Blockcopolymers PB-PEO zum bereits beschriebenen PI-PEO (siehe Kapitel 3.2.2) wird auch für dieses Polymer standardmäßig die Chloroform-Methode zur Darstellung gewählt. Eine ausführliche Charakterisierung der Vesikel mittels DNM erfolgt nicht.

Bei allen Vesikeldarstellung ist darauf zu achten, dass ein neutraler pH-Wert vorhanden ist. Um dies zu gewährleisten ist es nötig, alle Darstellungen in einem Puffermedium durchzuführen.

Zur Herstellung dieser Pufferlösung werden 0,12 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) in 100 ml dest. Wasser gelöst und mittels verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

3.2.5 Herstellung von Vesikeln (Liposomen) aus Ei-Phosphatidylcholin (EPC) und Cholesterol

Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen werden im Arbeitskreis Schubert, Pharmazeutische Technologie an der Universität Freiburg, nach folgender Anleitung hergestellt^[86]. Dazu werden zwei verschiedene Methoden benutzt.

Bei der so genannten Filmmethode werden die Membranbestandteile in einen Rundkolben eingewogen und in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (THF, Methanol) gelöst. Das organische Lösungsmittel wird anschließend bei moderater Temperatur ($T = 40^{\circ}\text{C}$) am Rotationsverdampfer wieder entfernt. Auf der Innenwand des Rundkolbens entsteht ein homogener, transparenter Lipidfilm, der im Hochvakuum für ca. 5 h nachgetrocknet wird. Der Film wird anschließend mit Hilfe einer Phosphatpufferlösung aufgenommen, wobei spontan multilamellare Liposomen (MLV) unterschiedlicher Größe entstehen. Diese Liposomen werden mittels Extrusion verkleinert. Dabei wird die resultierende Liposomendispersion mehrfach unter Druck durch Polycarbonatmembranen mit definierter Porengröße gepresst (extrudiert). Zur Extrusion wird eine 200 nm Membran verwendet.

Bei dem so genannten Detergensentfernungsverfahren werden aus einer Lipid-Detergensmischung (Mischmizelldispersion) freie Detergensmoleküle abgetrennt, wodurch in einem komplexen Prozess Vesikel entstehen. Die Filmmethode eignet sich dabei zur Herstellung von Lipid-Detergens-Filmen. Hierbei wird neben den Membranbestandteilen ein ausgewähltes Detergens zugefügt und ein Lipid-Detergens-Film erhalten. Beim Aufnehmen solcher Lipid-Detergens-Filme mit Phosphatpuffer bilden sich Mischmizellen. Werden nun die freien Detergensmonomere durch Dialyse entfernt, verarmen die entstehenden scheibenförmigen Mischmizellen an Detergens und sind gezwungen, zu fusionieren (siehe Abbildung 3.4).

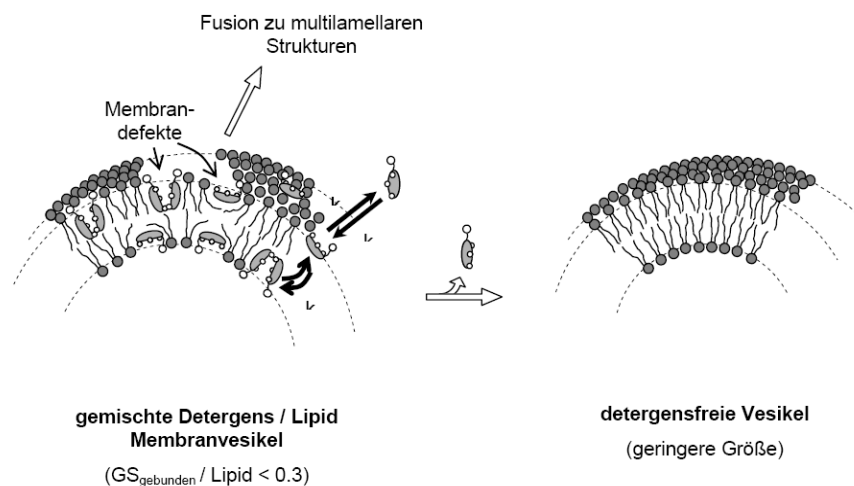


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Herstellung von Liposomen mittels Detergensentfernung^[93]

Die dabei gebildeten Liposomen zeichnen sich durch eine homogene Größenverteilung und eine geringe Lamellarität aus. Zur Herstellung „großer“ Liposomen (ca. 150 nm) wird n-Octyl- β -D-glucopyranosid, für „kleine“ Liposomen (ca. 20 nm) Natriumcholat als Detergens verwendet. Die Dialysezeit beträgt 24 h und findet in einer Dialysezelle aus eigener Konstruktion (siehe Abbildung 3.5) statt, wobei zu Beginn eine hohe Rührgeschwindigkeit von 350 U/min gewählt. Nach Bildung der Liposomen, erkennbar an einer intensiven Trübung, wird die Rührgeschwindigkeit auf 60 U/min reduziert.

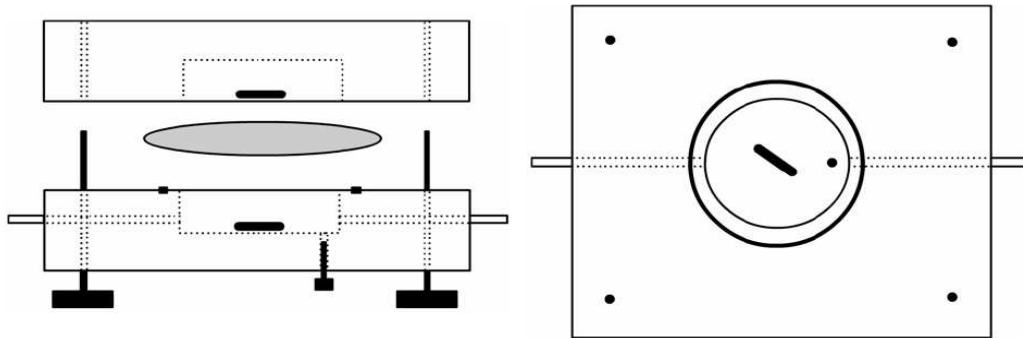


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau der Dialysekammer^[86]

3.3 Untersuchungen mit gepulster Feldgradienten-NMR

Die ^1H -PFG-NMR-Messungen werden mit einem Avance 400 MHz Spektrometer der Firma Bruker-BioSpin GmbH (früher Bruker Analytik GmbH) mit einem Diff30-Probenkopf durchgeführt. Weitere Ausstattungsmerkmale dieses Gerätes sind: aktive Abschirmung, zur Unterdrückung von induzierten Wirbelströmen, Wasserkühlung um Konvektion in der Probe zu minimieren und wechselbare RF-Einsätze für verschiedene Kerne. Als Gradientenverstärker wird eine Einheit des Typs B-AFPA-40 der Firma Bruker-BioSpin GmbH eingesetzt. Die Messungen werden, wenn nicht anders angegeben, alle mit den gleichen Standardparametern, welche in Tabelle 3.2 angegeben sind, durchgeführt. Es wird jeweils ein „stimulated-echo“ Experiment mit entsprechenden Gradientenpulsen benutzt.

Tabelle 3.2: Standardparameter der PFG-NMR-Messungen

Recycle Delay d_1	5 s
Gradientenpulslänge δ	1,2 ms
Gradientenstärke G	0-400 G/cm
Gradientenschritte	32
Scans pro Gradientenschritt	4-32
Diffusionszeit Δ	100-300 ms in 50 ms -Schritten
Temperatur	25°C / 298 K

Für die Diffusionsmessungen werden jeweils 250 μl der zu untersuchenden Vesikeldispersion mit 250 μl der zu untersuchenden Sonde vermengt, homogenisiert und 5 min lang zur Ausbildung des Gleichgewichts ruhen gelassen.

Anschließend werden mindestens fünf verschiedene Diffusionszeiten Δ pro Probe eingestellt und zur Reproduktion jeweils dreimal hintereinander gemessen. Es ergeben sich Spektren mit einer von der Gradientenstärke abhängigen Signalintensität, wie in Abbildung 2.29 gezeigt wird. Diese Spektren werden mit Hilfe der NMR-Software „X-WIN-NMR“ bzw. „Top-Spin“ ausgewertet. Dazu werden die Integrale I der Sondersignale in Abhängigkeit von der Gradientenstärke bestimmt.

Die erhaltenen Zerfallskurven werden in einem Diagramm mit dem natürlichen Logarithmus von $[I/I_0]$ gegen $[\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)]$, aufgetragen (siehe Abbildung 3.6).

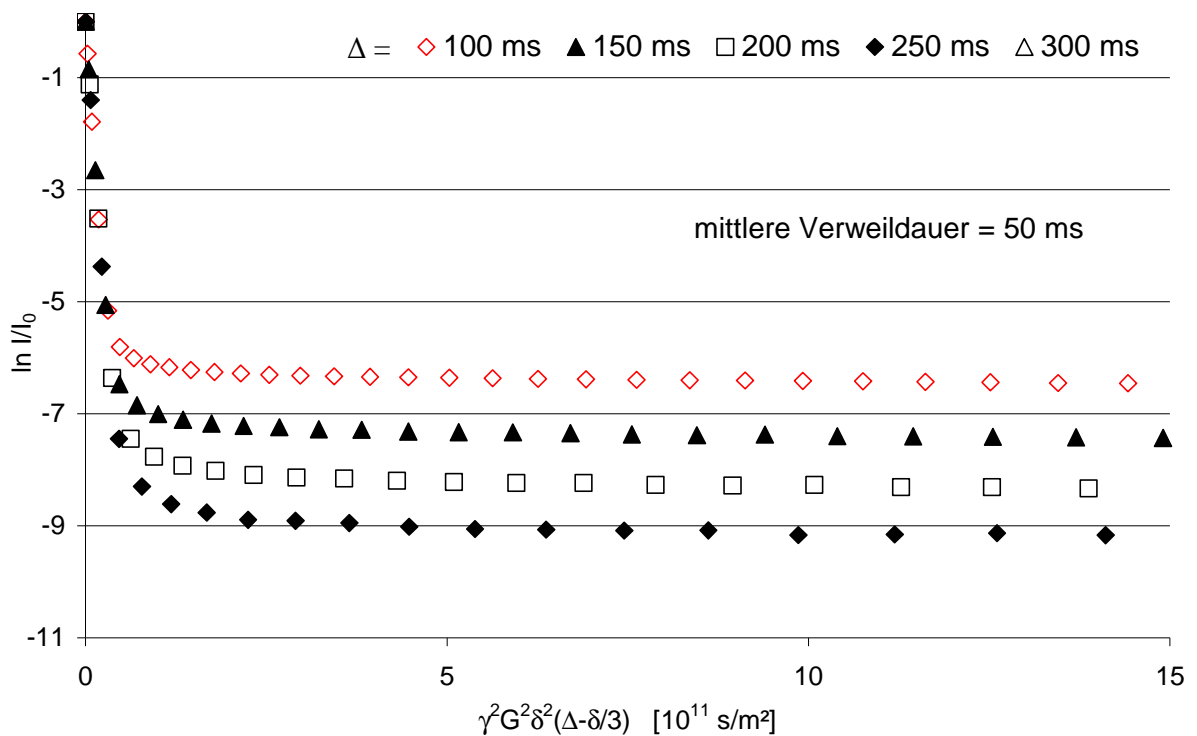


Abbildung 3.6: Stejskal-Tanner-Plot für den Austausch von Wasser durch Membranen aus PI-PEO Vesikeln

Mit Hilfe der auf dem Ansatz von Kärger^[87] beruhenden Funktion für einen biexponentiellen Zerfall werden diese Zerfallskurven gleichzeitig analog zu Kapitel 2.3.2 ausgewertet^[88].

3.4 Zeitaufgelöste ^1H -PFG-NMR-Methode

Während des Verlaufs dieser Arbeit zeigt sich, dass mit Hilfe der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen ^1H -PFG-NMR-Methode nur kurze Verweilzeiten untersucht werden können. Daher wird eine weitere Messmethode entwickelt, mit der auch längere Verweildauern zugänglich sind. Grundlage dieser zeitaufgelösten Methode bilden spezielle Parametereinstellungen der NMR-Messung, durch die nur das Echosignal der eingekapselten Fraktion detektiert wird. Hierzu wird zuerst die zu untersuchende Vesikelprobe mit einer Sonde im Verhältnis 1:1 gemischt und es wird eine Diffusionsmessung mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

$$\Delta = 100 \text{ ms}, G = 4\text{-}400 \text{ G/cm}, \delta = 1,2 \text{ ms.}$$

Anschließend wird mit Hilfe der Auswertesoftware bestimmt, bei welchen Einstellungen für G die Signale der freien Fraktion nahezu vollständig zerfallen sind. Diese Parameter werden für die zeitabhängige Messung übernommen, sodass dann mit dem folgenden ^1H -PFG-Experiment ausschließlich die eingekapselte Fraktion detektiert wird. Die Dauer der Messung wird über die Anzahl der hintereinander durchgeführten Experimente und der dabei gemessenen Scans eingestellt. Der Startpunkt t_0 wird manuell mit Hilfe einer Stoppuhr bestimmt, wobei die Zeit zwischen Mischen der Probe (250 μl Vesikeldispersion + 250 μl Sondenlösung) und Starten der NMR-Messung gemessen wird.

Zur Auswertung wird entweder die Intensität des FIDs oder das Integral über die Intensität des zu untersuchenden Signals gegen die Zeit t aufgetragen (siehe Abbildung 3.7).

Aufgrund einer Reaktionskinetik 1. Ordnung und der daraus resultierenden Gleichung kann die Kurve angefitet werden.

$$y = A \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) + w \quad [3.1]$$

Daraus ergibt sich mit $\tau_{1/2} = \ln(2)/k$ die Halbwertszeit des Austausches.

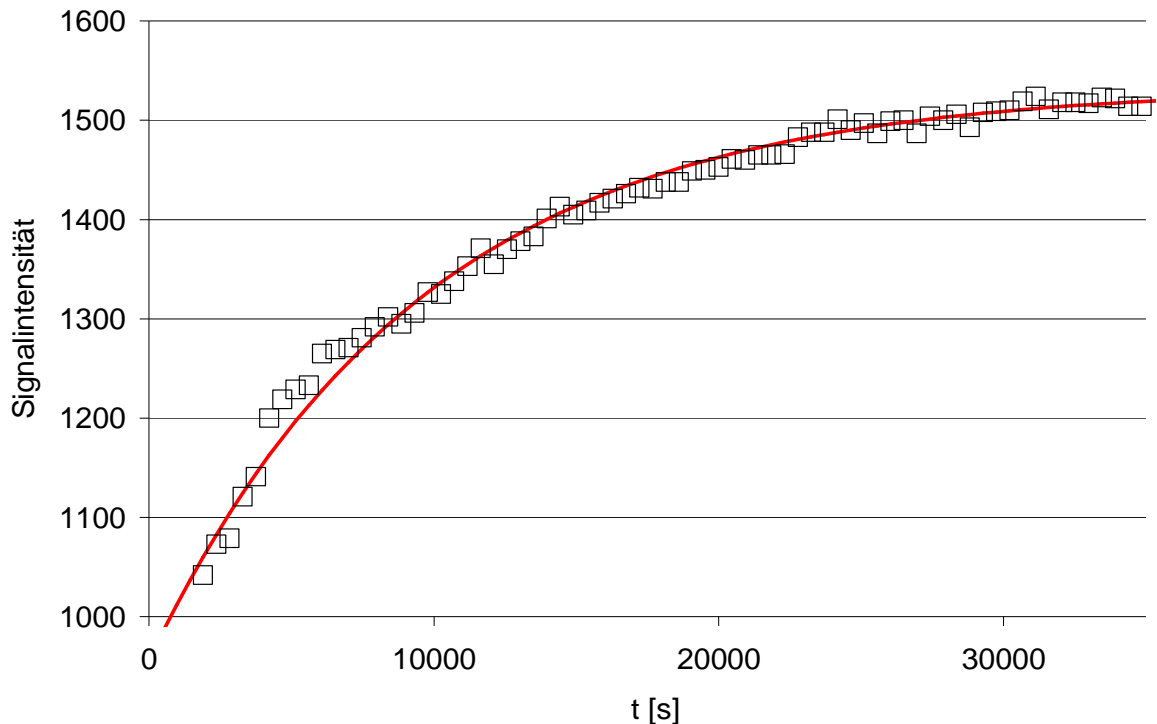


Abbildung 3.7: Ausgewertete Auftragung der Intensität des Sondensignals gegen die Zeit t.

Zur Optimierung dieser neuartigen Methode werden die Halbwertszeiten des Austausches von Poly(ethylenglycol)-400-monomethylethermonomethacrylat (PEG400MMEMMA) und Glukose in Liposomen aus Ei-Phosphatidylcholin (EPC) untersucht.

Als Erstes werden in einem 5 mm NMR-Röhrchen 250 μl einer Liposomendispersion, hergestellt mittels Film- bzw. Detergensmethode (siehe Kapitel 3.2.5), vorgelegt, mit 250 μl einer wässrigen PEG400MMEMMA-Lösung (30 mg/ml) vermischt und mit Hilfe der folgenden Parameter NMR-spektroskopisch untersucht:

$$G = 132 \text{ G/cm}, \Delta = 100 \text{ ms}, \delta = 1,2 \text{ ms}, \text{scans} = 4, \text{Experimente} = 40.$$

Zur Bestimmung der Halbwertszeit des Austausches von Glukose wird ebenfalls eine Liposomendispersion aus EPC vorgelegt, mit einer 400 mmol Glukose-Lösung vermischt und mit den folgenden Parametern NMR-spektroskopisch untersucht:

$$G = 81 \text{ G/cm}, \Delta = 100 \text{ ms}, \delta = 1,2 \text{ ms}, \text{scans} = 8, \text{Experimente} = 150-200.$$

3.5 Untersuchung des Austauschverhaltens aus Vesikeln

Für die Anwendung von Vesikeln als Wirkstoffträgersysteme spielt das Austauschverhalten und somit die Permeabilität der Polymermembran eine entscheidende Rolle. Dieses Austauschverhalten der Vesikel ist von vielen verschiedenen Parametern abhängig. So spielen die Eigenschaften der Vesikel wie Radius und Bilayerdicke genauso eine Rolle wie die Auswahl der chemischen Sonde und der gewählten physikalisch-chemischen Versuchsbedingungen. Als chemische Sonde wird hauptsächlich Polyethylenoxid (PEO) mit verschiedenen Molmassen verwendet. Diese werden mit folgender Abkürzung bezeichnet, wobei die angegebene Ziffer die Molmasse des PEOs widerspiegelt.

Bsp.: PEO 200 = Polyethylenoxid mit einer Molmasse von 200 g/mol.

3.5.1 Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten

3.5.1.1 Einfluss des Vesikelradius

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Austauschverhaltens vom Radius der Vesikel werden jeweils 250 µl einiger Vesikeldispersionen mit variierenden Vesikelgrößen mit 250 µl einer 2 Gew% PEO-Lösung, sowohl mit einer Molmasse von 200 g/mol (PEO 200) als auch mit einer Molmasse von 100000 g/mol (PEO 100000) versetzt. Die Lösungen mit PEO 200 als Sonde werden mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern NMR-spektroskopisch untersucht, während die Lösungen mit PEO 100000 als Sonde mit der zeitaufgelösten Messmethode und folgenden Parametern NMR-spektroskopisch untersucht werden:

$G = 130 \text{ G/cm}$, $\Delta = 100 \text{ ms}$, $\delta = 1,2 \text{ ms}$, scans = 4, Experimente = 50.

Die Größe der untersuchten Vesikel wird mit einer ^1H -PFG-NMR-Messung mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern und PEO 200 (2 Gew% Lösung) als Sonde bestimmt.

3.5.1.2 Einfluss der Bilayerdicke

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Austauschverhaltens von der Bilayerdicke der Vesikel werden vier Polymere mit unterschiedlichen Blocklängenverhältnissen verwendet.

Tabelle 3.3: Verwendete Polymere zur Bestimmung der Abhängigkeit von der Bilayerdicke

Polymer	Blocklängen		Mw/Mn		M [g/mol]	Bilayerdicke Vesikel [nm]	
	P2VP	PEO	P2VP	P2VP-PEO		Cryo-TEM	SANS
P2VP-PEO3	55	38	1,04	1,08	7600	11	
P2VP-PEO8	66	46	1,03	1,03	9200	13	13,5
P2VP-PEO10	54	34	1,09	1,10	7350	10	11,4
P2VP-PEO12	47	29	1,08	1,06	6400	9	

Dazu werden 250 μl einer Vesikeldispersion mit jeweils 250 μl einer 2 Gew% PEO 200-Lösung versetzt und homogenisiert. Nach einer Wartezeit von 10 Min. werden die Proben mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern NMR-spektroskopisch untersucht. Die Bilayerdicken werden an der Universität Freiburg mit Hilfe der Cryo-TEM bzw. in Hamburg mittels SANS Messungen bestimmt.

3.5.2 Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten

3.5.2.1 Untersuchung des Austauschverhaltens von Wasser

Zur Untersuchung des Austauschverhaltens von Wasser aus Vesikeln werden 500 μl einer Vesikeldispersion mittels ^1H -PFG-NMR mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern untersucht.

3.5.2.2 Einfluss des hydrodynamischen Radius der chemischen Sonde

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Austauschverhaltens vom hydrodynamischen Radius der verwendeten chemischen Sonde werden zu 250 μl einer Vesikeldispersion jeweils 250 μl einer 2 Gew% PEO-Lösung gegeben. Die Molmasse der verwendeten PEOs wird von 200 bis 400000 g/mol variiert.

Die Proben mit PEO bis zu einer Molmasse von 10000 werden mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern NMR-spektroskopisch untersucht. Höhere Molmassen von 12000 bis 400000 werden mit Hilfe der neu entwickelten zeitaufgelösten Messmethode und folgenden Parametern untersucht:

$$G = 132 \text{ G/cm}, \Delta = 100 \text{ ms}, \delta = 1,2 \text{ ms}, \text{scans} = 4, \text{Experimente} = 50$$

3.5.2.3 Einfluss der Polarität der chemischen Sonde

Da Polyvinylalkohol (PVA) nur in hohen Molmassen käuflich zu erwerben ist, wird versucht PVA mit einer Molmasse von 2000 g/mol mittels Ultraschall partiell abzubauen. Dazu wird eine 2 Gew% PVA 2000-Lösung jeweils 5 und 15 Min. mit 50 W, 65 W und 80 W Leistung beschallt. Der hydrodynamische Radius dieser Proben wird jeweils mit Hilfe einer ^1H -PFG-NMR-Messung und folgenden Parametern bestimmt:

$$G = 2-200 \text{ G/cm}, \Delta = 100 \text{ ms und } \delta = 1,2 \text{ ms}$$

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Freisetzung von der Polarität der chemischen Sonde werden jeweils 250 μl Vesikeldispersion mit 250 μl PVA-Lösung mit unterschiedlichen Molmassen vermischt und NMR-spektroskopisch mit der zeitaufgelösten Messmethode und folgenden Parametern untersucht:

$$G = 100 \text{ G/cm}, \Delta = 100 \text{ ms}, \delta = 1,2 \text{ ms}, \text{scans} = 4, \text{Experimente} = 50.$$

3.5.2.4 Weitere chemische Sonden

Da die hergestellten Vesikel als Wirkstoffträgersysteme dienen sollen, wird das Freisetzungsverhalten von drei Wirkstoffmodellsubstanzen untersucht. Dazu werden zu einer Vesikeldispersionen (250 μl) jeweils 250 μl 2 Gew% Glukose-, Inulin- bzw. Dextranlösung gegeben und die Mischung homogenisiert. Die Proben werden sowohl mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern als auch mit der zeitaufgelösten Messmethode (siehe Kapitel 3.4) mit folgenden Parametern NMR-spektroskopisch untersucht:

$$G = 80 \text{ G/cm}, \Delta = 100 \text{ ms}, \delta = 1,2 \text{ ms}, \text{scans} = 4, \text{Experimente} = 50.$$

3.5.3 Einfluss von Additiven auf das Austauschverhaltens

Es ist bekannt, dass Alkohole z. B. Ethanol eine „aufweichende“ Wirkung auf Membranen haben. Dieser Einfluss wird mit Hilfe der ^1H -PFG-NMR untersucht. Dazu wird zuerst das Austauschverhalten von Wasser in einer Vesikeldispersion bestimmt, indem 500 μl der Lösung mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Standardparametern NMR-spektroskopisch untersucht werden. Anschließend wird in definierten Schritten Ethanol zu der Vesikeldispersion hinzu gegeben, die Lösungen gut vermischt und vermessen. Diese Prozedur wird bis zur Aufklärung der Lösung, was einer Zerstörung der Vesikel gleichzusetzen ist, fortgeführt.

Zur Überprüfung, ob es sich bei diesem Aufweichprozess um einen reversiblen Prozess handelt, werden 150 μl Vesikeldispersion mit 150 μl Ethanol versetzt und anschließend sukzessive mit jeweils 100 μl Pufferlösung verdünnt und vermessen.

Um den Einfluss von Chloroform auf die Permeabilität der Vesikelmembran zu untersuchen wird eine Vesikelprobe (300 μl) mit 50 μl Chloroform versetzt und mit den unter Kapitel 3.3 angegebenen Parametern ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht. Nach diesen Messungen wird das Chloroform mittels Abdampfen entfernt und die Probe erneut vermessen.

3.5.4 Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten

3.5.4.1 Einfluss der Temperatur

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der mittleren Verweildauer von Wasser bzw. PEO 200 (für Vesikel aus P2VP-PEO) in den Vesikeln werden 500 μl Vesikeldispersionen im NMR-Spektrometer für 30 Min. auf die jeweilige Versuchstemperatur (21, 25, 30, 35 und 37°C) temperiert. Anschließend werden pro Temperatur zwischen 21°C und 37°C jeweils drei NMR-Messreihen mit je fünf Diffusionszeiten Δ zwischen 100 und 300 ms in Schritten von 50 ms durchgeführt.

3.5.4.2 Einfluss des pH-Werts

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der mittleren Verweildauer von Wasser bzw. PEO 200 in den Vesikeln vom pH-Wert der Lösung werden 250 µl einer Vesikeldispersion mit Tris-Pufferlösung versetzt um den entsprechenden pH-Wert zwischen pH 4 und pH 9 einzustellen. Anschließend werden jeweils drei NMR-Messreihen mit je fünf Diffusionszeiten Δ zwischen 100 und 300 ms durchgeführt (siehe Kapitel 3.3).

3.6 Verwendete Chemikalien und Geräte

3.6.1 Verwendete Chemikalien

P2VP-PEO	alle Blockcopolymere
PI-PEO	werden an der Universität
PB-PEO	Hamburg, AK Förster
PLA-PEO	synthetisiert
Polyethylenglycol 200	Aldrich
Polyethylenglycol 300	Aldrich
Polyethylenglycol 400	Merck
Polyethylenglycol 600	Merck
Polyethylenglycol 1000	Merck
Polyethylenglycol 1300	AK Förster, Hamburg
Polyethylenglycol 1450	AK Förster, Hamburg
Polyethylenglycol 1500	Aldrich
Polyethylenglycol 2000	Merck
Polyethylenglycol 2150	AK Förster, Hamburg
Polyethylenglycol 3400	AK Förster, Hamburg
Polyethylenglycol 8000	Fluka
Polyethylenglycol 10000	Merck
Polyethylenglycol 12000	Fluka
Polyethylenglycol 35000	Serva
Polyethylenglycol 100000	Serva
Polyethylenglycol 400000	Serva
Polyvinylalkohol 2000 p.A.	Merck
Polyvinylalkohol 22000 p.A.	Merck
Polyvinylalkohol 72000 p.A.	Merck
Dextran 70000	Fluka
D(+)-Glukose	Riedel de Haën
Inulin 5000	Fluka

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.A.	Merck
Chloroform > 99% mit 2-Methyl-2-buten stabilisiert	Merck
Chloroform > 99% mit 0,75% Ethanol stabilisiert	Baker
Ethanol absolut	BDH ProLabo
Methanol > 99,8%	Baker

3.6.2 Verwendete Geräte

Digitalkamera	Olympus Digitalkamera C-5060
DNM	<p>Universalmikroskop BIOLAR (<i>PZO</i>, Polen): 10x Objektiv NA: 0,24 Achromat <i>PZO</i>, 40x Objektiv NA: 0,75 Wasserimmersion Achromat <i>LOMO</i> Dunkelfeldkondensator NA: 1,2 – 1,4 Ölimmersion Typ: Kardiod <i>PZO</i> Halogenlampe 24V / 250W <i>Osram</i> C-Mount 1x <i>PZO</i> CCD-Kamera: KP-F1 <i>Hitachi</i>, Japan effektive Pixel: 782(H) x 582(V), Pixelgröße 8,3 x 8,3 µm, 1/25 s/Bild Bildverarbeitungskarte: Oculus F/64-DSP <i>Coreco</i>, Kanada Bildverarbeitungssoftware: PicColor, <i>FIBUS</i>, Düsseldorf, Deutschland</p>
Extruder	LiposoFast™ der Firma Avestin Inc. (Kanada)
NMR	Bruker Avance 400 Spektrometer (Bruker AG, Karlsruhe, Germany) ausgestattet mit einem BAFPA 40 gradient amplifier und einem Bruker DIFF30 Probenkopf.
Phasenkontrastmikroskopie	Großfeldmikroskop „ORTHOPLAN“ der Firma Leitz (Wetzlar). Objektive: 40 fach, NA 0,70 bzw. Ölimmersionsobjektiv 100 fach, NA 1,32
Ultraschallfingerring	Firma Branson, Typ Digital Sonifier W450D, Mikrotip 1/8“ mit 3 mm Durchmesser, Eintrittsfläche ≈ 7,1 mm ²
Ultraschallbad	Firma Bandelin, Sonorex RK510 Transistor, 50KHz Frequenz

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung der Vesikelsysteme

4.1.1 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus P2VP-PEO

Die ersten Vesikel aus dem Blockcopolymer P2VP-PEO, welche mit Hilfe der unter Kapitel 3.2.1 beschriebenen Chloroform-Methode dargestellt werden, weisen einen mittleren Durchmesser von 100 nm auf, wobei die Polydispersität PD_2 von 0,08 bzw. 0,28, in Abhängigkeit vom verwendeten Blocklängenverhältnis des Blockcopolymers, variiert. Durch anschließendes Aufarbeiten der Vesikeldispersion mit Hilfe der Extrusion sollte die Morphologie der Vesikel verändert werden. Normalerweise führt eine Aufarbeitung mittels Extrusion sowohl zu einer Verkleinerung der Vesikel als auch zu unilamelaren Bilagern. Da die hergestellten Vesikel allerdings schon eine sehr geringe Größe und Polydispersität aufweisen, wird diese Veränderung nicht beobachtet. Die extrudierten Vesikel weisen immer noch einen Durchmesser von ca. 100 nm mit einer Polydispersität zwischen 0,14 und 0,29 auf.

Die neuartige „Tintenstrahldrucker“-Methode führt ebenfalls zu Vesikeln. Untersuchung mit Hilfe der DLS ergeben Größen im Bereich von 50 nm mit Polydispersitätswerten $< 0,2$.

Die Stabilität der Vesikel aus P2VP-PEO wird sowohl an der Universität Hamburg mit Hilfe der DLS, als auch an der Universität Duisburg-Essen mit Hilfe der DNM untersucht.

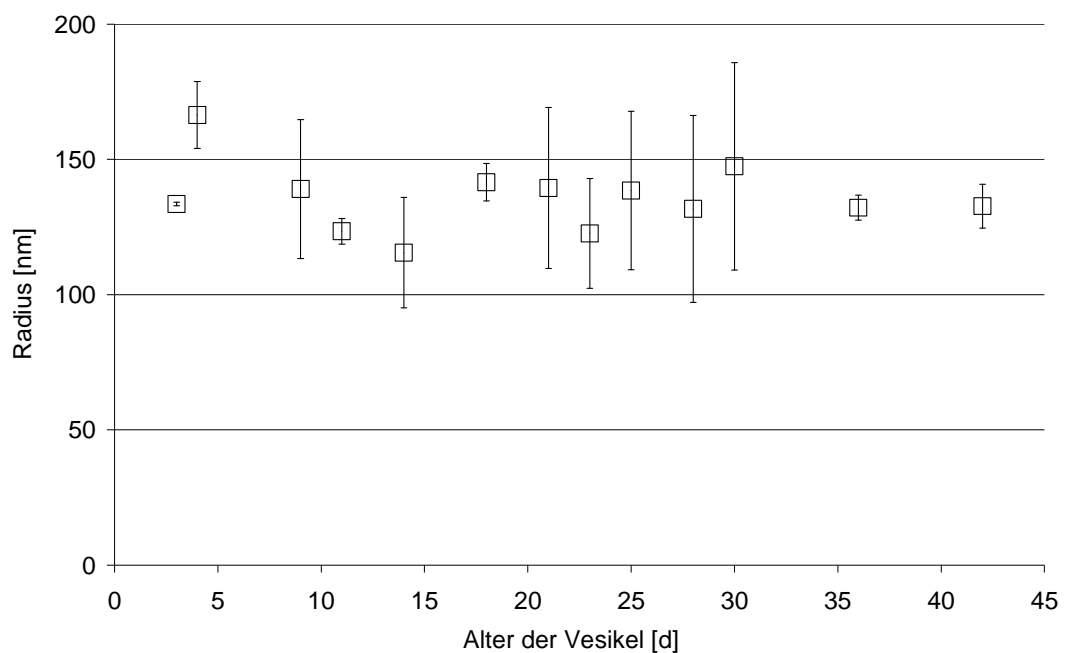


Abbildung 4.1: Stabilität der Vesikel aus P2VP-PEO^[91]

Es zeigt sich, dass Vesikel aus P2VP-PEO (sowohl 8 als auch 10) bei Raumtemperatur über mehrere Wochen stabil bleiben. Die Größe verändert sich dabei nur minimal, wie anhand der Abbildung 4.1 exemplarisch für Vesikel aus P2VP-PEO 10 gezeigt wird.^[91]

4.1.2 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PI-PEO^[92]

Voruntersuchungen an der Universität Hamburg zeigen, dass die „Tintenstrahldrucker“-Methode beim Blockcopolymer PI-PEO sowie beim PLA-PEO nur schwer anwendbar ist. Daher werden für beide Polymere andere Darstellungsmethoden auf ihre Tauglichkeit hin untersucht.

Im Fall des PI-PEOs erhält man unter der Anwendung der Chloroform-Methode mit den im Kapitel 3.2.2 angegebenen Versuchsbedingungen Vesikel mit einem Radius von 120 nm bis 170 nm, ermittelt mittels DNM und ¹H-PFG-NMR-Messungen.

Im Gegensatz zu Vesikeln aus P2VP-PEO können Vesikel aus PI-PEO mittels Extrusion verändert werden. So verkleinert sich der Radius einer Vesikeldispersion von 170 nm auf 85 nm. Allerdings verändert sich die Morphologie der Vesikel ebenfalls stark durch die Extrusion. Während die Vesikeldispersion vor der Extrusion monodisperse, unilamellare Vesikel aufweist, wie anhand des Cryo-Tem-Bildes in Abbildung 4.2 links verdeutlicht, zeigen Vesikel nach der Extrusion eine starke Änderung (siehe Abbildung 4.2 rechts). Hier zeigen sich vor allem multilamellare und deformierte Vesikel.

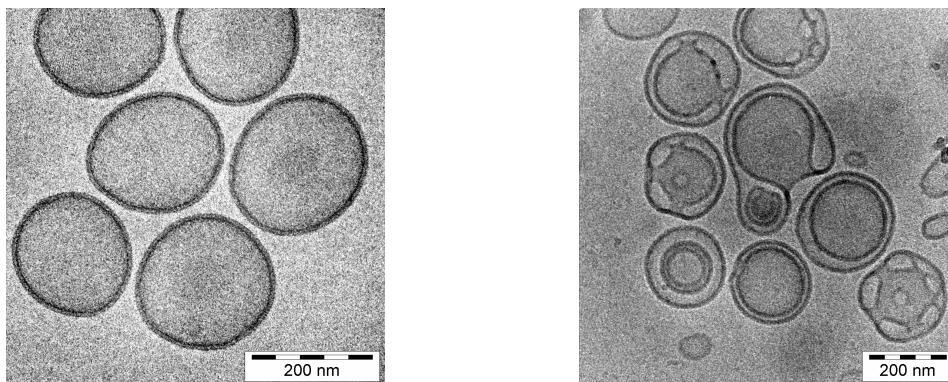


Abbildung 4.2: Cryo-TEM-Aufnahmen von Vesikeln aus PI-PEO vor (links) und nach Extrusion (rechts)

Wie sich anhand der Abbildung 4.3 und der dazugehörigen Tabelle 8.6 (siehe Anhang) zeigen lässt, hängt bei der Chloroform-Methode die Größenverteilung der Vesikel von der verwendeten Polymermenge ab. Tendenziell nimmt mit zunehmender Konzentration des Blockcopolymers in der wässrigen Lösung die mittlere Größe der Vesikel ab.

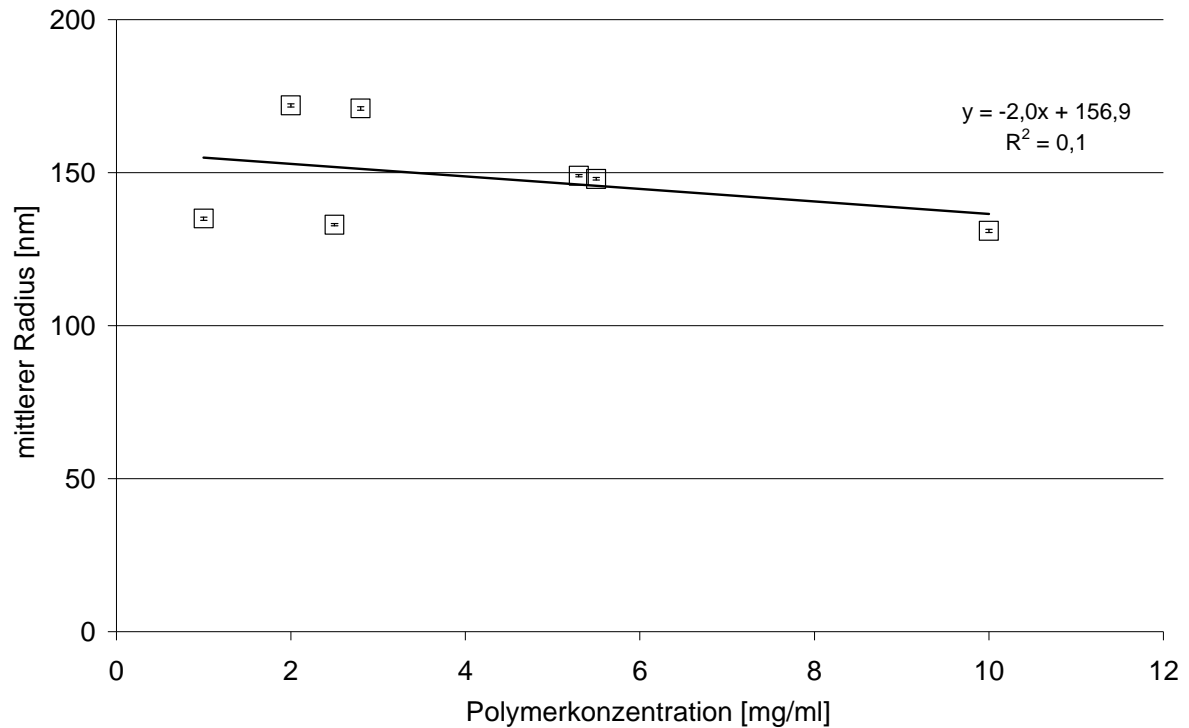


Abbildung 4.3: Abhängigkeit der Vesikelradien von der Polymerkonzentration bei der Chloroform-Methode

Durch die Anwendung der Wasser-Quell-Methode entstehen Vesikel mit einem Radius zwischen 130 nm und 160 nm. Auch hier hängt die Größe der gebildeten Vesikel von der Konzentration des verwendeten Blockcopolymers ab, wie anhand der Abbildung 4.4 und der dazugehörigen Tabelle 8.7 im Anhang deutlich zu erkennen ist.

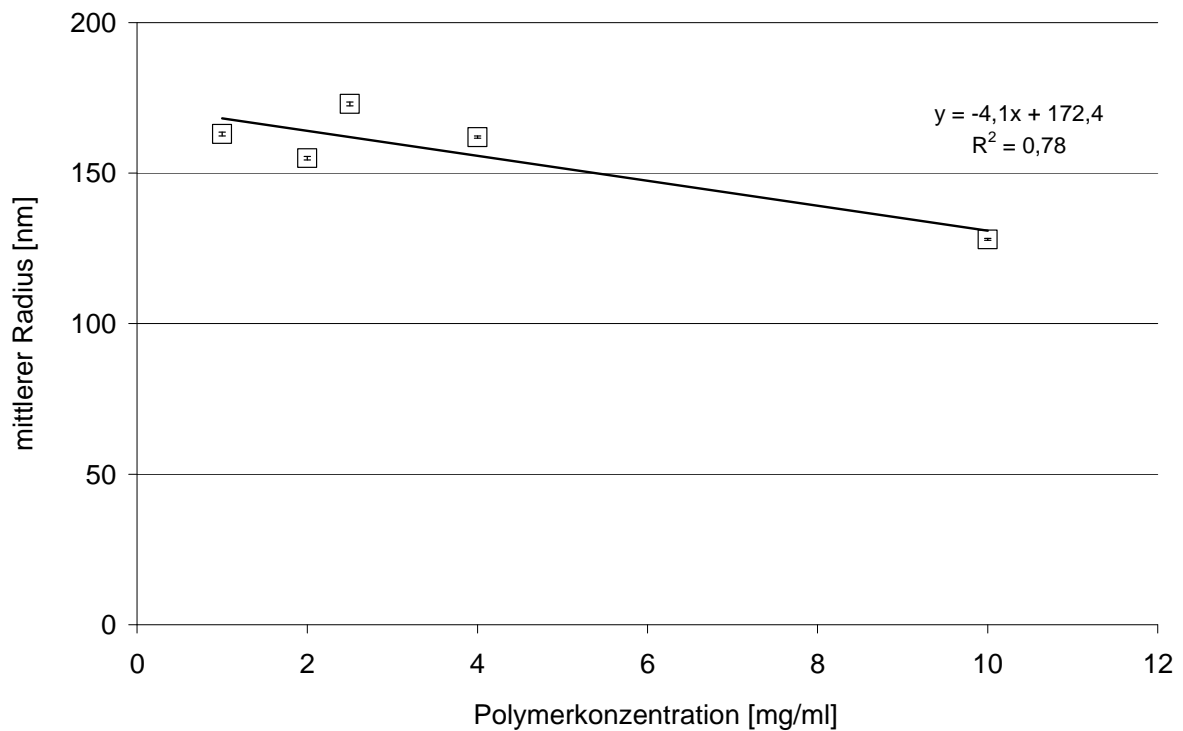


Abbildung 4.4: Abhängigkeit der Vesikelradien von der Polymerkonzentration bei der Wasser-Quell-Methode

Vesikel, die mit Hilfe der Film-Hydratationsmethode dargestellt werden, weisen einen mittleren Radius von 130 nm auf. Eine DLS-Messung, welche zusätzlich an einer Probe durchgeführt wird, bestätigt im Rahmen der üblichen Messungengenauigkeiten die gefundenen Ergebnisse der DNM.

Zur optimalen Durchführung der „Tintenstrahldrucker“-Methode wird eine Reihe von Lösungsmitteln getestet. Wird das Blockcopolymer PI-PEO18.2 in Acetonitril oder Alkoholen wie Isopropanol, Ethanol oder Methanol gelöst, so zeigt sich bei den Lösungen der Tyndall-Effekt. Echte Lösungen lassen sich nur mit Tetrahydrofuran (THF) oder Aceton erzeugen. Setzt man unpolare Lösungsmittel wie Chloroform ein, so bildet sich nach dem Druck eine zweite Phase aus. Die Entstehung der Vesikel entspricht dann eher der Chloroform-Methode. Tabelle 8.8 im Anhang enthält Messdaten über eine Druckserie mit THF und mit Aceton als Lösungsmittel. Mit THF weisen die gebildeten Vesikel einen mittleren Radius von 150 nm auf, während in der gedruckten Acetonlösung die gefundenen Radien noch etwas größer sind.

Um die Stabilität der Vesikeldispersionen zu testen, werden fünf Ansätze nach einer Lagerung von einigen Tagen erneut mit Hilfe der DNM untersucht. Es zeigt sich, dass die Vesikel mit der Zeit kleiner werden.

4.1.3 Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus PLA-PEO^[92]

Die Bildung von Vesikeln aus dem Blockpolymer PLA-PEO erweist sich als schwierig. Es ist nur mit Hilfe der Chloroform-Methode gelungen, Vesikel, mit einem mittleren Radius von ca. 145 nm, darzustellen. Dabei wird besonders deutlich, wie leicht das Laktid biologisch abgebaut werden kann. Schon bei 25°C kommt es zu einer irreversiblen Umwandlung der Vesikel und die milchig-trübe Lösung klärt sich unter gleichzeitiger Bildung von makroskopisch sichtbaren Fäden. Diese werden filtriert, die verbleibende Lösung wird eingetrocknet und beide Rückstände werden ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Es zeigt sich, dass sowohl die klare Lösung selbst, als auch die Fäden das Blockcopolymer enthalten (siehe Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6).

Wie in der Literatur beschrieben, können im ¹H-NMR Spektrum insgesamt vier Signale für das Blockcopolymer beobachtet werden. Das Singulett im Bereich von 3,6 ppm ist charakteristisch für die Methylengruppen der PEO-Blöcke. Bei 5,2 ppm und 1,5 ppm erscheinen die Methylen- und Methylgruppen der PLA-Blöcke. Die Methylenprotonen des PEOs an der Verknüpfung zwischen den Blöcken können zusammen mit den OH-Endgruppen des PLAs bei 4,3 ppm beobachtet werden^[94, 95].

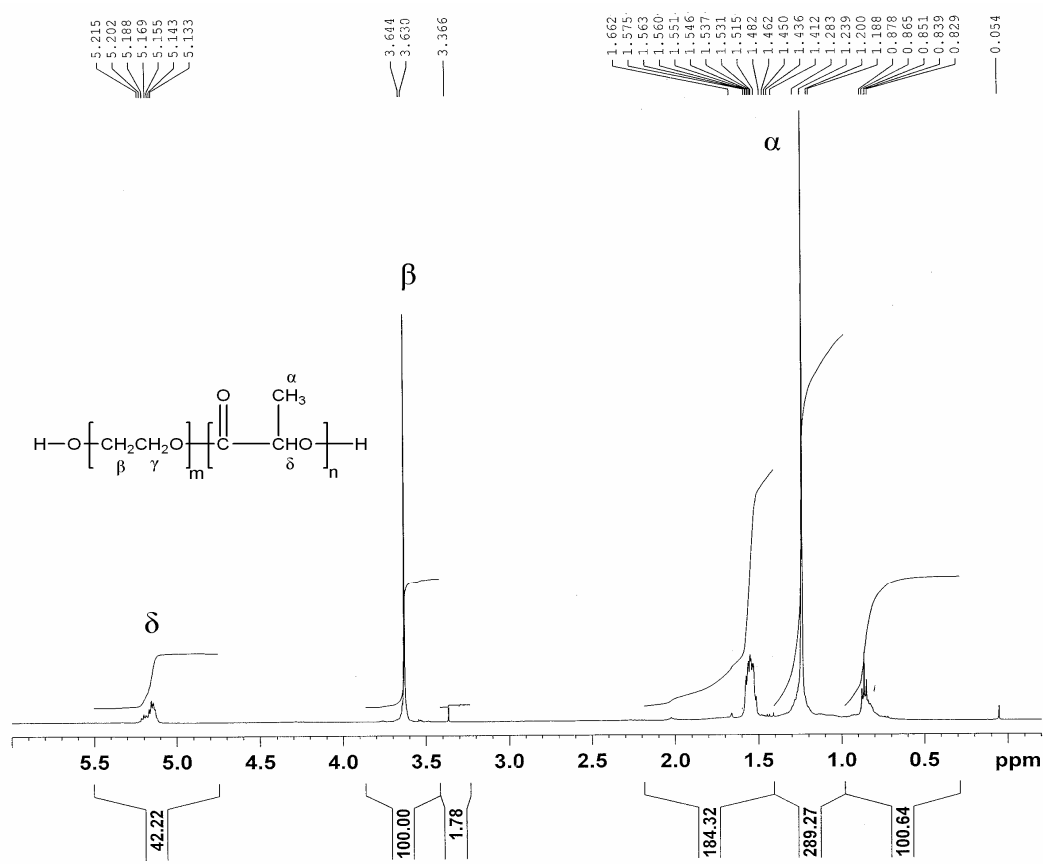


Abbildung 4.5: Fäden der wässrigen Phase gelöst in CDCl_3

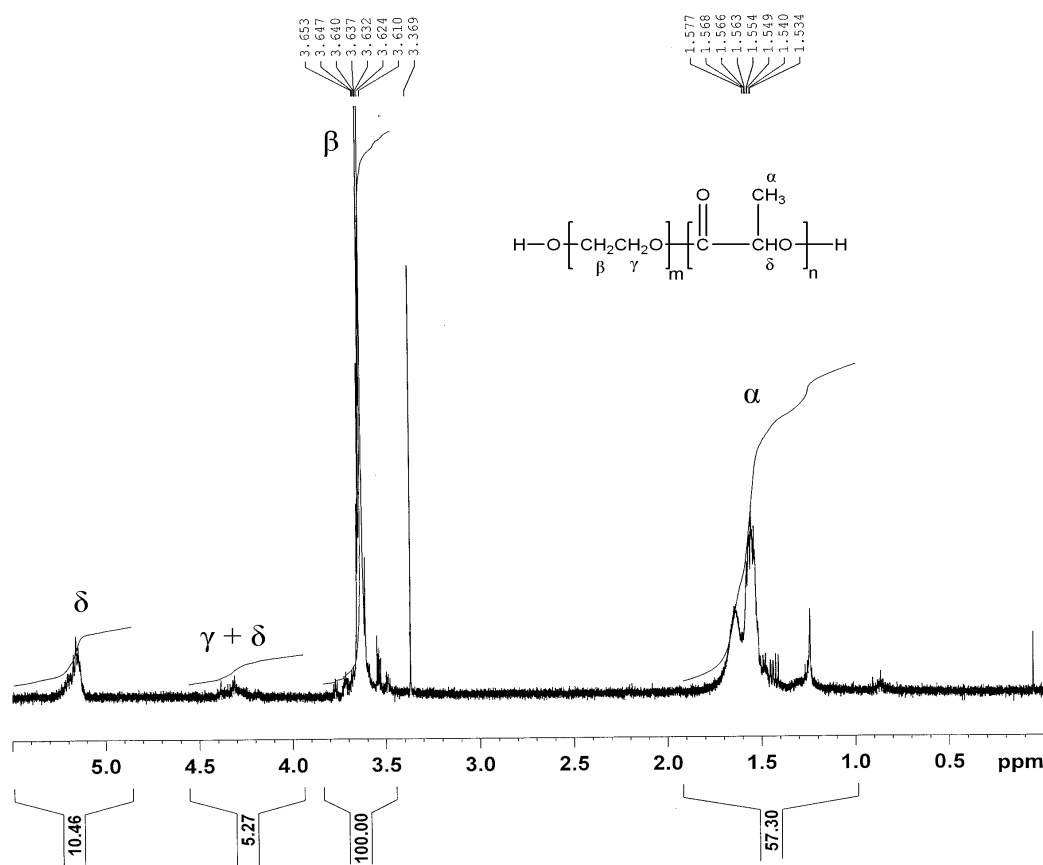


Abbildung 4.6: Rückstand der wässrigen Phase gelöst in CDCl_3

4.2 Untersuchungen mit gepulster Feldgradienten-NMR

Während der ersten Messungen von Vesikeldispersionen aus P2VP-PEO10 mit PEO 200 als Sonde fallen neben den Signalen der Sonde und des Lösungsmittels (Wasser) auch Ethanolsignale an. Dieses Problem tritt durch das zu diesem Zeitpunkt verwendete Chloroform auf, da dieses mit 0,75% Ethanol stabilisiert ist. Problematisch dabei ist, dass das Signal der CH₂-Gruppe des Ethanols durch die Signale der CH₂-Gruppe des Polyethylenoxides bei ca. 3,7 ppm vollständig überlagert wird, so dass keine eindeutige Auswertung des Signals des PEOs möglich ist (siehe Abbildung 4.7).

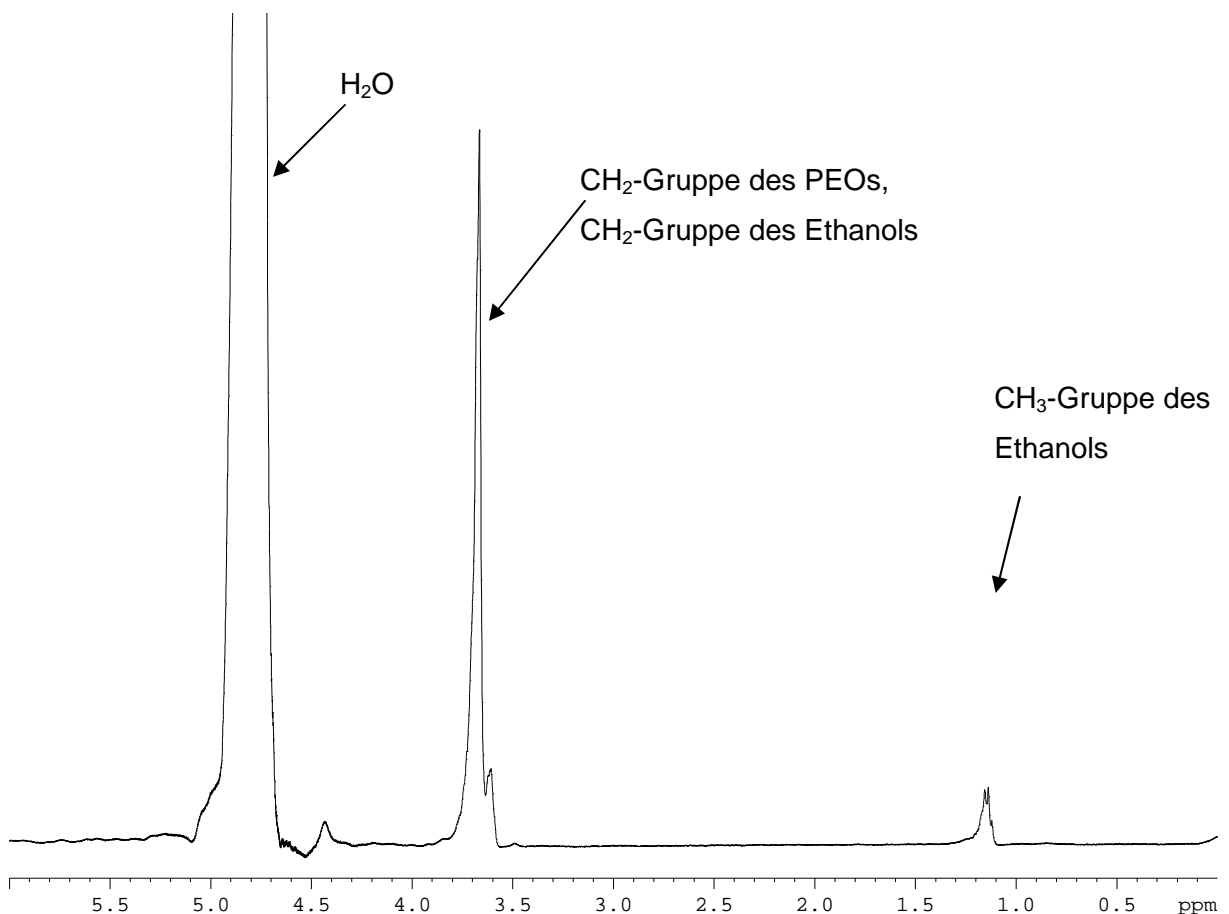


Abbildung 4.7: ¹H-Spektrum einer Vesikeldispersion mit PEO 200 als Sonde und Ethanolverunreinigungen

Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Vesikeldarstellung Chloroform mit 2-Methyl-2-buten als Stabilisator verwendet.

Auch bei der Anwendung der „Tintenstrahldrucker“-Methode tritt bei manchen Proben dasselbe Problem auf, wie bei den mit Hilfe der Chloroform-Methode hergestellten Vesikeldispersionen. Da das P2VP-PEO in Ethanol gelöst und dann in Wasser „gedruckt“ wird, ist auch hier im Fall der durchgeführten ¹H-PFG-NMR-Messungen ein Ethanolsignal zu erkennen. Dieses führt in manchen Fällen dazu, dass die Messungen nicht ausgewertet werden können (analog zu Abbildung 4.7).

In einigen Fällen kommt es allerdings auch vor, dass die beiden Signale, wie in Abbildung 4.8 zu erkennen, getrennt vorliegen, so dass eine Auswertung des CH₂-Signals der PEO-Sonde möglich ist.

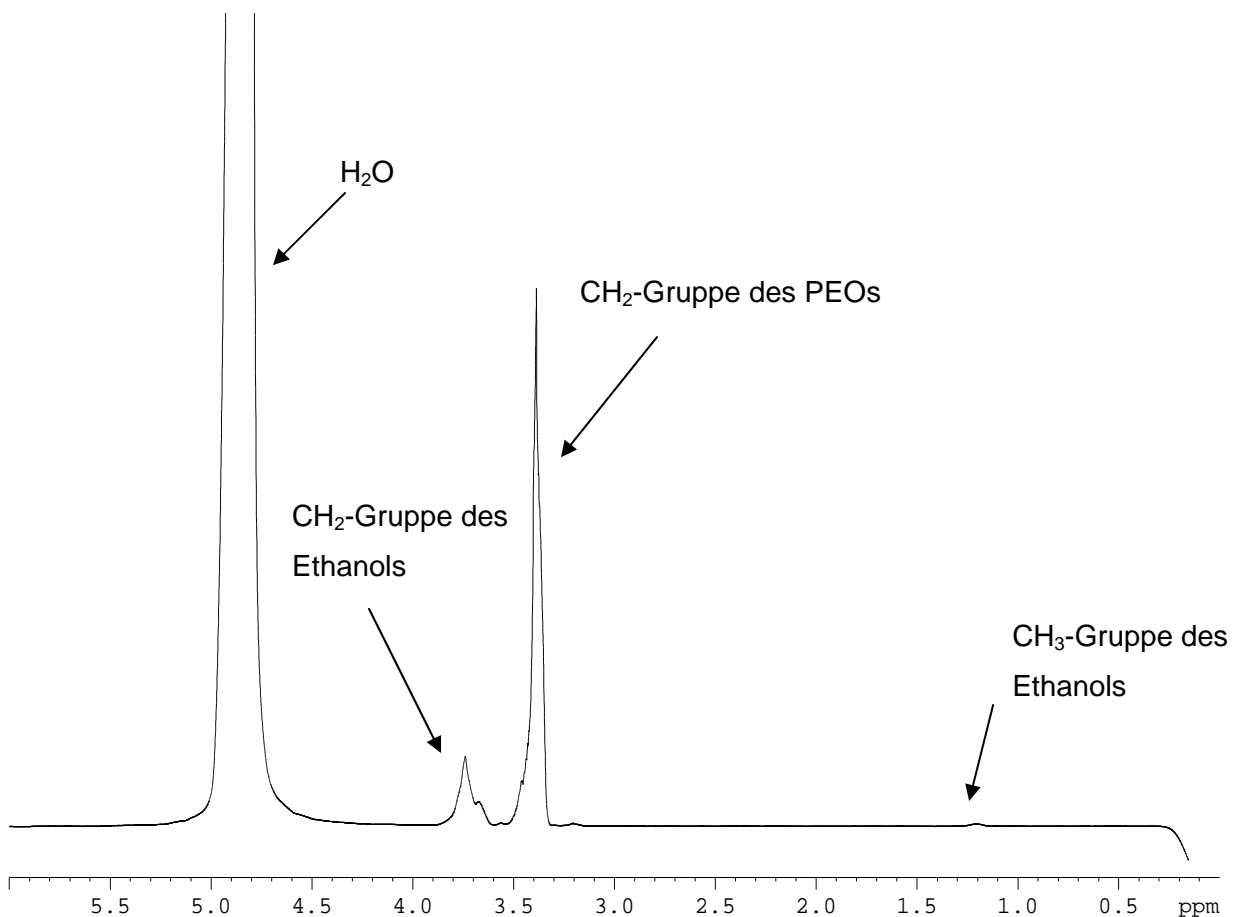


Abbildung 4.8: ¹H-NMR Spektrum einer Vesikeldispersion und mit PEO 200 als Sonde

Da nicht genau geklärt werden kann, wann die Signale des PEO und des Ethanols überlagern, werden die meisten ¹H-PFG-NMR-Untersuchungen mit Vesikeln durchgeführt, die mit der Chloroform-Methode mit Amylen-stabilisiertem Chloroform hergestellt werden.

4.3 Austauschverhalten aus P2VP-PEO Vesikeln

Zu Beginn dieser Arbeit steht nur das Blockcopolymer Poly(2-vinylpyridin-*block*-ethylenoxid) (P2VP-PEO) zur Verfügung. Aus diesem Grunde werden die wichtigsten Untersuchungen an Vesikeln aus diesem Polymer durchgeführt, obwohl sich sehr früh zeigt, dass die Membranen dieser Vesikel sehr durchlässig sind. Trotzdem werden alle Grundlagenuntersuchungen, wie die Untersuchung der Abhängigkeit des Freisetzungsverhaltens von den Eigenschaften der Vesikel (Größe, Bilayer), von den verwendeten chemischen Sonden und von den Versuchsbedingungen, hauptsächlich an diesem Polymer durchgeführt. Dazu werden verschiedene chemische Sonden verwendet, da der Wasseraustausch durch die Vesikelmembran so schnell ist, dass keine mittlere Verweildauer detektiert werden kann (siehe Abbildung 4.9).

Sie liegt somit im Bereich < 10 ms.

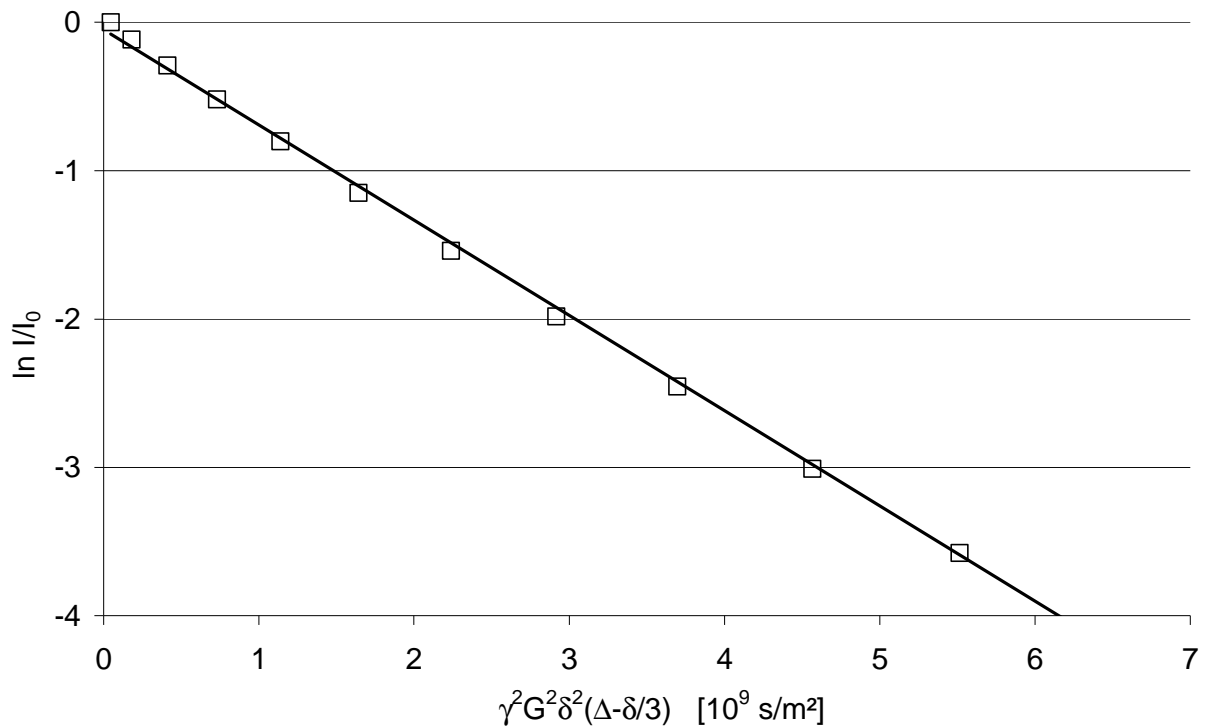


Abbildung 4.9: Zerfallskurve des Wassers in Vesikeln aus P2VP-PEO

4.3.1 Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten

4.3.1.1 Einfluss des Radius

Zur Untersuchung des Einflusses der Größe der Vesikel auf das Austauschverhalten werden Vesikel aus P2VP-PEO10 mit acht verschiedenen Radien mit Hilfe von PEO 200 ($R_H = 0,43$ nm) als Sonde untersucht. Es kann kein Einfluss der Vesikelgröße auf die mittlere Verweildauer von PEO 200 in den Vesikeln, wie durch Abbildung 4.10 und Tabelle 4.1 verdeutlicht wird, gezeigt werden.

Tabelle 4.1: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit vom Radius der Vesikel

R_H	$D_a [10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}]$	$D_b [10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}]$	$\tau_b [\text{s}]$	$k_{\text{ex}} [1/\text{s}]$	$p_b [\%]$
50,7	$6,0 \pm 0,03$	$4,8 \pm 0,3$	$0,37 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,01$
60,8	$5,5 \pm 0,03$	$4,0 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,02$
69,7	$5,5 \pm 0,05$	$3,5 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,02$
127,7	$5,7 \pm 0,09$	$1,9 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,03$	$2,9 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,03$
137,1	$5,9 \pm 0,05$	$1,8 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,01$
195,7	$5,1 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,3$	$0,49 \pm 0,07$	$2,1 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,13$
235,6	$5,9 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,01$

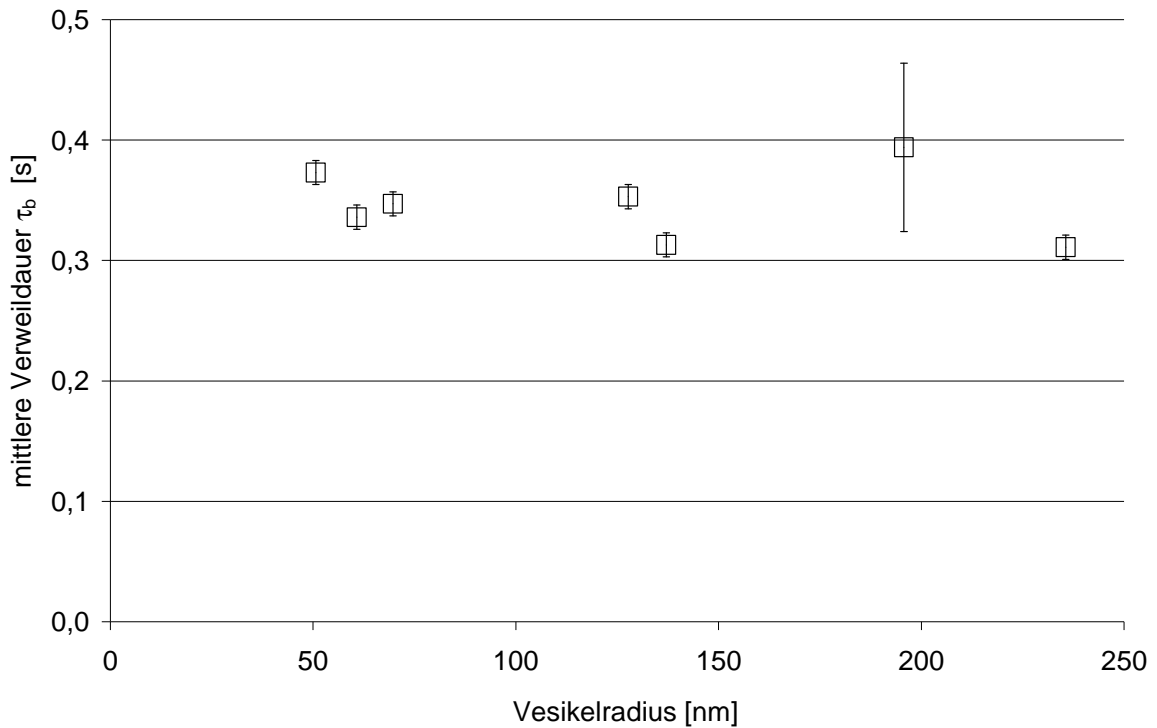


Abbildung 4.10: Abhängigkeit der mittleren Verweildauer von der Größe der verwendeten Vesikel für PEO 200

Da Untersuchungen an Liposomen eine andere Tendenz aufweisen, werden noch einmal Versuche mit einer „größeren“ Sonde (PEO 100000, $R_H = 10$ nm) durchgeführt. In diesem Fall kann, wie in der Abbildung 4.11 zu erkennen ist, eine Abhängigkeit der Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ von PEO 100000 von der Größe der Vesikel aus P2VP-PEO detektiert werden.

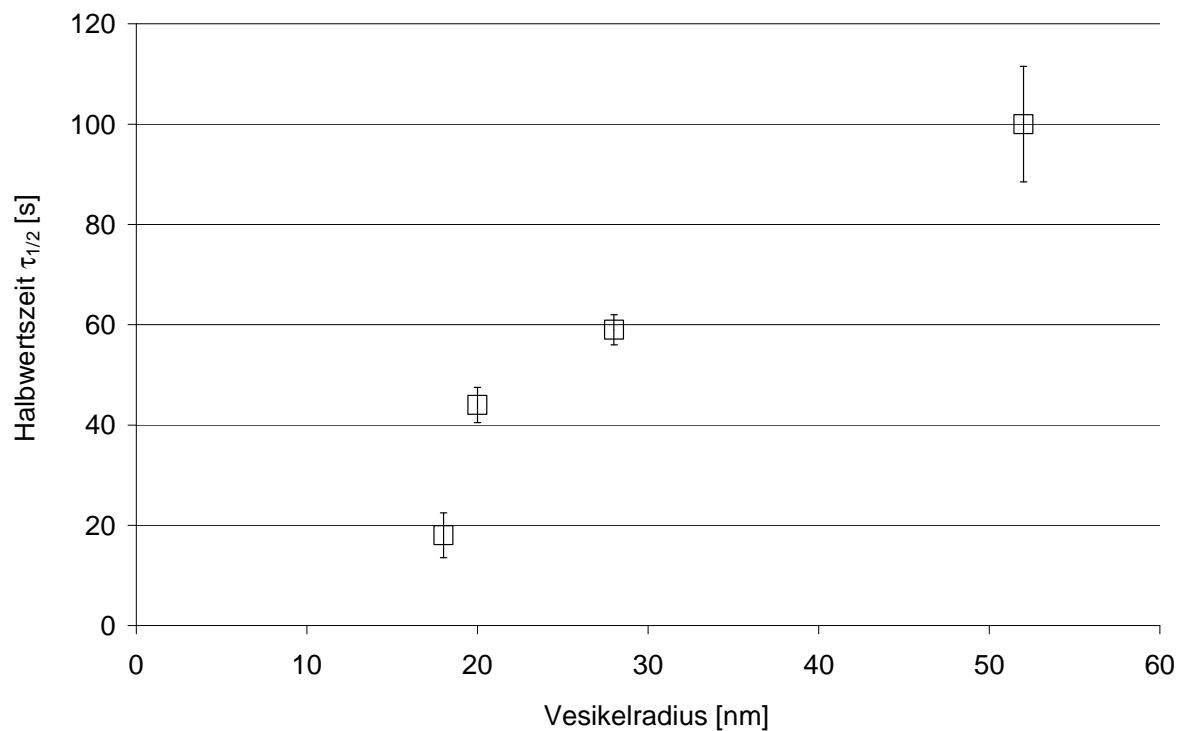


Abbildung 4.11: Abhängigkeit von $\tau_{1/2}$ von der Größe der verwendeten Vesikel für PEO 100000

Alle weiteren Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Werte für PEO 100000 in Abhängigkeit vom Radius der Vesikel

R_H	$\tau_{1/2}$ [s]	k_{ex} [10^{-03} 1/s]
18	18 ± 9	$38,5 \pm 20$
20	44 ± 7	$15,8 \pm 2,4$
28	59 ± 6	$11,7 \pm 2,3$
52	100 ± 23	$6,9 \pm 1,6$

Somit kann festgehalten werden, dass es eine Abhängigkeit der Austauschkonstante und daher auch der mittleren Verweildauer von der Größe der Vesikel gibt, diese allerdings nur mit sehr großen Sonden bestimmt werden kann.

4.3.1.2 Einfluss der Bilayerdicke

Die Dicke des Bilayers der Vesikel sollte ebenfalls einen Einfluss auf das Austauschverhalten haben. Aus diesem Grund werden Vesikel mit vier verschiedenen Bilayerdicken untersucht, welche mit Hilfe der „Tintenstrahldrucker“-Methode hergestellt werden, um einen Einfluss der Größe zu verhindern. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, sehr homogene Vesikeldispersionen herzustellen, welche sich bei verschiedenen Chargen nur gering in ihrer Größenverteilung unterscheiden. Dies wird auch durch die mit Hilfe der Zerfallsfunktion (siehe Kapitel 2.3.2) berechneten Werte für D_b (Diffusionskoeffizient der Vesikel) belegt (siehe Tabelle 4.3). Die Streuung dieser Werte ($3,2 \cdot 10^{-12}$ m²/s - $4,4 \cdot 10^{-12}$ m²/s, Faktor 1,4) ist ausreichend gering, so dass die Vesikeldispersionen untereinander vergleichbar sind, da die Größe der Vesikel übereinstimmt.

Tabelle 4.3: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit der Bilayerdicke der Vesikel

Bilayerdicke [nm]	D_a [10^{-10} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
9,0	$6,8 \pm 0,13$	$4,4 \pm 0,4$	$0,18 \pm 0,02$	$5,5 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,01$
10,0	$5,1 \pm 0,09$	$3,4 \pm 0,3$	$0,20 \pm 0,02$	$5,0 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,02$
11,4	$2,4 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,01$
13	$5,4 \pm 0,03$	$3,9 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,02$

Die Werte der Bilayerdicke werden an der Universität Hamburg mittels SANS sowie an der Universität Freiburg mittels cryo-TEM bestimmt. In der folgenden Abbildung 4.12 wird die Abhängigkeit der mittleren Verweildauer (τ_b) von der Bilayerdicke verdeutlicht. Man erkennt einen deutlichen linearen Zusammenhang zwischen der Bilayerdicke und τ_b .

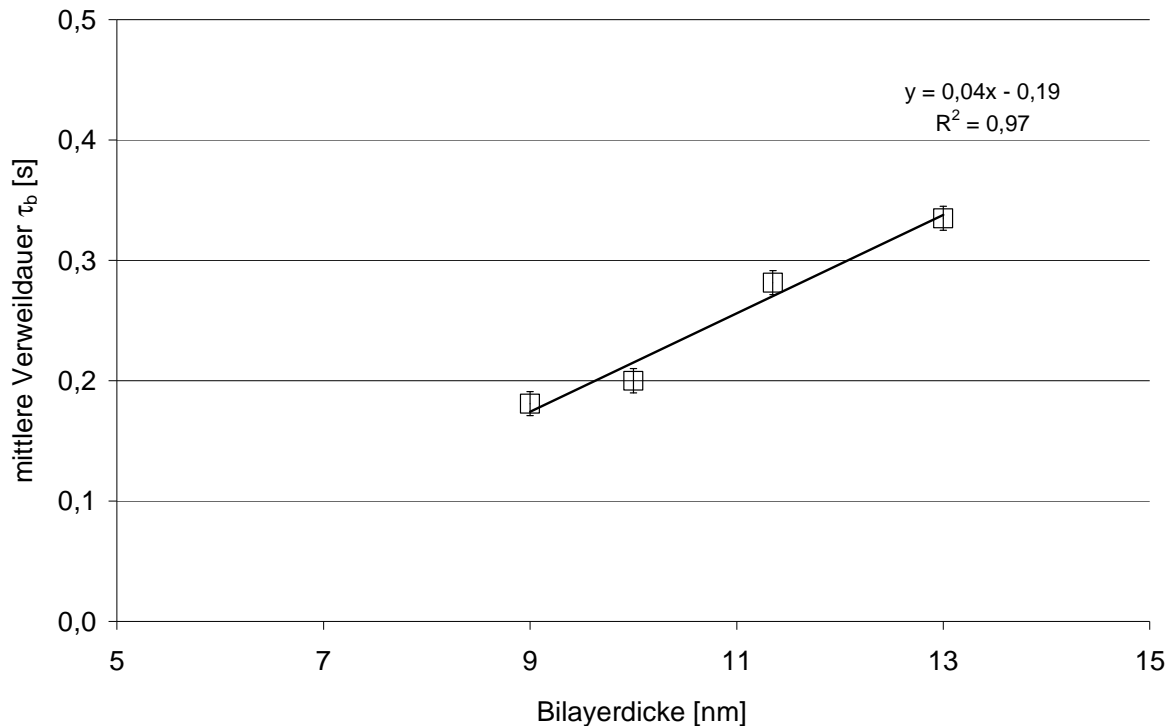


Abbildung 4.12: Abhängigkeit von τ_b von der Bilayerdicke der Vesikel aus P2VP-PEO

4.3.2 Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten

4.3.2.1 Einfluss des hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde

Voruntersuchungen von A. Rumplecker zeigen, dass es eine Abhängigkeit der mittleren Verweildauer vom hydrodynamischen Radius (R_H) der verwendeten Sonde gibt^[48]. Daher wird in dieser Versuchsreihe mit Hilfe von Vesikeln aus P2VP-PEO10 und PEO mit verschiedenen Molmassen diese Abhängigkeit genauer untersucht. Verwendet werden nur Vesikel einer Charge um einen verfälschenden Effekt aufgrund unterschiedlicher Größe zu verhindern. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.9 im Anhang sowie in Abbildung 4.13 zusammengefasst.

Es ist eindeutig eine Abhängigkeit der mittleren Verweildauer von der Größe der verwendeten Sonde zu erkennen, wobei allgemein gilt: je größer die Sonde desto langsamer der Austausch bzw. desto länger ist die mittlere Verweildauer in den Vesikeln.

4.3.2.2 Einfluss der Polarität der verwendeten Sonde

Neben der Größe der Sonden könnte auch die Polarität einen Einfluss auf die mittlere Verweildauer innerhalb der Vesikel haben. Aus diesem Grund wird in dieser Versuchsreihe das Austauschverhalten von Polyvinylalkohol (PVA), der eine andere Polarität als PEO aufweist, aus Vesikeln aus P2VP-PEO10 untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8.10 im Anhang zusammengefasst. Abbildung 4.14 verdeutlicht noch einmal die Abhängigkeit der Halbwertszeit vom hydrodynamischen Radius der PVA Sonde.

Auch hier ist, analog zum PEO, eine eindeutige Abhängigkeit der mittleren Verweildauer in den Vesikeln von der Größe der verwendeten Sonde zu erkennen.

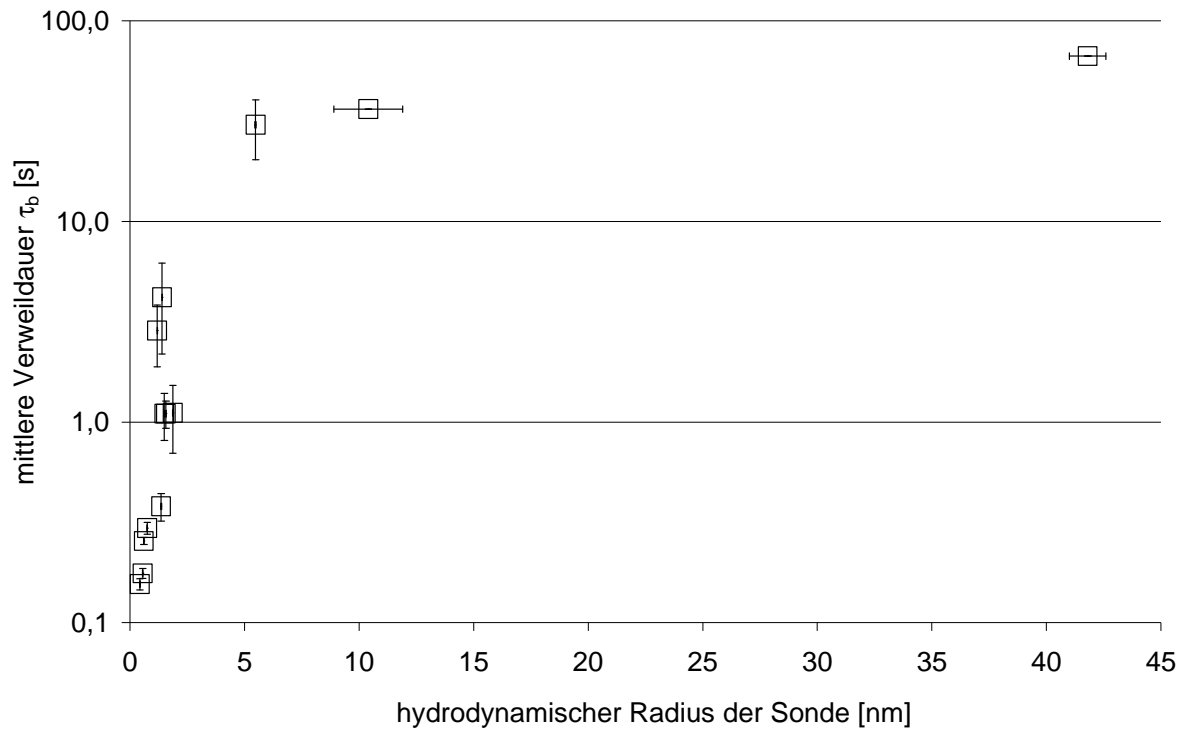


Abbildung 4.13: Abhängigkeit von τ_b vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde (PEO) für Vesikel aus P2VP-PEO

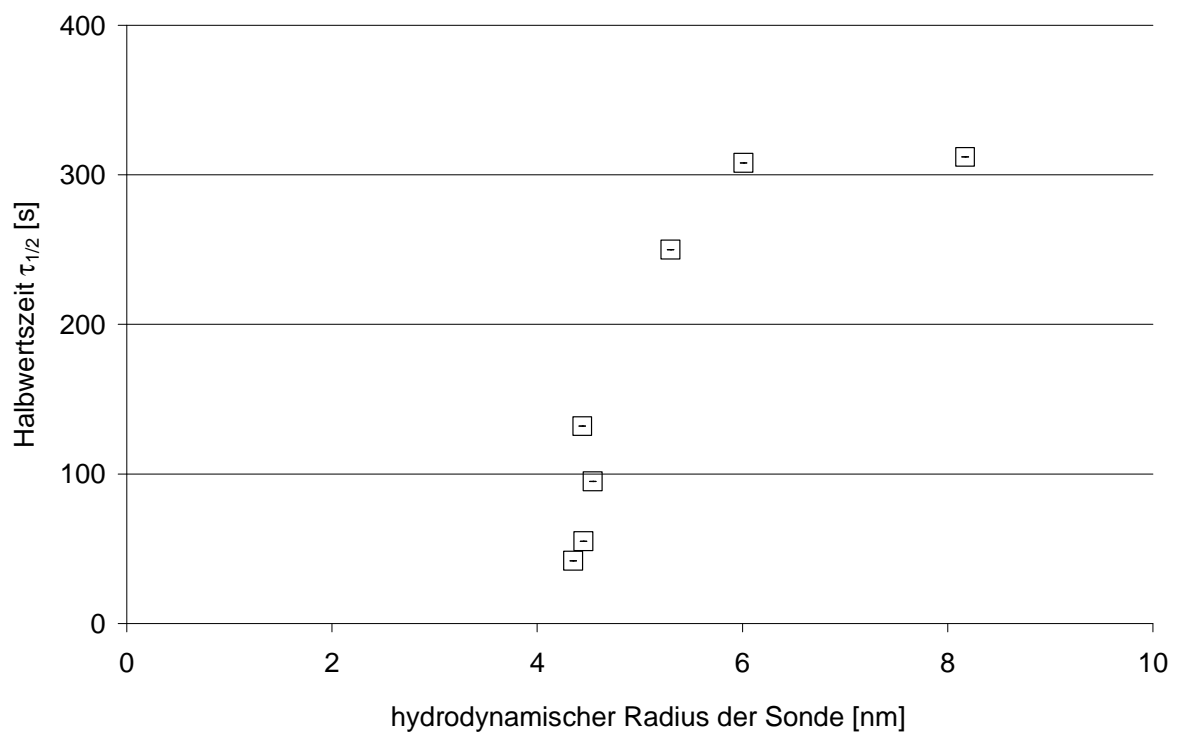


Abbildung 4.14: Abhängigkeit von $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde (PVA) für Vesikel aus P2VP-PEO

4.3.2.3 Weitere chemische Sonden

Da die untersuchten Vesikel als Wirkstoffträgersysteme eingesetzt werden sollen, wäre es sehr interessant zu wissen, wie sich das Austauschverhalten von Pharmazeutika darstellt. Dazu werden Glukose, Inulin und Dextran als Modellsubstanzen für solche Wirkstoffe untersucht. Auch in diesem Fall zeigt sich eine eindeutige Abhängigkeit der mittleren Verweildauer der Wirkstoffe in den Vesikeln vom hydrodynamischen Radius der Sonde (analog zu PEO und PVA). Je größer der Wirkstoff, desto größer ist τ_b (siehe Abbildung 4.15), wobei sich die mittlere Verweildauer in Vesikeln aus P2VP-PEO in folgender Reihenfolge erhöht:

Glukose ($\tau_b = 0,34 \text{ s} \pm 0,02 \text{ s}$, $R_H = 0,29 \text{ nm} \pm 0,004 \text{ nm}$) < Dextran ($\tau_{1/2} = 60 \text{ s} \pm 1,8 \text{ s}$, $R_H = 7,29 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$) < Inulin ($\tau_{1/2} = 180 \text{ s} \pm 14,4 \text{ s}$, $R_H = 110 \text{ nm} \pm 10,5 \text{ nm}$).

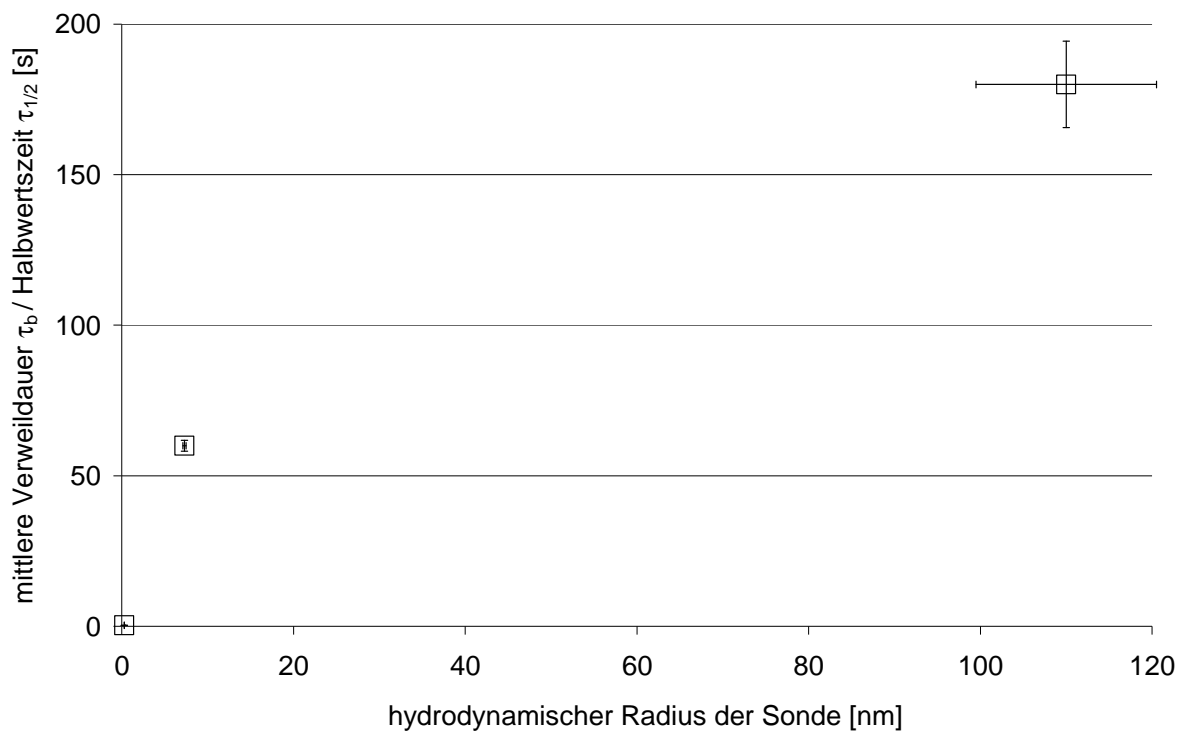


Abbildung 4.15: Abhängigkeit von τ_b bzw. $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Wirkstoffmodelle

4.3.3 Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten

Der Einfluss von Additiven auf die Permeabilität der Vesikelmembran wird anhand von zwei Beispielen untersucht. Dazu wird zum einen der Einfluss von Ethanol, zum anderen der Einfluss von Chloroform als Substanz, welche sich in der hydrophoben Schicht des Bilayers anlagern sollte, untersucht. Die Ergebnisse für den Einfluss von Ethanol auf die Permeabilität der Membran sind in Abbildung 4.16 sowie in der Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zunahme der Ethanolkonzentration bis 13 Vol% keinen Einfluss auf die mittlere Verweildauer τ_b von Ethanol zeigt. Bei einer höheren Konzentration

lösen sich die vorhandenen Vesikel auf. Wird die Ethanolkonzentration wieder verringert, so verringert sich gleichzeitig die mittlere Verweildauer von Ethanol in den Vesikeln.

Tabelle 4.4: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Ethanol in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus P2VP-PEO

Ethanolkonzentration [Vol%]	D_a [10^{-10} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
5,7	$8,8 \pm 0,03$	$4,4 \pm 0,4$	$0,25 \pm 0,03$	$4,0 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,03$
9,1	$8,6 \pm 0,02$	$4,8 \pm 0,3$	$0,24 \pm 0,02$	$4,2 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,03$
12,3	$8,2 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,1$	$0,26 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,01$
9,1	$8,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,01$	$4,7 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,01$
8,0	$8,9 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,3$	$0,23 \pm 0,03$	$4,3 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,01$
7,2	$9,2 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,4$	$0,19 \pm 0,02$	$5,3 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,01$
6,5	$9,4 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3$	$0,18 \pm 0,02$	$5,6 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,01$

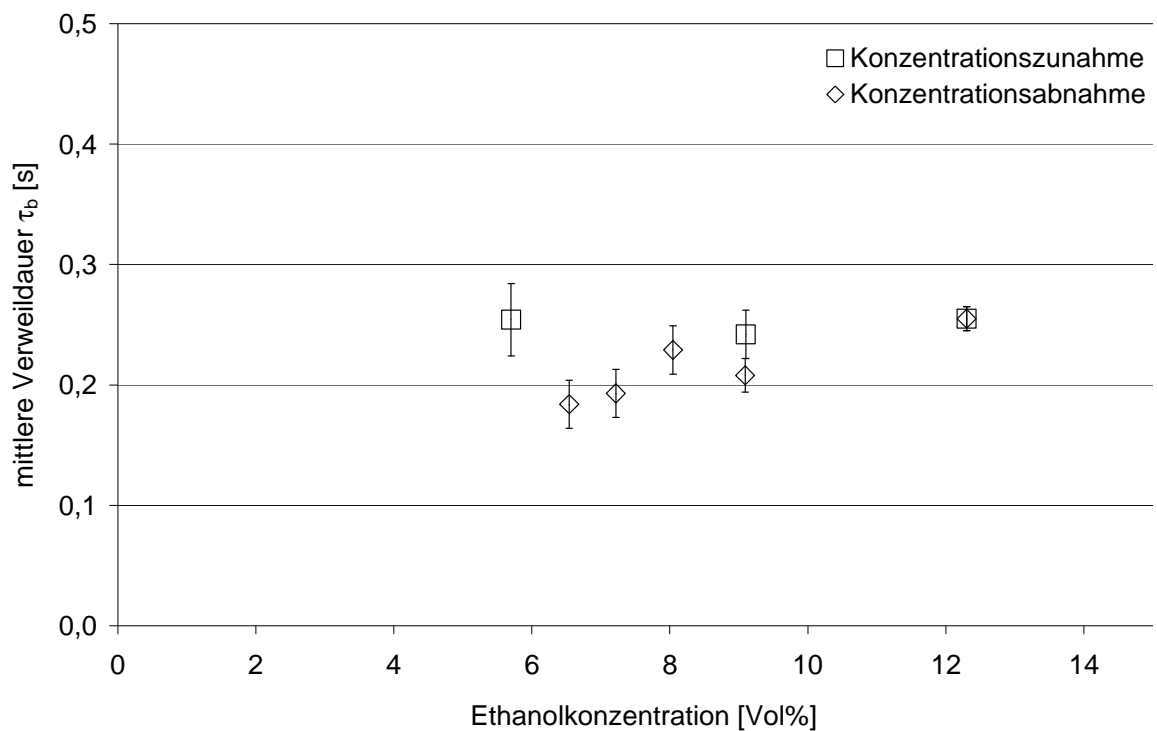


Abbildung 4.16: Abhängigkeit von τ_b von Ethanol in Vesikeln aus P2VP-PEO von der Ethanolkonzentration

Zusätzlich ist anhand der Werte für D_b und p_b zu ersehen, dass die Vesikel über diesen Konzentrationsbereich stabil bleiben. Weder die Größe der Vesikel, kalkulierbar über D_b ($2,5 \cdot 10^{-12}$ m²/s – $4,9 \cdot 10^{-12}$ m²/s), noch das relative eingekapselte Volumen p_b (0,2 % – 0,3 %) verändern sich für Konzentrationen unter 12 Vol% drastisch (siehe Tabelle 4.4).

Die Untersuchung des Einflusses von Chloroform auf die Durchlässigkeit der Vesikelmembran ergibt, dass sich keine Veränderung der mittleren Verweildauer von Ethanol in den Vesikeln einstellt. Die Abbildung 4.17 und die Abbildung 4.18 zeigen die Zerfallskurven für Ethanol vor und nach der Chloroformzugabe, sowie nach Abdampfen des Chloroforms. Vor der Zugabe des Chloroforms kann eine mittlere Verweildauer von ca. 300 ms detektiert werden. Durch Zugabe des Chloroforms spreizen die Kurven auseinander, was für eine Verringerung der mittleren Verweildauer spricht, allerdings sind die erhaltenen Zerfallskurven nicht anpassbar. Ebenfalls ist nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels keine Auswertung der Zerfallskurven, aufgrund der Streuung der Werte, möglich.

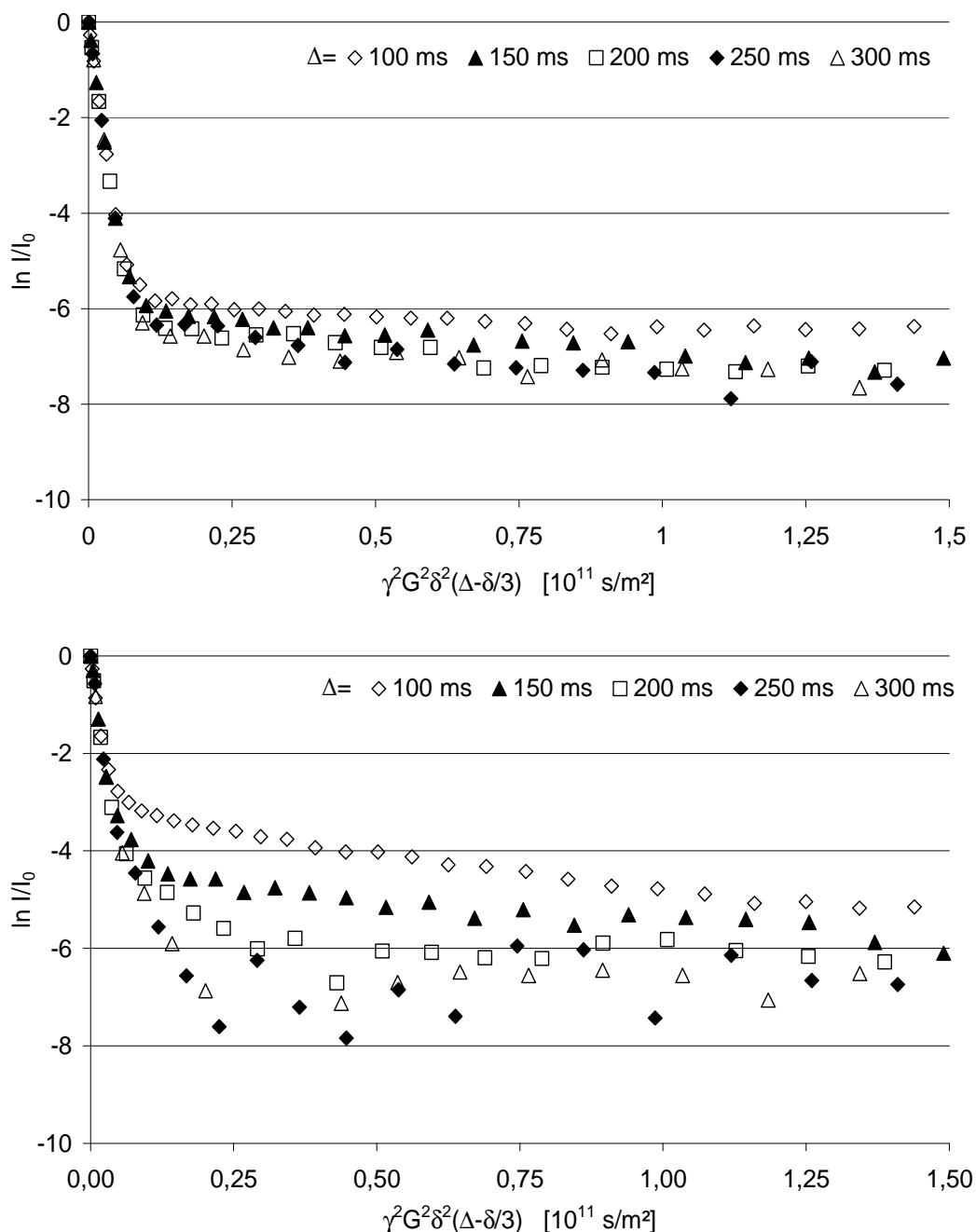


Abbildung 4.17: Zerfallskurven des Ethanolaustausches vor (oben), nach der Chloroformzugabe (unten).

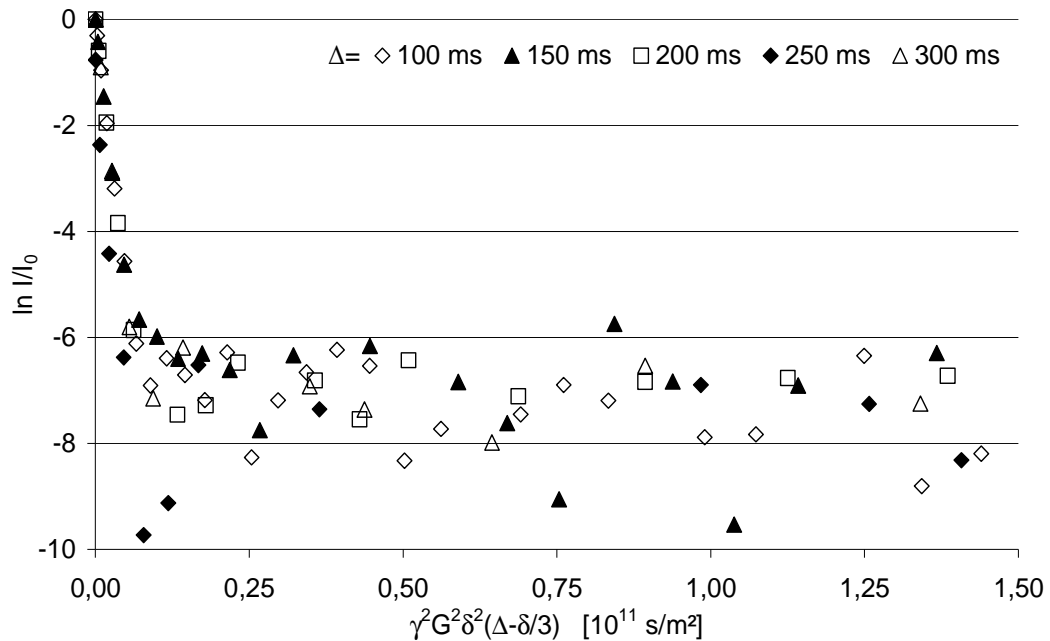


Abbildung 4.18: Zerfallskurven des Ethanol-austausches nach Abdampfen des Chloroforms.

4.3.4 Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten

4.3.4.1 Einfluss der Temperatur

Untersuchungen an Vesikeldispersionen aus P2VP-PEO8 und P2VP-PEO10 haben ergeben, dass es bis zur Siedetemperatur von fast 100°C nicht zu einer Aufklärung der Lösung kommt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Vesikel auch bei hohen Temperaturen stabil bleiben. Eine Änderung der Größe kann mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie nicht beobachtet werden, was dafür spricht, dass es keine gravierende Größenveränderung gibt.

Anders verhalten sich die Vesikel beim Abkühlen auf ca. 4°C und anschließendem Erwärmen auf 25°C. Hier kann eindeutig eine Verkleinerung der Vesikel festgestellt werden^[59].

Zusätzlich zu den mikroskopischen Untersuchungen wird eine ¹H-PFG-NMR-Messreihe durchgeführt, bei der die Vesikeldispersion mit PEO 200 als Sonde schrittweise von 21 auf 37°C erwärmt wird. In diesem Temperaturbereich zeigt sich weder eine Veränderung der mittleren Verweildauer τ_b (0,32 s – 0,34 s, siehe Abbildung 4.19) noch eine Veränderung des Diffusionskoeffizienten D_b ($1,8 \cdot 10^{-12}$ m²/s – $2,9 \cdot 10^{-12}$ m²/s), was einem Gleichbleiben der Vesikelgröße entspricht. Des Weiteren bleiben die Werte für das relative, eingekapselte Volumen p_b (0,6%) ebenfalls konstant. Alle Ergebnisse sind in der Tabelle 4.5 und der Abbildung 4.19 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus P2VP-PEO

Temperatur [°C]	D_a [10^{-10} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
21,1	$5,1 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,02$
25,0	$5,9 \pm 0,05$	$1,8 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,01$
30,0	$6,5 \pm 0,07$	$2,7 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,02$	$3,0 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,02$
36,3	$7,6 \pm 0,17$	$2,9 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,02$	$3,0 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,02$

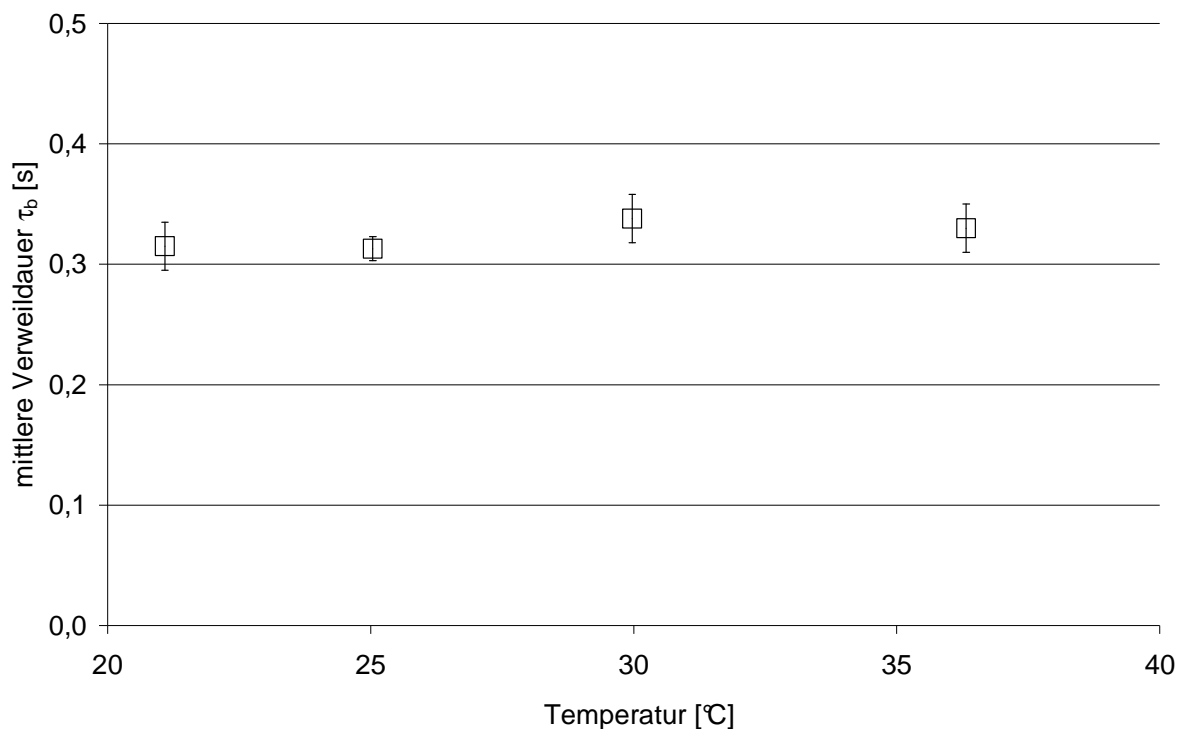


Abbildung 4.19: Abhängigkeit von τ_b von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO10 von der Temperatur

4.3.4.2 Einfluss des pH-Werts

Bei den Untersuchungen von Vesikeldispersionen aus P2VP-PEO8 und P2VP-PEO10 zeigt sich, dass die Blocklängenverhältnisse einen Einfluss auf den pH-Wert der Lösung zu haben scheinen, da P2VP-PEO8 mit pH 7,3 einen höheren „Eigen“-pH-Wert besitzt als P2VP-PEO10 mit pH 5,7. Bei der Titration mit verdünnter Salzsäure zur Bestimmung des Zersetzungspunktes zeigt sich, dass die Lösungen bei nur gering verschiedenen pH-Werten aufklaren. Vesikel aus P2VP-PEO8 werden bei einem pH-Wert von 4,6 zerstört, während sich Vesikel aus P2VP-PEO10 bei einem pH-Wert von 4,5 auflösen. Im Gegensatz dazu wird kein Einfluss im Basischen gefunden. Hier können bis zu einem pH-Wert von 12,6 keine Veränderungen beobachtet werden. Weitere Untersuchungen mit höheren Werten sind nicht durchgeführt worden^[59].

Diese Ergebnisse können auch mit Hilfe einer ^1H -PFG-NMR Messreihe bestätigt werden. Bei dieser wird jeweils eine Mischung aus Vesikeln aus P2VP-PEO10 und PEO 200 auf einen pH-Wert zwischen 4 und 9 eingestellt und vermessen. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass auch hier bei einem pH-Wert kleiner 5 keine Auswertung mehr möglich ist, was zeigt, dass alle Vesikel zerstört sind, zum anderen gibt es keinen Einfluss auf die Permeabilität der Membran im Bereich von pH 6-9, da die mittlere Verweildauer τ_b (0,22 s - 0,26 s) konstant bleibt (siehe Abbildung 4.20 und Tabelle 4.6).

Des Weiteren kann anhand der berechneten Werte für D_b ($3,9 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ – $4,4 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) festgestellt werden, dass sich die Größe der Vesikel nicht wesentlich ändert. Sie sind über diesen pH-Bereich stabil. Im Gegensatz dazu nimmt die relative Menge an eingekapselter Substanz p_b um 0,5 % ab.

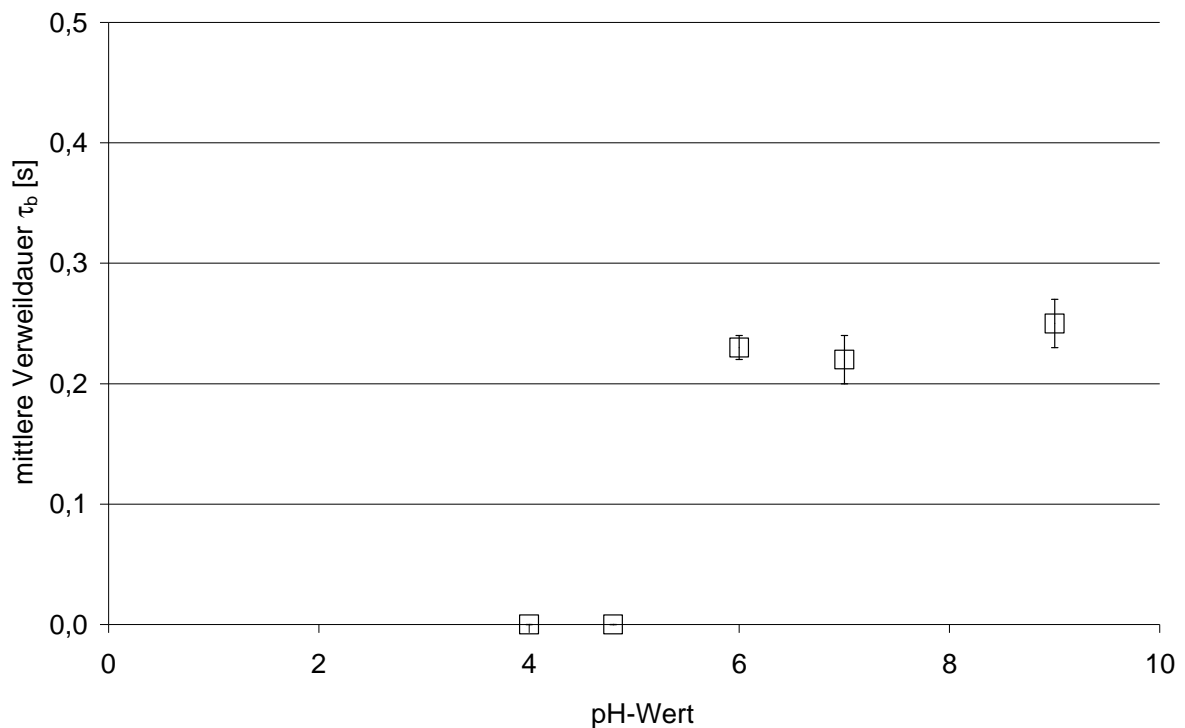


Abbildung 4.20: Abhängigkeit von τ_b von PEO 200 vom pH-Wert für Vesikel aus P2VP-PEO

Tabelle 4.6: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus P2VP-PEO

pH-Wert	D_a [$10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$]	D_b [$10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
4,0	nicht detektierbar				
4,8					
6,0	$5,4 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,05$
7,0	$5,3 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$	$0,23 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,07$
9,0	$5,4 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$	$0,26 \pm 0,02$	$3,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,04$

Bei der Untersuchung des Regenerationsverhaltens von P2VP-PEO Vesikeln ergibt sich, dass sich die Vesikel nach der sauren Zerstörung mit HCl durch Zugabe von Natronlauge wieder neu bilden. Durch ^1H -PFG-NMR-Messungen kann zusätzlich gezeigt werden, dass die mittlere Verweildauer von PEO 200 der Stammlösung (200 ms) und der der Vesikeldispersion nach der Regeneration (185 ms) ähnlich ist. In Abbildung 4.21 sind die Zerfallskurven vor und nach der Säurezugabe. Zusätzlich wird in Abbildung 4.22 die Zerfallskurven der regenerierten Probe noch einmal aufgetragen.

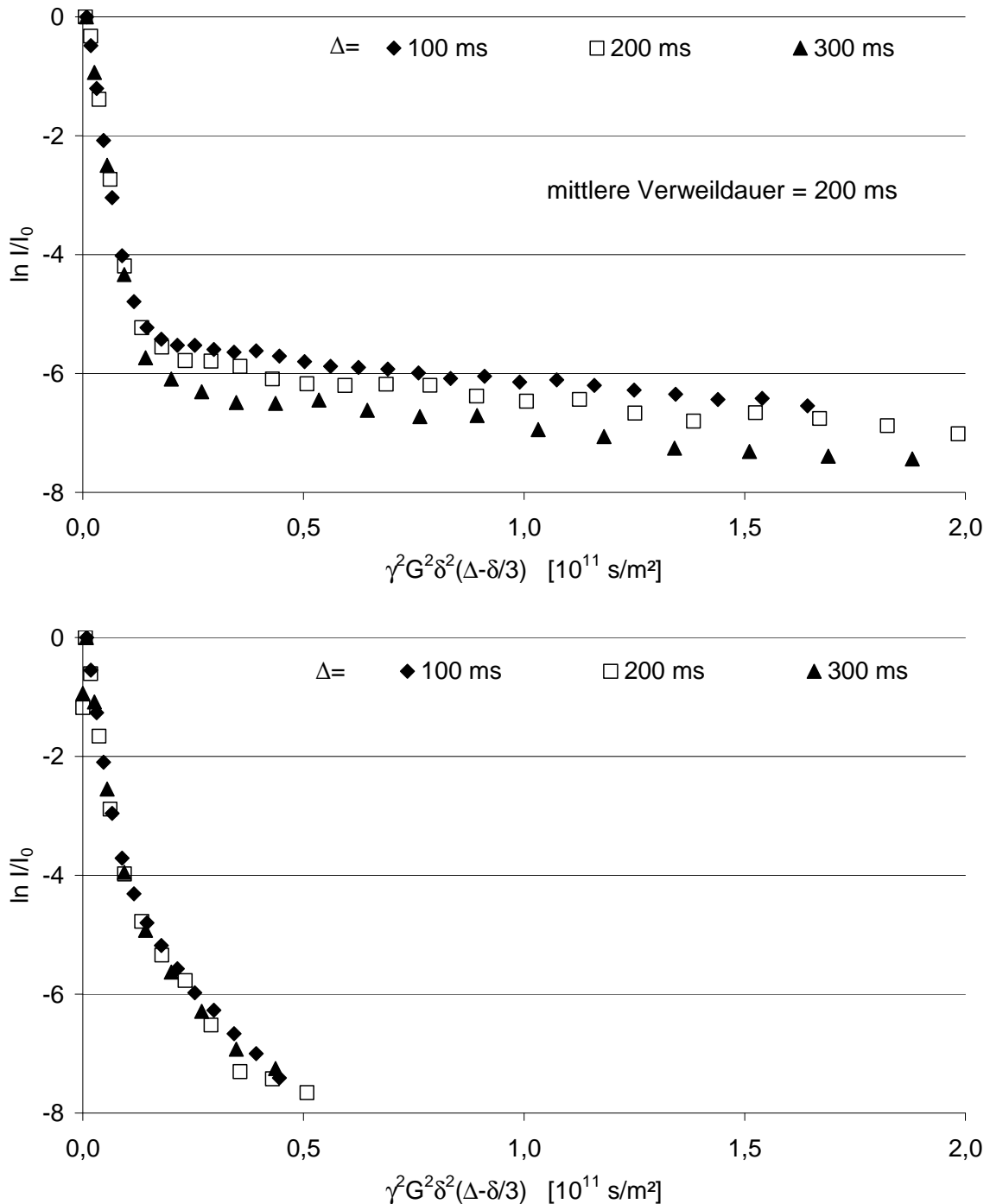


Abbildung 4.21: Zerfallskurven von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO bei pH 7 (oben) und bei pH 2 (unten)

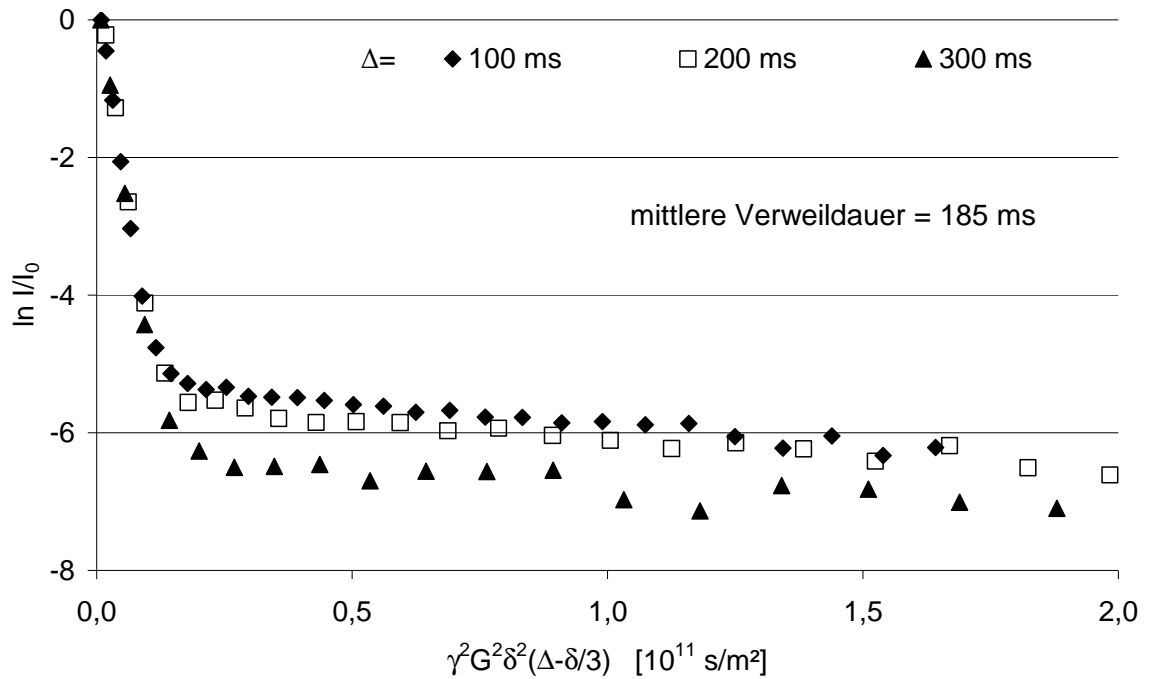


Abbildung 4.22: Zerfallskurven von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO nach Regeneration bei pH 7

Die zweite Steigung in Abbildung 4.22 (Mitte) bei einem pH-Wert von ca. 2 ergibt sich aus der Selbstdiffusion des P2VP-PEO Polymers. Anhand des aufgenommenen Spektrums (siehe Abbildung 4.23) werden im Gegensatz zum Spektrum der Vesikel auch die Signale der P2VP-Gruppe zwischen 6,5 und 8,5 ppm sichtbar.

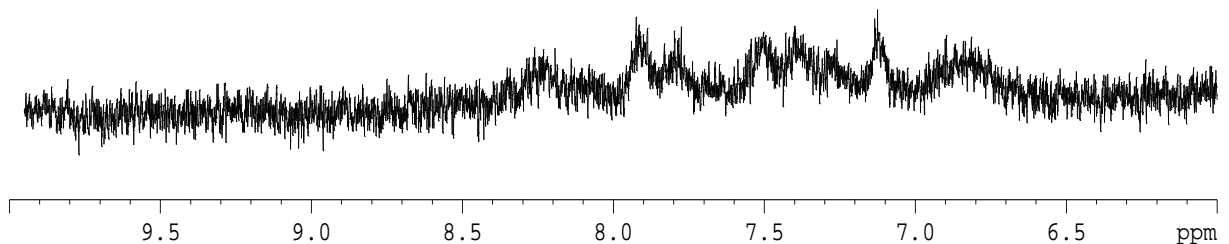


Abbildung 4.23: Ausschnitt aus einem ^1H -NMR-Spektrum der Vesikeldispersion bei pH 2

Dies wird ebenfalls durch die Messung des Diffusionskoeffizienten des P2VP-PEOs in der sauren Lösung belegt. Dieser liegt im Fall der zerstörten Vesikel bei $9,13 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Zum Vergleich wird der Diffusionskoeffizient des reinen P2VP-PEO Polymers in Chloroform ohne vorherige Vesikelbildung bestimmt, welcher bei $1,29 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ liegt.

4.4 Austauschverhalten aus PI-PEO Vesikeln

4.4.1 Austauschverhalten von Wasser

Als erstes wird untersucht, ob die Membranen der Vesikel aus PI-PEO undurchlässiger sind als die des P2VP-PEOs. Dazu wird die mittlere Verweildauer von Wasser gemessen und es zeigt sich, dass es hier möglich ist, eine freie und eine eingekapselte Fraktion zu detektieren (siehe Abbildung 4.24). Es ergibt sich eine durchschnittliche Verweildauer von 150 ms.

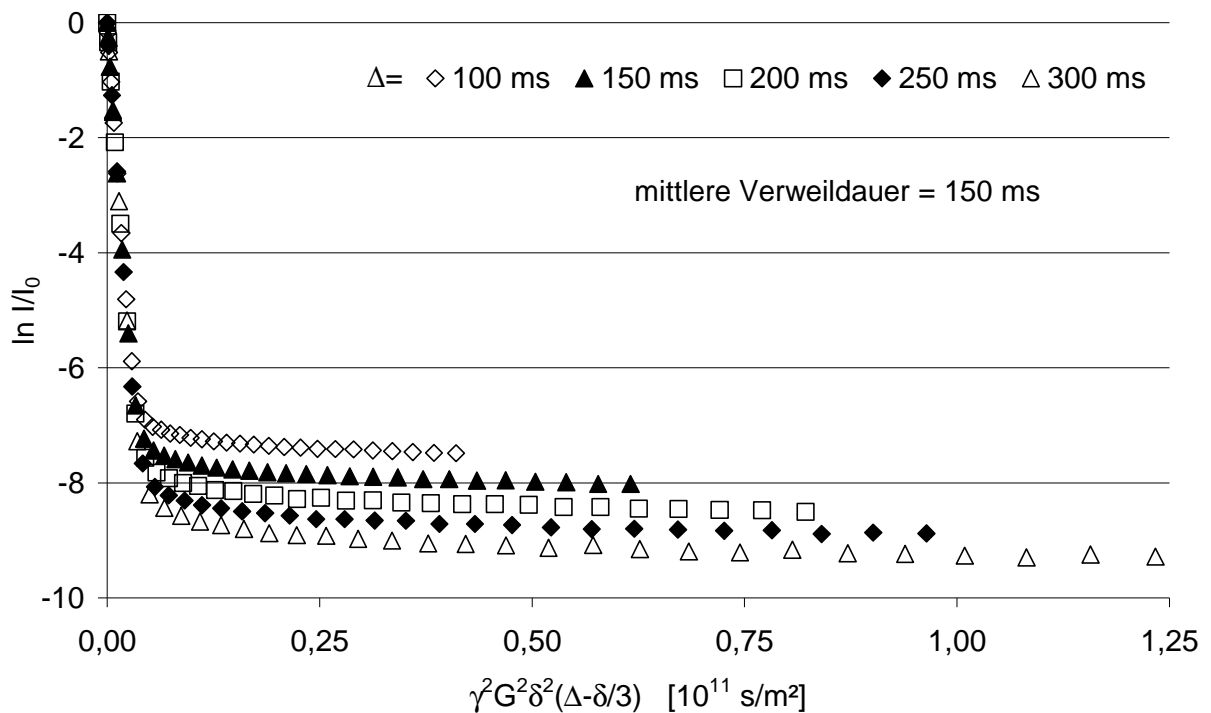


Abbildung 4.24: Zerfallskurven für den Wasseraustausch in PI-PEO Vesikeln

Somit wird in den meisten weiteren Experimenten Wasser als Sonde verwendet, da es aufgrund der verwendeten wässrigen Dispersion immer ein Signal im ^1H -NMR-Spektrum hervorruft.

4.4.2 Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten

Anhand der Untersuchungen an Vesikeln aus P2VP-PEO kann festgestellt werden, dass die mittlere Verweildauer in den Vesikeln sowohl von der Größe als auch von der Polarität der verwendeten Sonde abhängt. Daher werden diese Messungen mit PI-PEO nicht wiederholt. Interessant ist hier allerdings der Austausch von Wirkstoffmodellsubstanzen. Daher werden die mittleren Verweildauern von Glukose, Inulin und Dextran analog zu Kapitel 4.3.2 auch bei diesen Vesikeln untersucht.

Dabei erhöht sich die mittlere Verweildauer analog zu Vesikeln aus P2VP-PEO in folgender Reihenfolge:

Glukose ($\tau_b = 0,38 \text{ s} \pm 0,03 \text{ s}$, $R_H = 0,42 \text{ nm} \pm 0,004$) < Dextran ($\tau_{1/2} = 109 \text{ s} \pm 4,4 \text{ s}$, $R_H = 7,29 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$) < Inulin ($\tau_{1/2} = 189 \text{ s} \pm 40 \text{ s}$, $R_H = 110 \text{ nm} \pm 10,5 \text{ nm}$).

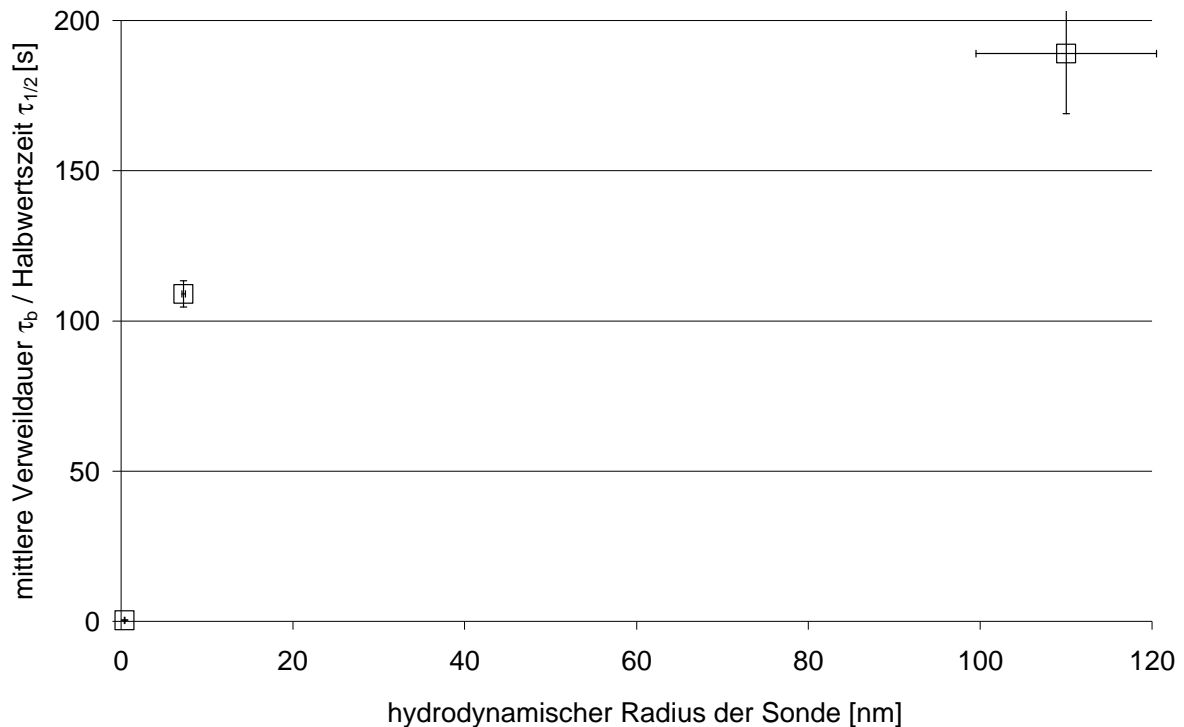


Abbildung 4.25: Abhängigkeit von τ_b bzw. von $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Wirkstoffmodelle

4.4.3 Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten

Zur Untersuchung dieses Einflusses wird das Austauschverhalten von Wasser, in einer mittels Chloroform-Methode hergestellte Vesikeldispersion aus PI-PEO18.2 in Abhängigkeit der zugefügten Ethanolkonzentration vermessen. Es zeigt sich, dass die mittlere Verweildauer τ_b von Wasser in den Vesikeln mit zunehmender Ethanolkonzentration von 190 ms auf 100 ms abnimmt. Nun wird diese Lösung sukzessive verdünnt, so dass die Ethanolkonzentration wieder reduziert wird. Dabei wird festgestellt, dass bei abnehmender Ethanolkonzentration die mittlere Verweildauer von Wasser wieder auf einen Wert von 180 ms ansteigt. Somit liegt in diesem Fall ein reversibles System vor, mit dessen Hilfe es möglich ist, die Permeabilität des Systems in einem kleinen Fenster zu steuern. Die Werte für die mittlere Verweildauer τ_b sind noch einmal in Abbildung 4.26 zusammengefasst.

Zusätzlich bleibt die relative Menge an eingekapseltem Wasser (p_b) relativ konstant (2,2 - 3,2 %) (Abbildung 4.28). Im Gegensatz dazu erhöht sich der Diffusionskoeffizient D_b um den Faktor fünf von $2,6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ auf $12,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ (Abbildung 4.27). Dies entspricht einer Verringerung des hydrodynamischen Radius der Vesikel von ca. 95 nm auf 20 nm und einem erneuten Anwachsen auf 40 nm.

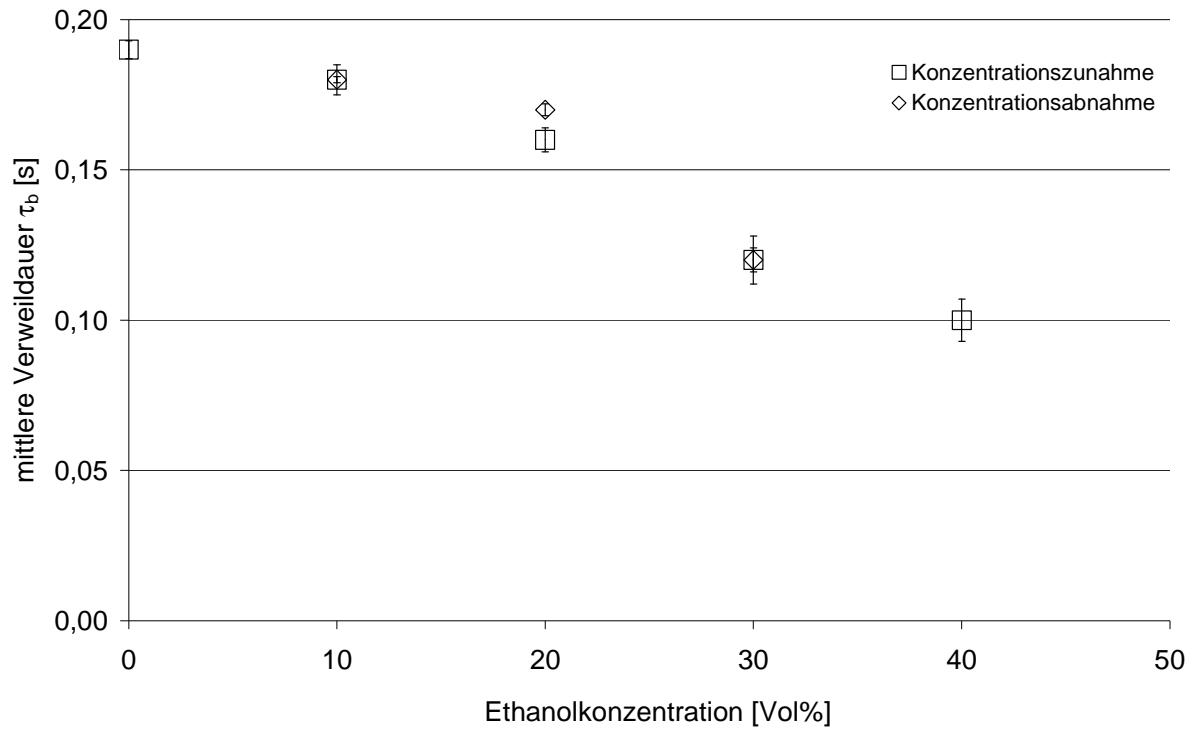


Abbildung 4.26: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO von der Ethanolkonzentration

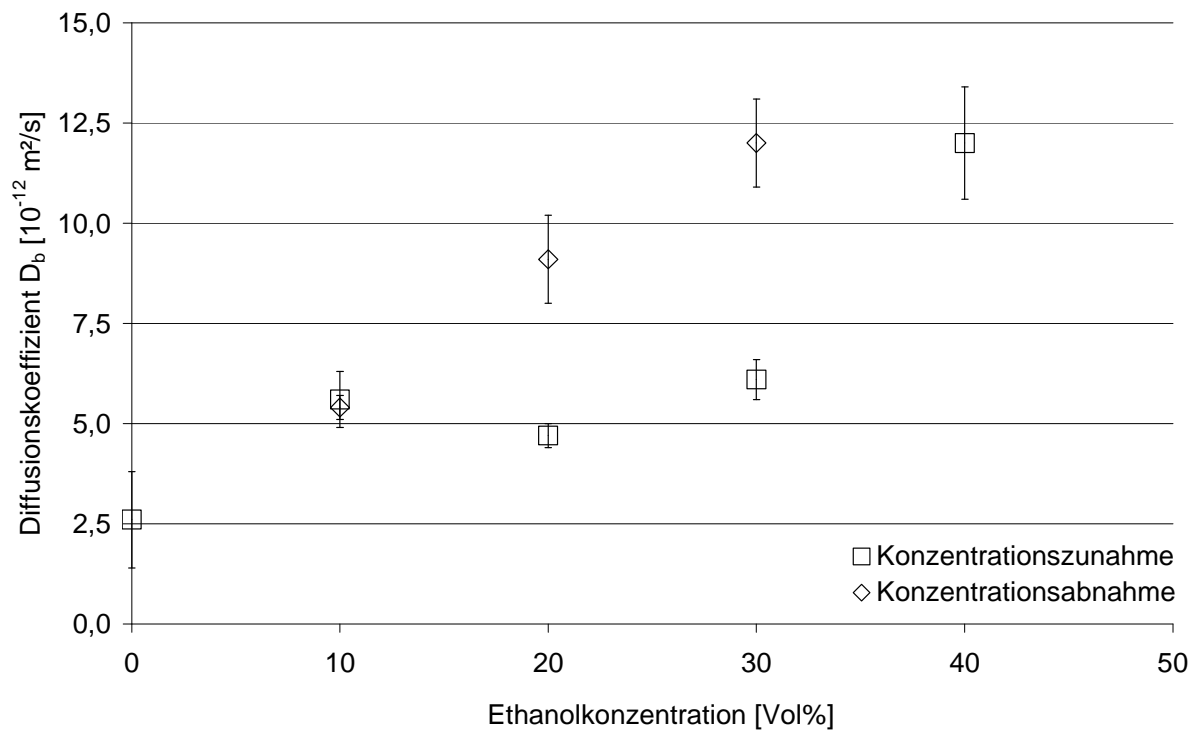


Abbildung 4.27: Abhängigkeit von D_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO von der Ethanolkonzentration

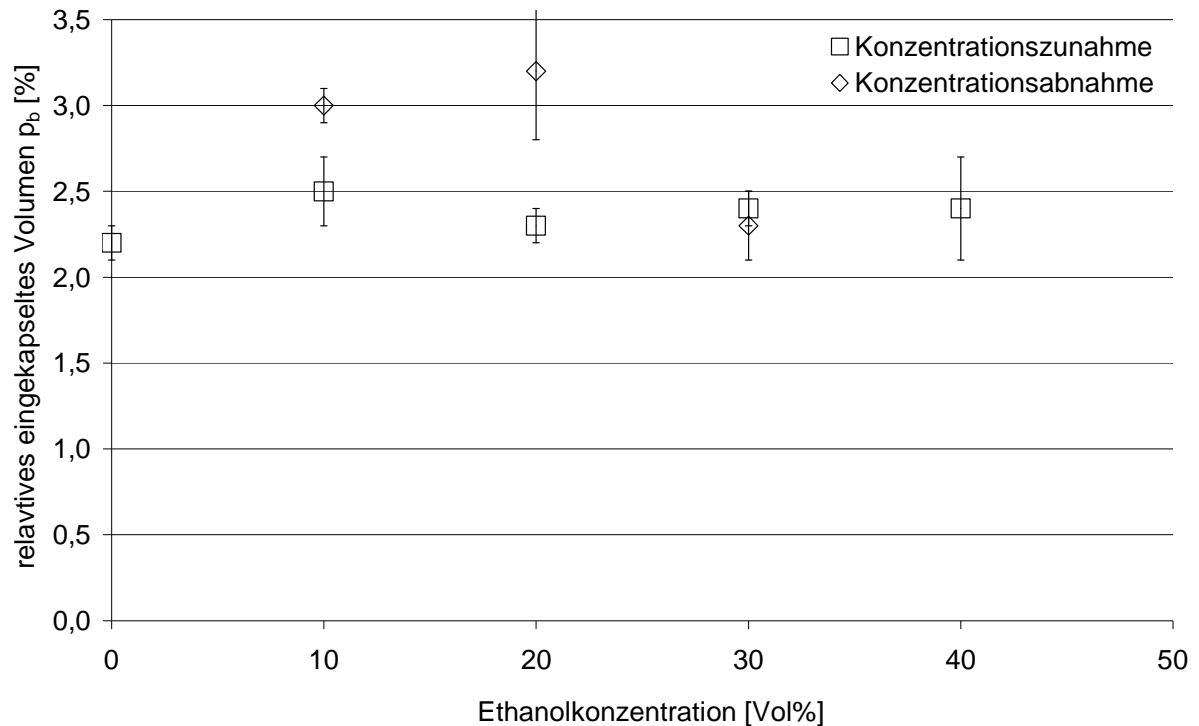


Abbildung 4.28: Abhängigkeit von p_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO von der Ethanolkonzentration

Alle Werte sind zusätzlich in der Tabelle 8.11 im Anhang zusammengefasst.

Ebenfalls ausgewertet werden die Signale des vorhandenen Ethanols. Es zeigt sich, dass auch die mittlere Verweildauer τ_b von Ethanol in den Vesikeln mit steigender Konzentration abnimmt. Allerdings ist es hier nicht möglich den Prozess reversibel zu durchlaufen. Bei einer Konzentrationsverringerung des Ethanols auf 20 Vol% steigt die mittlere Verweildauer lediglich auf 180 ms, anstatt auf den ursprünglichen Wert von 240 ms an. Im Vergleich zu den Daten des Wasseraustausches bleiben die Werte für D_b relativ konstant, mit einer geringen Erhöhung um den Faktor 1,5. Dafür verringert sich im Gegensatz zum Wasseraustausch die relative Menge an eingekapseltem Ethanol um den Faktor 2. Alle berechneten Werte sind noch einmal in Tabelle 8.12 im Anhang zusammengefasst.

Da es mit diesem System nun möglich ist die Permeabilität der Membran zu erhöhen, wird nun ein System gesucht, dessen Permeabilität reversibel zu verringern ist. Dazu wird eine Vesikeldispersion aus PI-PEO mit Chloroform versetzt und vermessen. Es zeigt sich, dass durch die Zugabe von Chloroform die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln deutlich zunimmt, wie anhand der Abbildung 4.29 deutlich wird. Die mittlere Verweildauer vor der Chloroformzugabe beträgt 125 ms, während sie nach der Zugabe von Chloroform mit der unter Kapitel 3.3 angegebenen Zerfallsfunktion nicht mehr bestimmt werden kann. Sie liegt somit nach der Zugabe über 5 s.

Des Weiteren wird versucht, durch Abdampfen des Chloroforms diesen Effekt rückgängig zu machen. Wie anhand der Abbildung 4.30 zu erkennen ist, wird dadurch der gewünscht Effekt nicht erzielt. Stattdessen werden die Vesikel stark angegriffen, so dass eine Auswertung dieser Zerfallskurven nicht möglich ist.

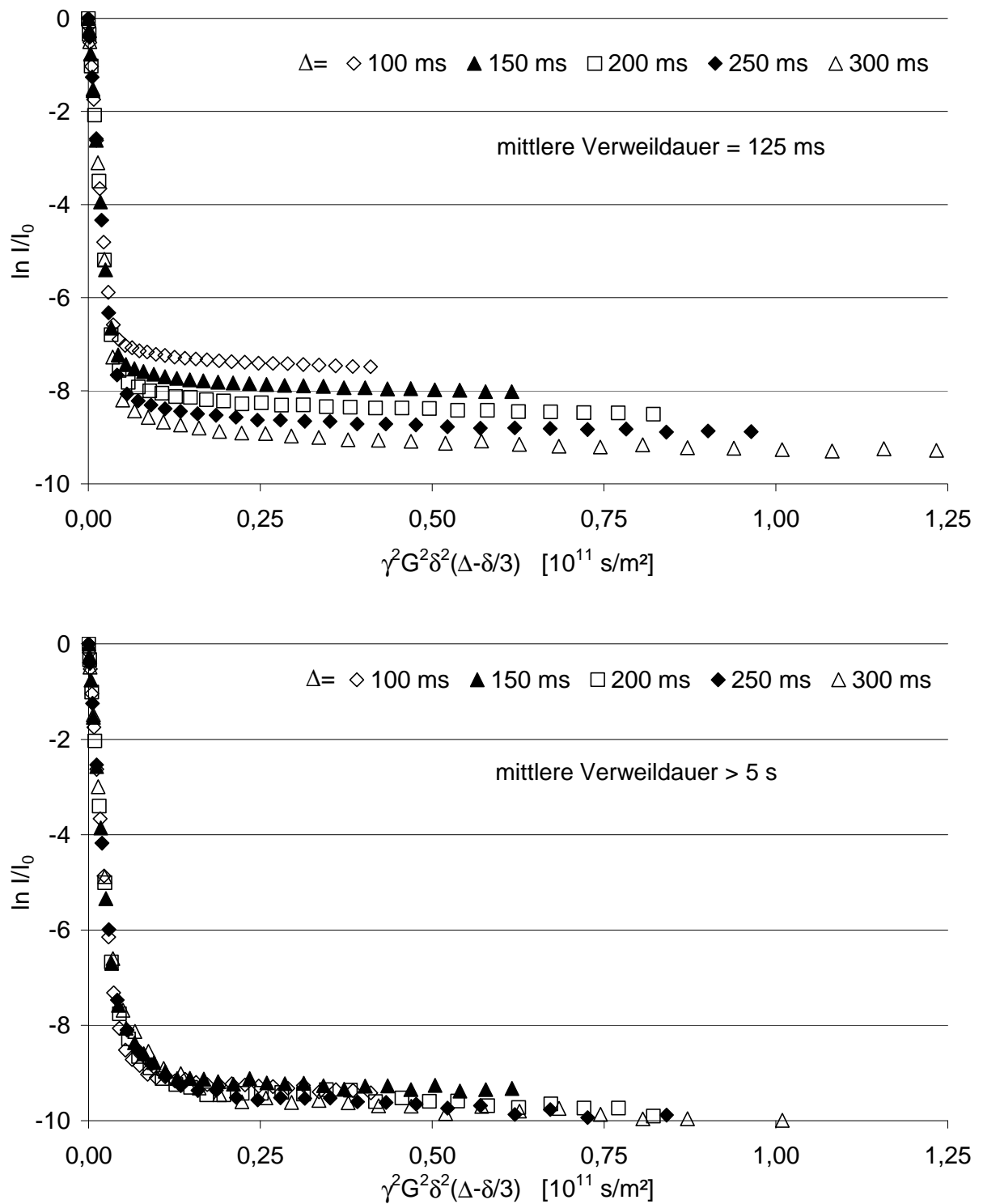


Abbildung 4.29: Zerfallskurven des Wasseraustausches vor (oben) und nach (unten) der Chloroformzugabe.

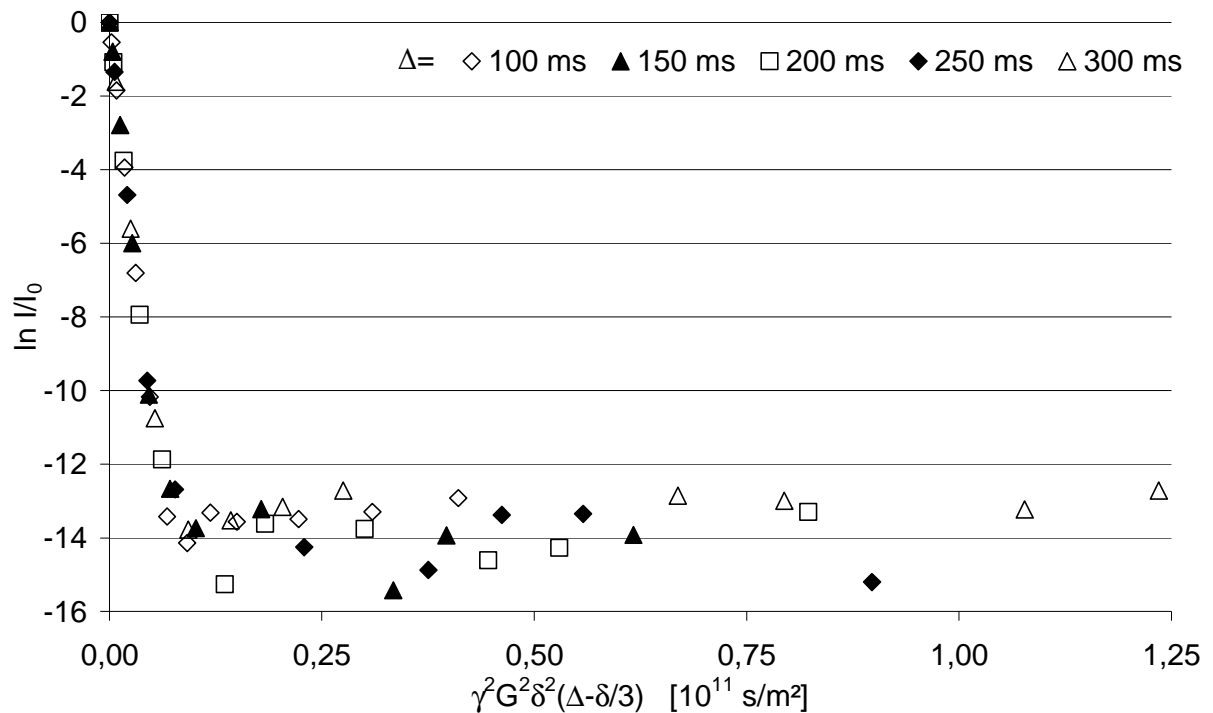


Abbildung 4.30: Zerfallskurven des Wassersignals nach der Chloroformzugabe (oben) und nach Abdampfen des Chloroforms (unten)

4.4.4 Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten

4.4.4.1 Einfluss der Temperatur

Vesikel aus PI-PEO sind gegenüber erhöhten Temperaturen bis ca. 95°C resistent. Weder makroskopisch noch lichtmikroskopisch können Veränderungen der Vesikel beobachtet werden. Beim Kühlen der Lösung auf ca. 4°C und anschließendem Erwärmen auf 25°C zeigen sich keine Reaktionen auf makroskopischer Ebene, allerdings können mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie keine Vesikel mehr aufgelöst werden. Während in der Stammlösung große Vesikel mit Durchmessern über 5 µm zu erkennen sind, können nach dem Abkühlen keine Vesikel mehr beobachtet werden^[59].

Zusätzlich zu diesen Versuchen wird eine Vesikelprobe NMR-spektroskopisch untersucht, wobei die Temperatur schrittweise von 20°C auf 35°C erhöht wird. Gemessen wird auch diesmal immer das Austauschverhalten von Wasser. Im Gegensatz zu Vesikeln aus P2VP-PEO wird beim PI-PEO eindeutig ein Einfluss der Temperatur auf die mittlere Verweildauer τ_b deutlich, wie in Abbildung 4.31 zu erkennen ist. Mit steigender Temperatur nimmt diese von 130 ms auf 80 ms ab, und somit die Permeabilität der Membran zu. Dieser Effekt ist ebenso wie der Einfluss des Ethanol reversibel. Das bedeutet, dass sich beim erneuten Abkühlen auf 20°C die mittlere Verweildauer wieder auf einen Wert von 140 ms erhöht, wie in Abbildung 4.31 und der dazugehörigen Tabelle 4.7 verdeutlicht.

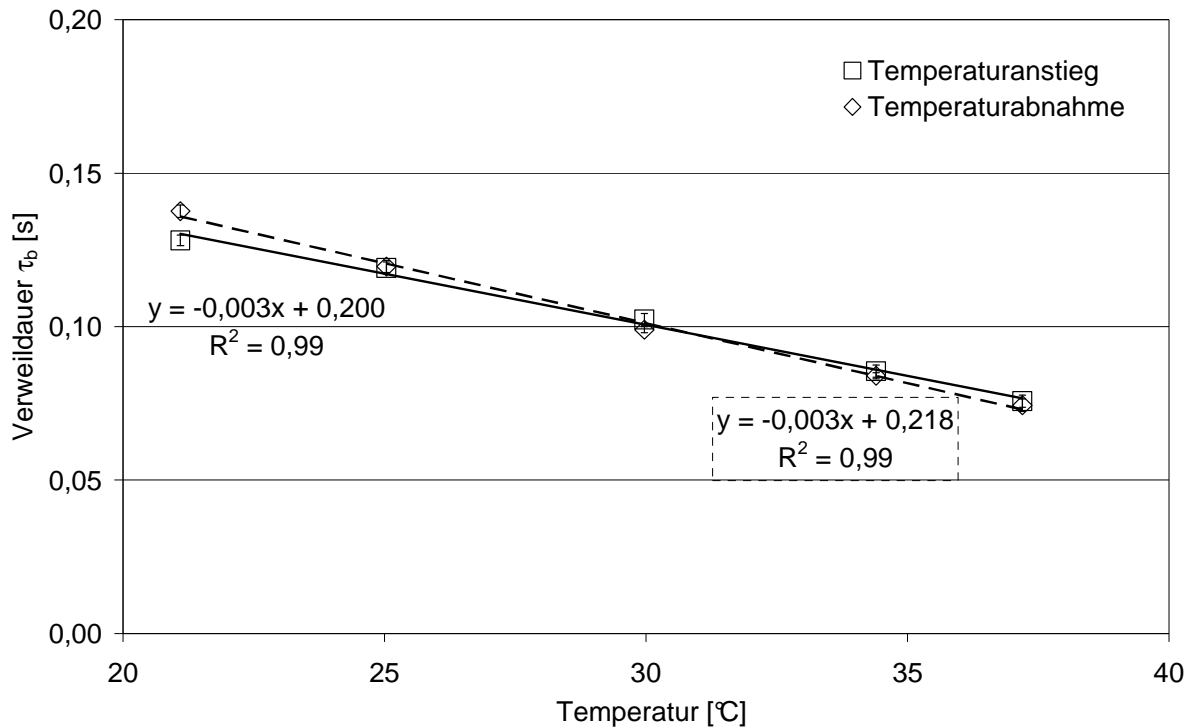


Abbildung 4.31: Temperaturabhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO

Auch in diesem Fall hat die Änderung der Versuchsbedingungen, analog zu Kapitel 4.3.3. keinen Einfluss auf die relative Menge an eingekapseltem Wasser. Mit Ausnahme der letzten beiden Werte der Tabelle 4.7 liegen diese mit geringer Abweichung im Bereich von 0,7 % wie auch durch Abbildung 4.32 (unten) verdeutlicht wird. Im Gegensatz dazu hat die Änderung der Temperatur einen starken Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten D_b . Dieser erhöht sich mit steigender Temperatur um den Faktor 3 von $7,8 \cdot 10^{-12}$ m²/s auf $2,5 \cdot 10^{-11}$ m²/s und geht durch Absenken der Temperatur wieder auf einen Wert von $8,3 \cdot 10^{-12}$ m²/s zurück.

Tabelle 4.7: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus PI-PEO

Temperatur [°C]	D_a [10^{-09} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
21,1	2,0 ± 0,01	7,8 ± 0,3	0,13 ± 0,002	7,7 ± 0,1	0,8 ± 0,02
25,0	2,1 ± 0,01	12,0 ± 0,4	0,12 ± 0,002	8,3 ± 0,1	0,9 ± 0,03
30,0	2,4 ± 0,01	16,0 ± 0,4	0,10 ± 0,002	10,0 ± 0,2	0,7 ± 0,02
34,4	2,6 ± 0,02	20,0 ± 0,6	0,09 ± 0,002	11,1 ± 0,2	0,6 ± 0,03
37,2	2,8 ± 0,03	25,0 ± 0,9	0,08 ± 0,002	12,5 ± 0,3	0,6 ± 0,04
37,2	2,8 ± 0,03	24,0 ± 0,1	0,07 ± 0,02	13,4 ± 3,8	0,6 ± 0,04
34,4	2,7 ± 0,02	20,0 ± 0,1	0,08 ± 0,01	11,9 ± 1,4	0,7 ± 0,03
30,0	2,4 ± 0,01	12,0 ± 0,1	0,10 ± 0,01	10,1 ± 1,0	0,8 ± 0,02
25,0	2,2 ± 0,01	9,8 ± 0,3	0,12 ± 0,02	8,4 ± 1,4	0,1 ± 0,02
21,1	2,0 ± 0,01	8,3 ± 0,2	0,14 ± 0,02	7,3 ± 1,1	0,1 ± 0,02

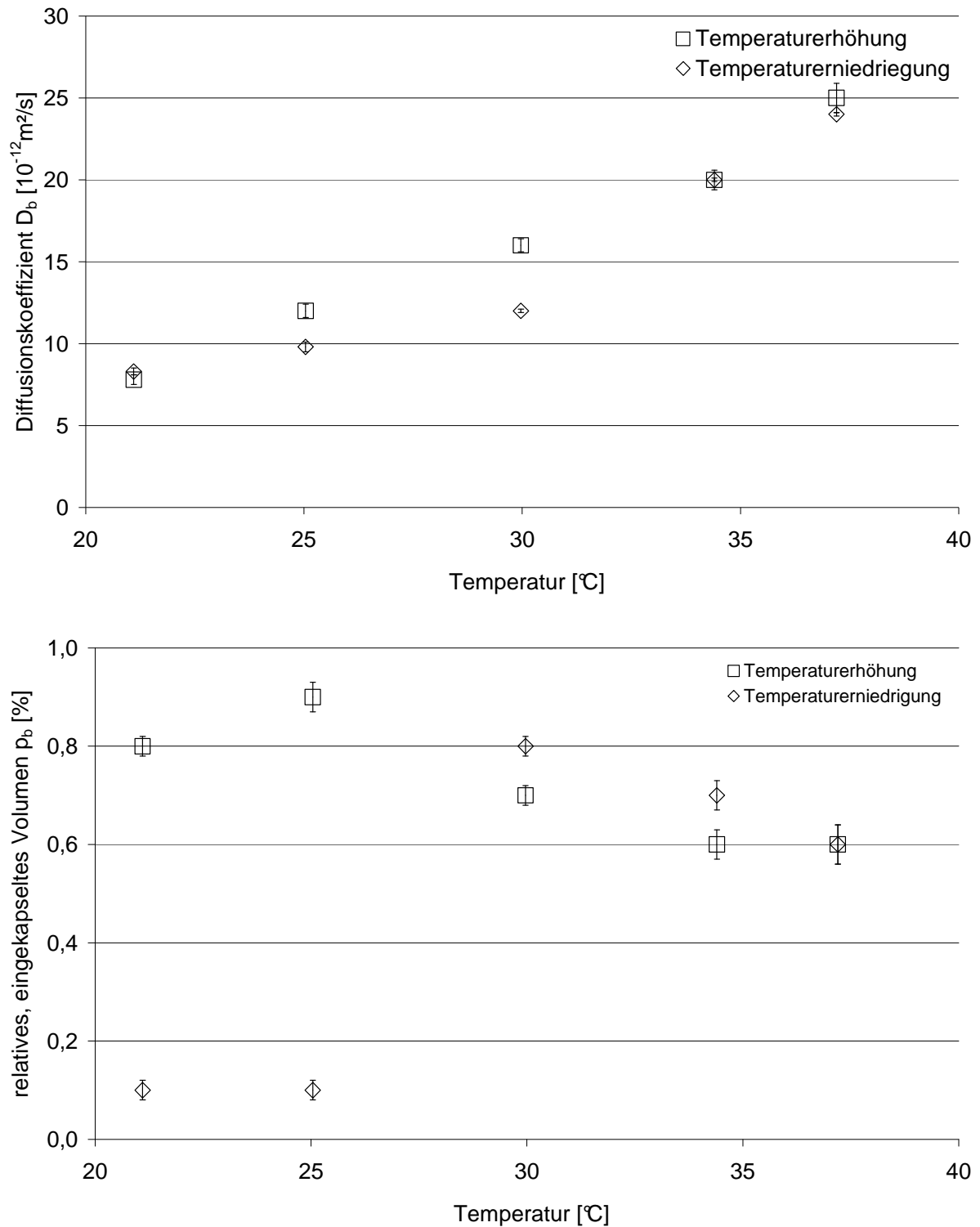


Abbildung 4.32: Temperaturabhängigkeit von D_b (oben) und p_b (unten) von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO

Mit Hilfe einer entsprechenden Auftragung der ermittelten Daten kann nun die Aktivierungsenergie berechnet werden, die aufgebracht werden muss um die Vesikelmembran zu passieren. Dazu wird in einem Diagramm $[\ln 1/\tau_b]$ gegen $[1/T]$ aufgetragen. In einem solchen Diagramm entspricht die Steigung m dem Quotienten aus der negativen Aktivierungsenergie $-E_a$ und der Boltzmannkonstante R .

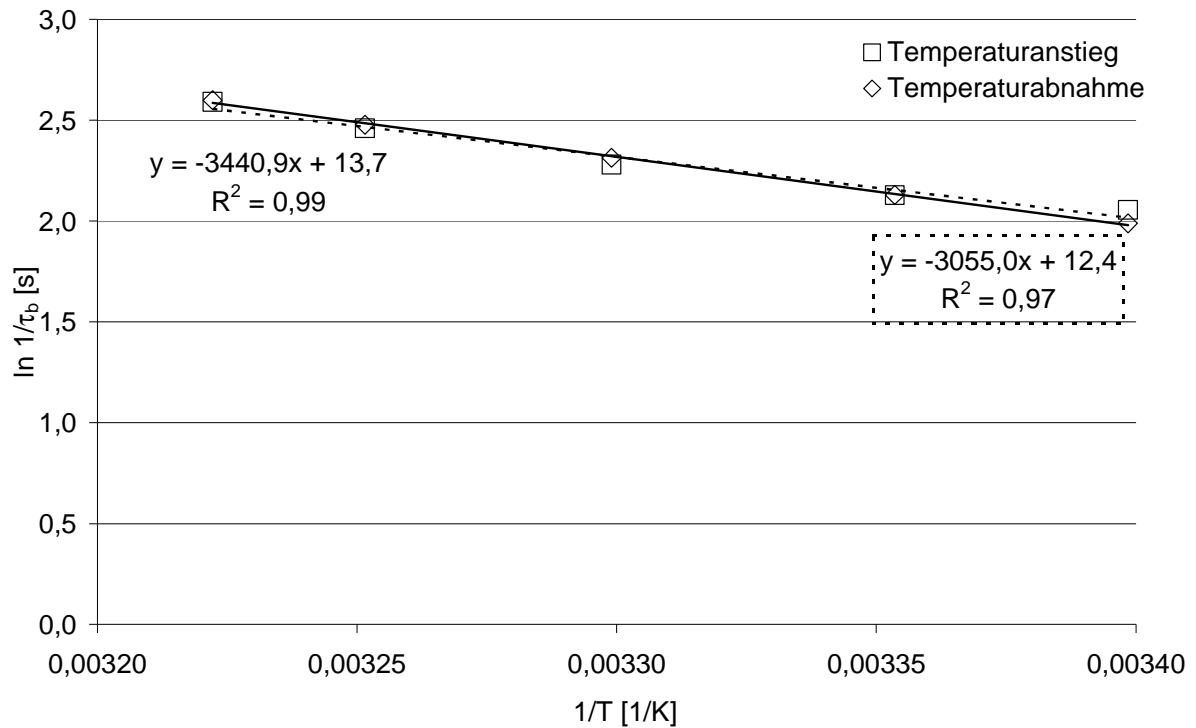


Abbildung 4.33: Bestimmung der Aktivierungsenergie E_a für den Membrandurchtritt aus PI-PEO Vesikeln.

Es ergibt sich ein Wert von $26,7 \text{ kJ/mol} \pm 1,6 \text{ kJ/mol}$.

4.4.4.2 Einfluss des pH-Werts

Eine Vesikeldispersion aus PI-PEO besitzt einen pH-Wert von 5 und weist keinerlei Beeinflussung im Bereich von pH 1,7 bis 12,5 auf^[59]. Selbst bei solch niedrigen pH-Werten sind im Gegensatz zum P2VP-PEO noch Vesikel vorhanden (siehe Abbildung 4.34).

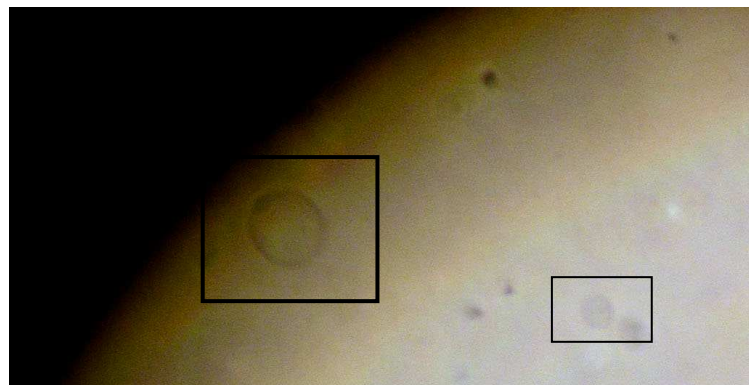


Abbildung 4.34: Phasenkontrastaufnahme einer PI-PEO Vesikeldispersion bei pH ~ 2 ^[59].

Dieses Ergebnis kann mit Hilfe von ^1H -PFG-NMR-Messungen bestätigt werden. Bei diesen wird die mittlere Verweildauer des Wassers in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht und es kann kein signifikanter Einfluss bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.35 und Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tabelle 4.8: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit vom pH-Wert für Vesikel aus PI-PEO

pH-Wert	D_a [10^{-09} m ² /s]	D_b [10^{-11} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
5,0	2,1 ± 0,02	1,9 ± 0,1	0,09 ± 0,02	11,1 ± 2,5	0,3 ± 0,02
6,0	2,2 ± 0,01	1,4 ± 0,1	0,12 ± 0,03	8,3 ± 2,1	0,1 ± 0,01
7,0	2,1 ± 0,01	1,9 ± 0,1	0,10 ± 0,03	10,0 ± 3,0	0,4 ± 0,01
8,0	2,2 ± 0,01	1,6 ± 0,1	0,09 ± 0,02	11,1 ± 2,5	0,3 ± 0,01
9,0	2,2 ± 0,01	1,4 ± 0,1	0,10 ± 0,02	10,0 ± 3,0	0,4 ± 0,01

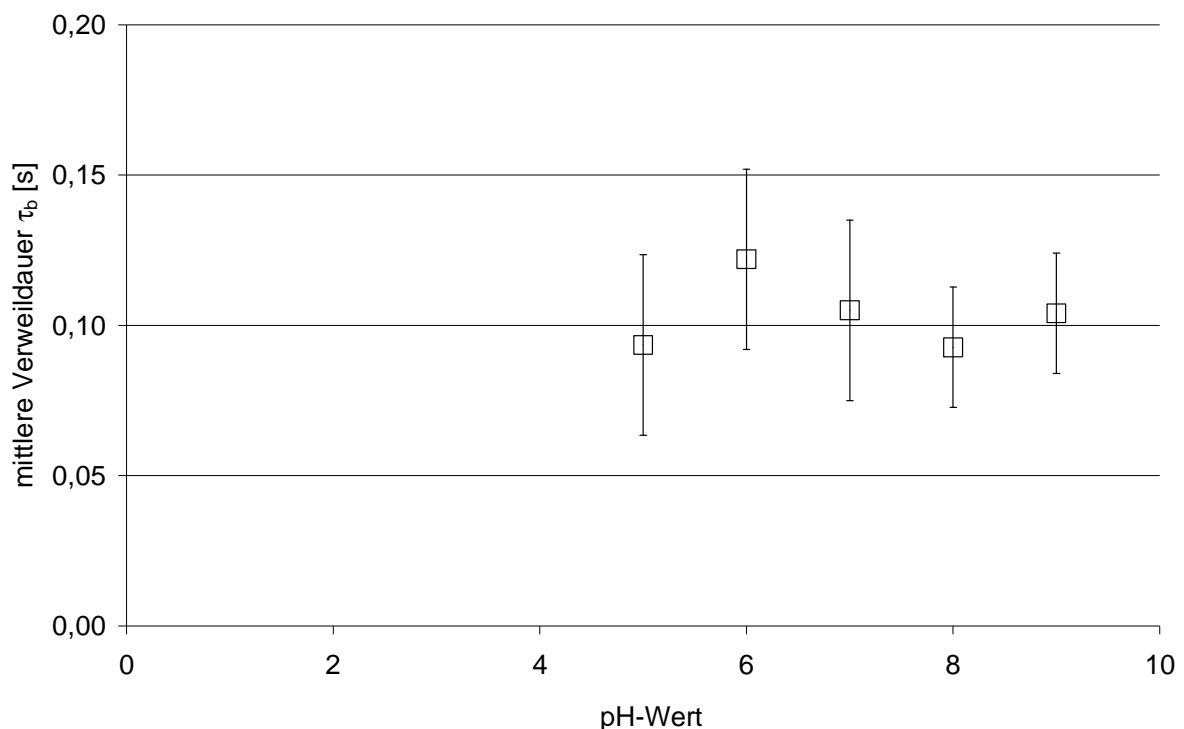


Abbildung 4.35: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO vom pH-Wert

4.5 Austauschverhalten aus PLA-PEO Vesikeln

4.5.1 Austauschverhalten von Wasser

Als erstes wird die mittlere Verweildauer von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO bestimmt. Es ergibt sich ein Wert von ca. 250 ms für τ_b . Da allerdings bekannt ist, dass sich das Laktid in der Membran zersetzt und sich somit Löcher bilden, wird diese Probe in unregelmäßigen Abständen NMR-spektroskopisch untersucht. Es zeigt sich, dass die mittlere Verweildauer deutlich abnimmt: bei 8 Tagen alten Vesikeln liegt die mittlere Verweildauer bei 160 ms, was einer Abnahme von ca. 30 % entspricht. Diese Tendenz ist auch an den Werten für den Diffusionskoeffizient D_b und des relativen eingekapselten Volumens p_b zu erkennen. D_b nimmt im Verlauf der Versuchsreihe um 22 % auf $1,2 \cdot 10^{-12}$ m²/s ab, während p_b sogar um 40 % auf 0,4 % absinkt. Alle Ergebnisse sind im folgenden Diagramm (Abbildung 4.36) und der Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Tabelle 4.9: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit vom Alter der Vesikel aus PLA-PEO

Alter [Tage]	D_a [10^{-09} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
1	$1,8 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,01$	$4,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,02$
2	$2,2 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,01$
4	$2,2 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,01$	$4,8 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,02$
7	$2,1 \pm 0,01$	$2,9 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$	$5,9 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,01$
10	$2,0 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,01$	$5,3 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,01$

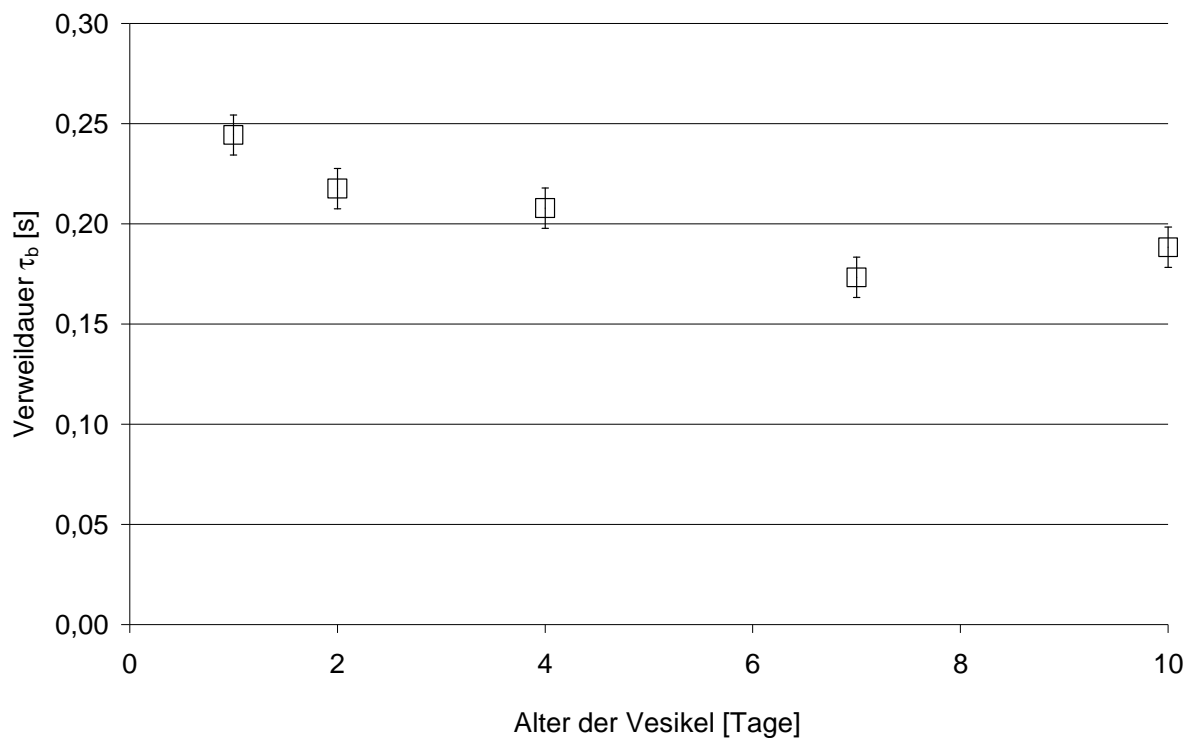


Abbildung 4.36: Abhängigkeit von τ_b von Wasser vom Alter der PLA-PEO Vesikel

4.5.2 Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten

Zur besseren Vergleichbarkeit der drei Vesikelmaterien werden auch die mittleren Verweildauern von Glukose, Inulin und Dextran analog zu Kapitel 4.2.2 bei Vesikeln aus PLA-PEO untersucht. Dabei erhöht sich diese analog zu Vesikeln aus P2VP-PEO und PI-PEO in folgender Reihenfolge:

Glukose ($\tau_{1/2} = 44 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$, $R_H = 0,42 \pm 0,004 \text{ nm}$) < Dextran ($\tau_{1/2} = 54 \text{ s} \pm 4 \text{ s}$, $R_H = 7,29 \pm 0,2 \text{ nm}$) < Inulin ($\tau_{1/2} = 90 \text{ s} \pm 8 \text{ s}$, $R_H = 110 \pm 10,5 \text{ nm}$).

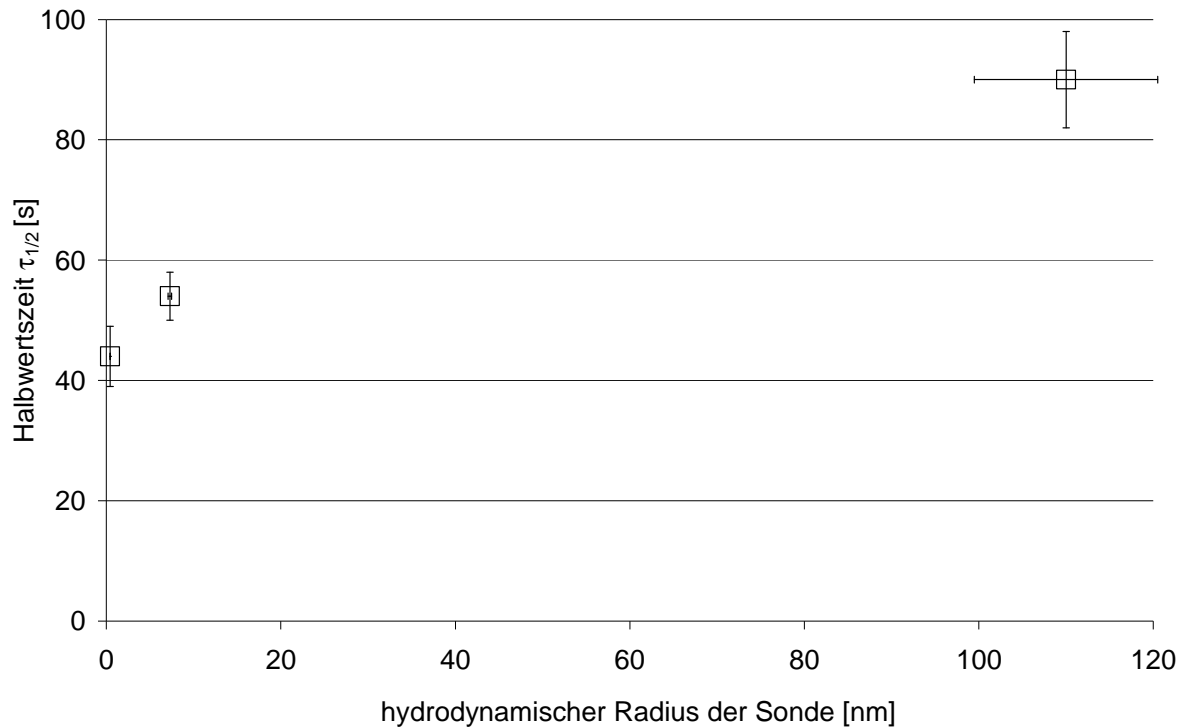


Abbildung 4.37: Abhängigkeit von $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Wirkstoffmodelle für Vesikel aus PLA-PEO

4.5.3 Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten

Zur Untersuchung des Einflusses von Additiven auf das Austauschverhalten, wird eine mittels Chloroform-Methode hergestellte Vesikeldispersion aus PLA-PEO53 in Abhängigkeit von der zugefügten Ethanolkonzentration untersucht.

Es zeigt sich, dass die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln mit zunehmender Ethanolkonzentration um einen Faktor von 2 von 0,15 s auf 0,08 s abnimmt. Nun wird diese Lösung sukzessive verdünnt, so dass die Ethanolkonzentration wieder reduziert wird. Im Gegensatz zu Vesikeln aus PI-PEO ist es bei Vesikeln aus PLA-PEO nicht möglich, eine vollständige Reversibilität zu erzielen. Die mittlere Verweildauer von Wasser nimmt zwar mit abnehmender Ethanolkonzentration um 0,01 s zu, es werden aber nicht die anfänglichen Werte erreicht, wie in Abbildung 4.38 und Tabelle 4.10 zu erkennen ist.

Tabelle 4.10: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus PLA-PEO

Ethanolkonzentration [Vol%]	D_a [10^{-09} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	ρ_b [%]
5,9	$2,0 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,003$	$6,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,02$
9,1	$1,9 \pm 0,01$	$1,6 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,001$	$7,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,01$
16,7	$1,6 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,002$	$7,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,02$
20,0	$1,5 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,004$	$8,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,03$
27,3	$1,3 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,2$	$0,11 \pm 0,004$	$9,0 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,02$
28,6	$1,3 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,5$	$0,08 \pm 0,01$	$11,9 \pm 1,4$	$0,3 \pm 0,01$
28,6	$1,2 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,3$	$0,09 \pm 0,007$	$11,7 \pm 1,0$	$0,3 \pm 0,02$
21,4	$1,4 \pm 0,02$	$3,5 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,006$	$10,1 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,02$
20,0	$1,5 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,007$	$10,5 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,04$
15,8	$1,6 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,007$	$10,3 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,03$
13,3	$1,7 \pm 0,02$	$1,9 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,006$	$9,9 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,02$
10,0	$1,8 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,003$	$9,7 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,01$

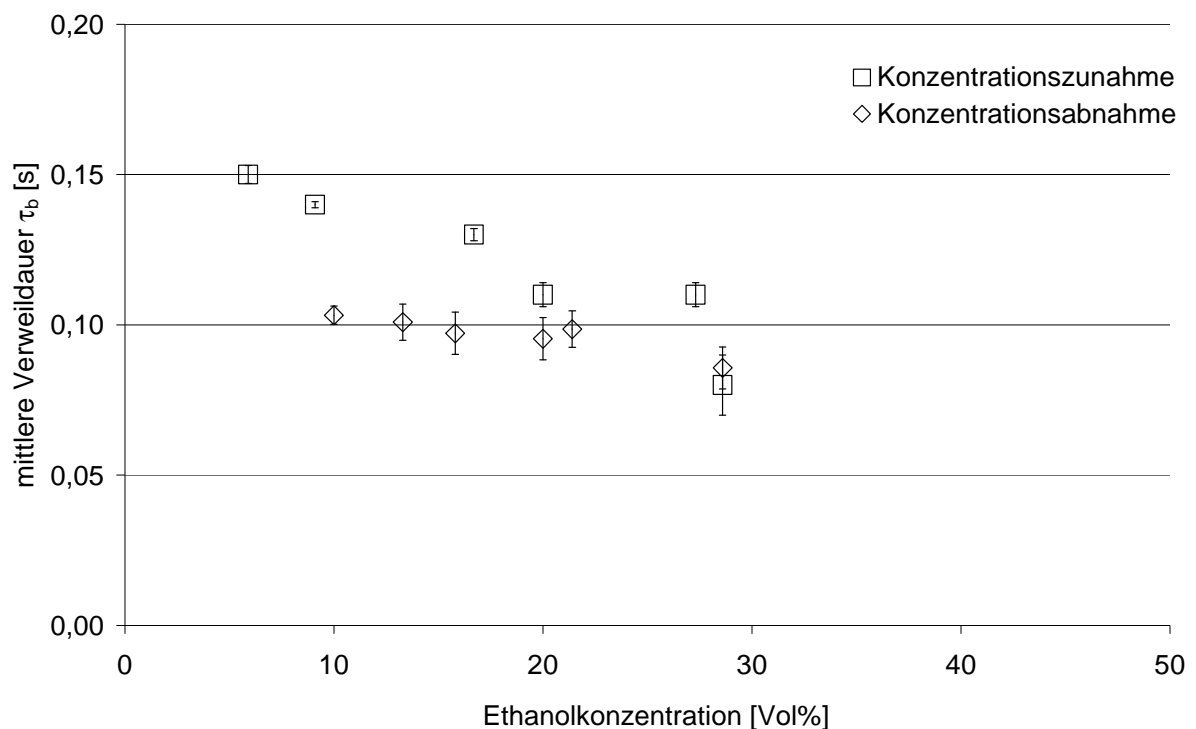


Abbildung 4.38: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO von der Ethanolkonzentration

Des Weiteren wird eine Vesikeldispersion mit Chloroform versetzt und vermessen. Es zeigt sich, dass durch die Zugabe von Chloroform die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln deutlich zunimmt, wie anhand der vergleichenden Abbildung 4.39 deutlich wird.

Die mittlere Verweildauer vor der Chloroformzugabe beträgt 240 ms, während sie nach der Zugabe von Chloroform mit der unter Kapitel 3.3 angegebenen Zerfallsfunktion nicht mehr bestimmt werden kann. Sie liegt somit nach der Zugabe über 5 s.

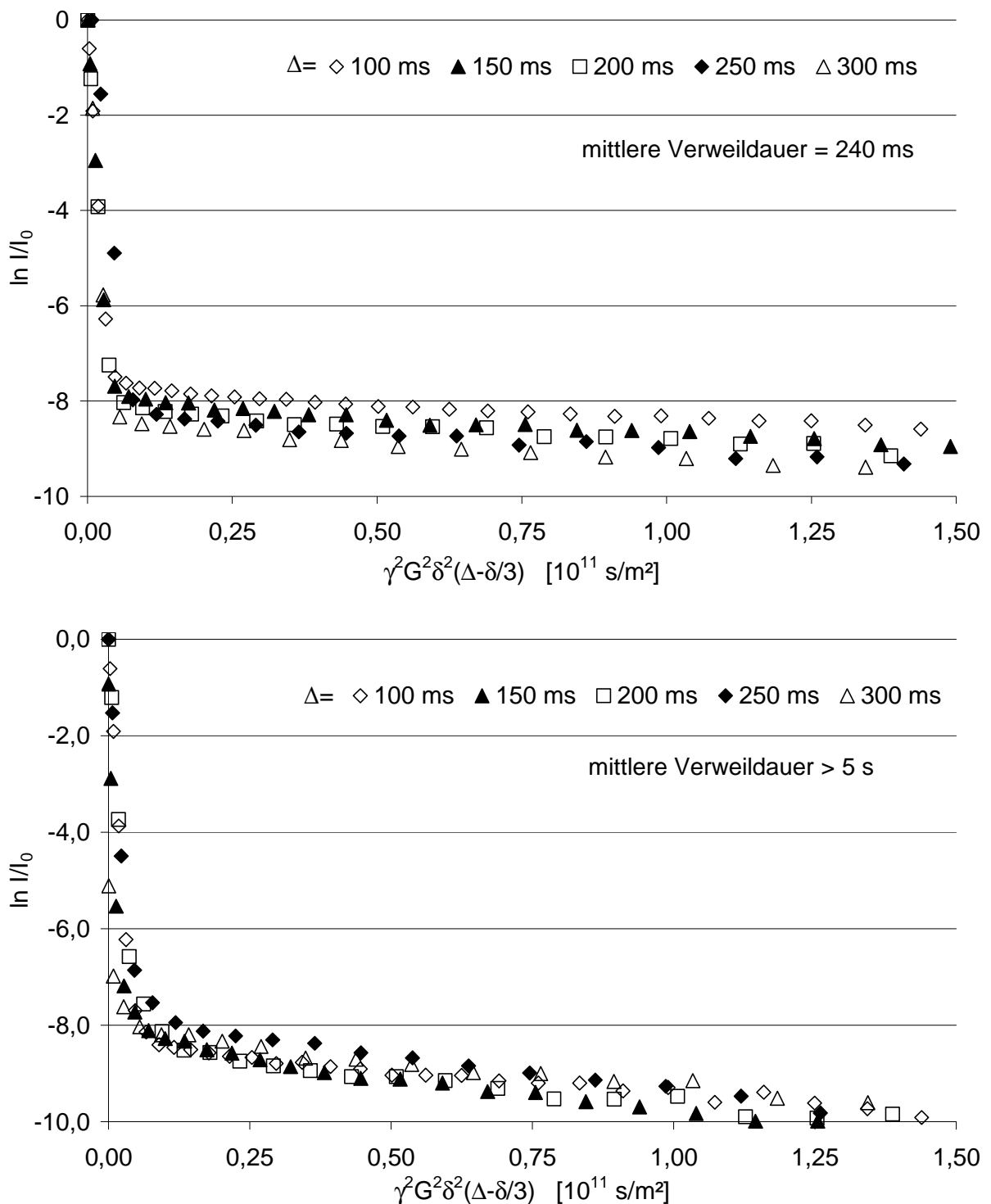


Abbildung 4.39: Zerfallskurven des Wasseraustausches in Vesikeln aus PLA-PEO vor (oben) und nach (unten) Chloroformzugabe.

Es wird nun versucht, durch Abdampfen des Chloroforms diesen Effekt rückgängig zu machen. Wie anhand der Abbildung 4.40 zu erkennen ist, wird dadurch der gewünschte

Effekt nicht erzielt, sondern die Vesikel werden teilweise sogar zerstört, so dass auch in diesem Fall keine Auswertung möglich ist.

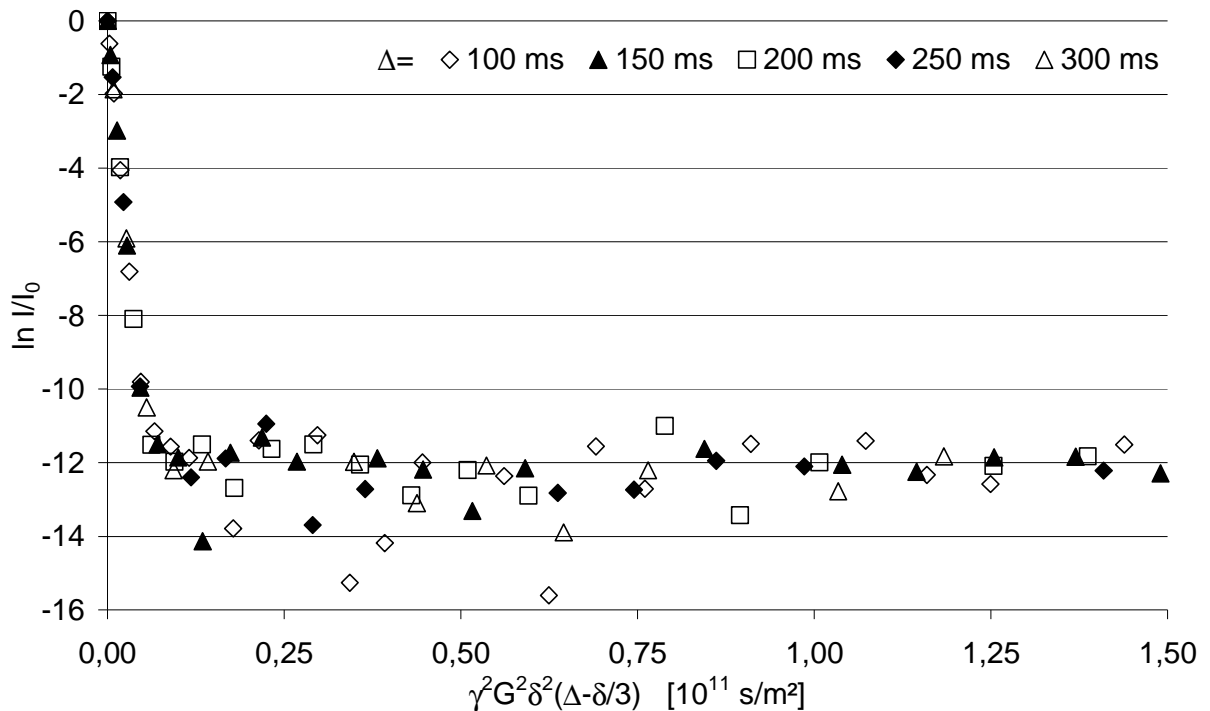


Abbildung 4.40: Zerfallskurven des Wassersignals in Vesikeln aus PLA-PEO nach Abdampfen des Chloroforms

4.5.4 Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten

4.5.4.1 Einfluss der Temperatur

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der mittleren Verweildauer von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO wird eine Vesikelprobe NMR-spektroskopisch untersucht, wobei die Temperatur schrittweise von 21°C auf 37°C erhöht wird. Gemessen wird auch diesmal immer das Austauschverhalten von Wasser. Im Gegensatz zu Vesikeln aus P2VP-PEO wird analog zum PI-PEO eindeutig ein Einfluss der Temperatur deutlich, wie in Abbildung 4.41 zu erkennen ist. Mit steigender Temperatur nimmt die mittlere Verweildauer, um einen Faktor 5 von 350 ms auf 75 ms ab und somit die Permeabilität der Membran zu. Wird die Temperatur wieder verringert, so nimmt die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln wieder auf einen Wert von 300 ms zu.

Die Werte für die relative, eingekapselte Menge an Wasser in den Vesikeln bleiben mit 0,1 % über den ganzen Versuchszeitraum konstant. Im Gegensatz dazu nimmt der Diffusionskoeffizient D_0 der Vesikel bei Temperaturerhöhung um einen Faktor zwei von $1,8 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ auf $3,3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ zu und bei Abkühlung auch entsprechend auf einen Wert von $1,3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ab. Alle Werte sind ebenfalls in Tabelle 8.13 im Anhang zusammengefasst.

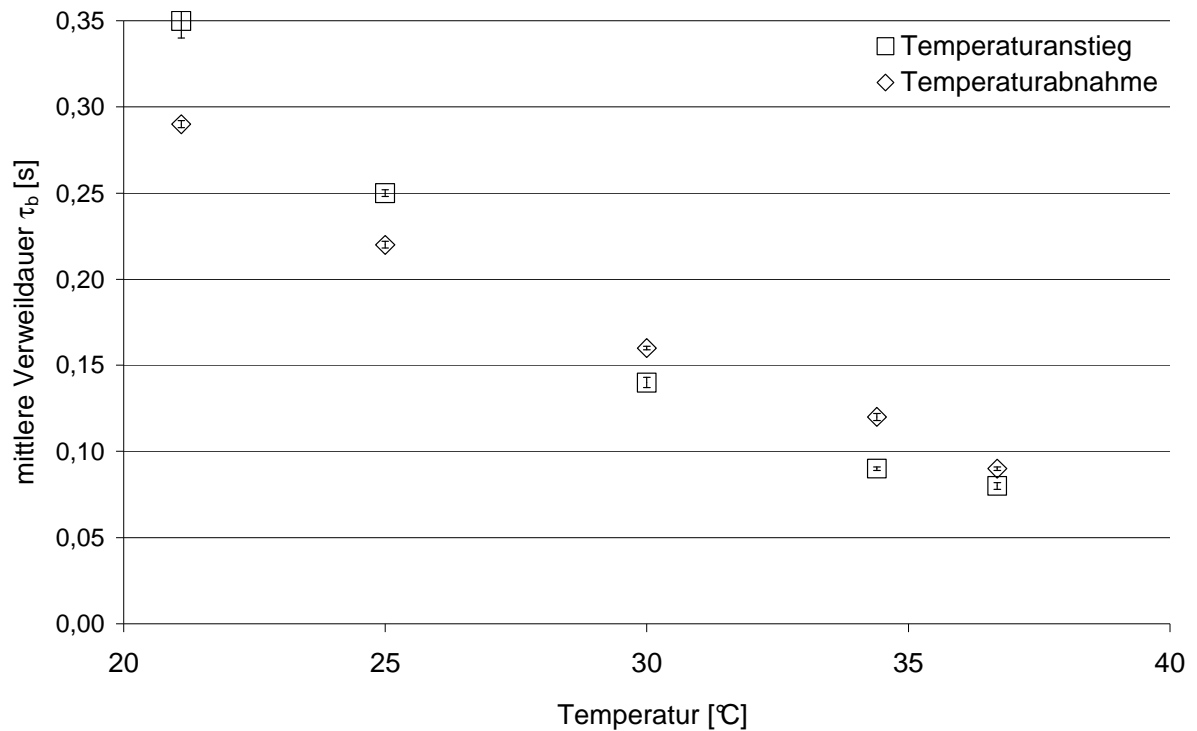


Abbildung 4.41: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO von der Temperatur.

Auch im Fall von PLA-PEO kann über die entsprechende Auftragung (siehe Abbildung 4.42) die Aktivierungsenergie für den Membrantransfer berechnet werden.

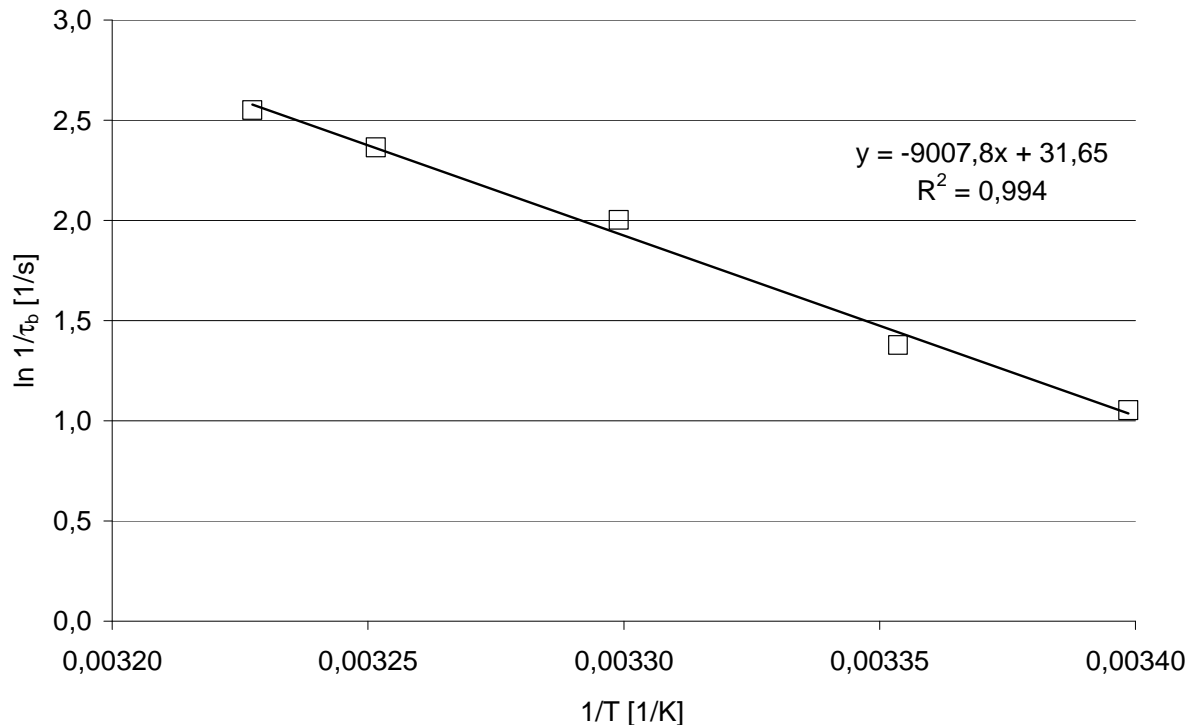


Abbildung 4.42: Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A für den Membrandurchtritt von PLA-PEO Vesikeln.

Es ergibt sich ein Wert von $75,3 \text{ kJ/mol} \pm 4,2 \text{ kJ/mol}$.

4.5.4.2 Einfluss des pH-Werts

Bei Vesikeln aus PLA-PEO wird ebenfalls die mittlere Verweildauer des Wassers in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht und es kann kein signifikanter Einfluss bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.43 und in Tabelle 8.14 zusammengefasst.

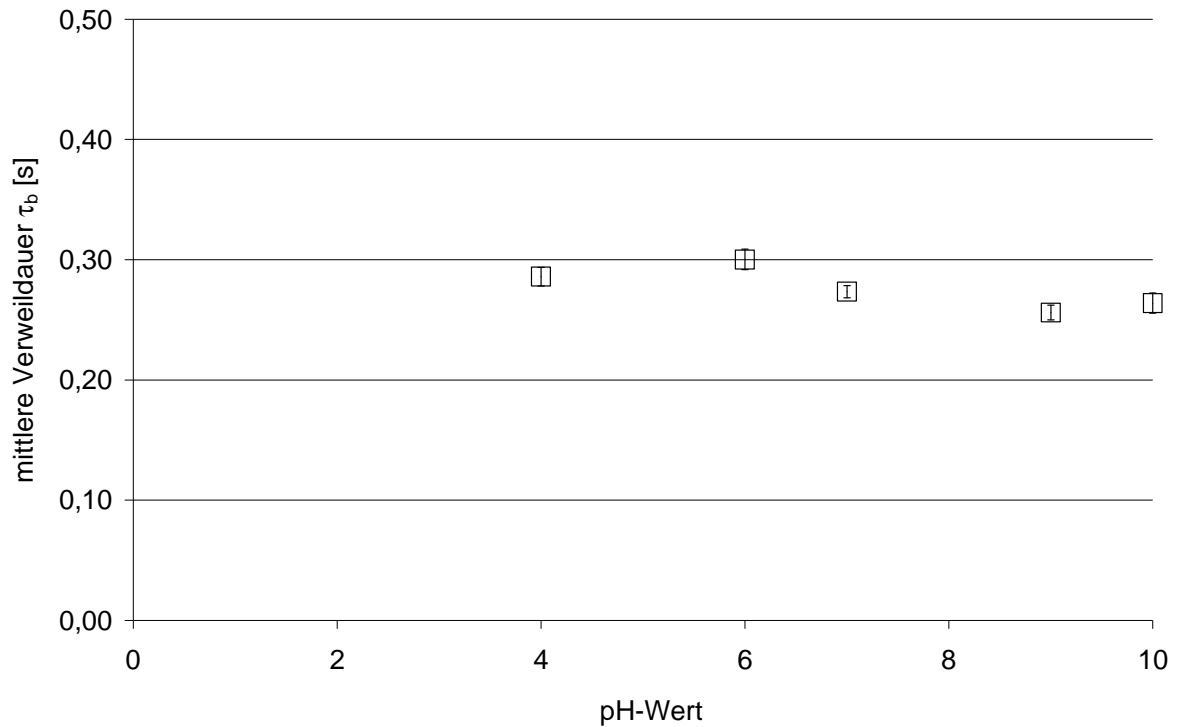


Abbildung 4.43: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO vom pH-Wert

Die Größe der Vesikel, berechnet über D_b zeigen keinen eindeutigen Trend im Verlauf der Versuchsreihe (siehe Abbildung 4.44)

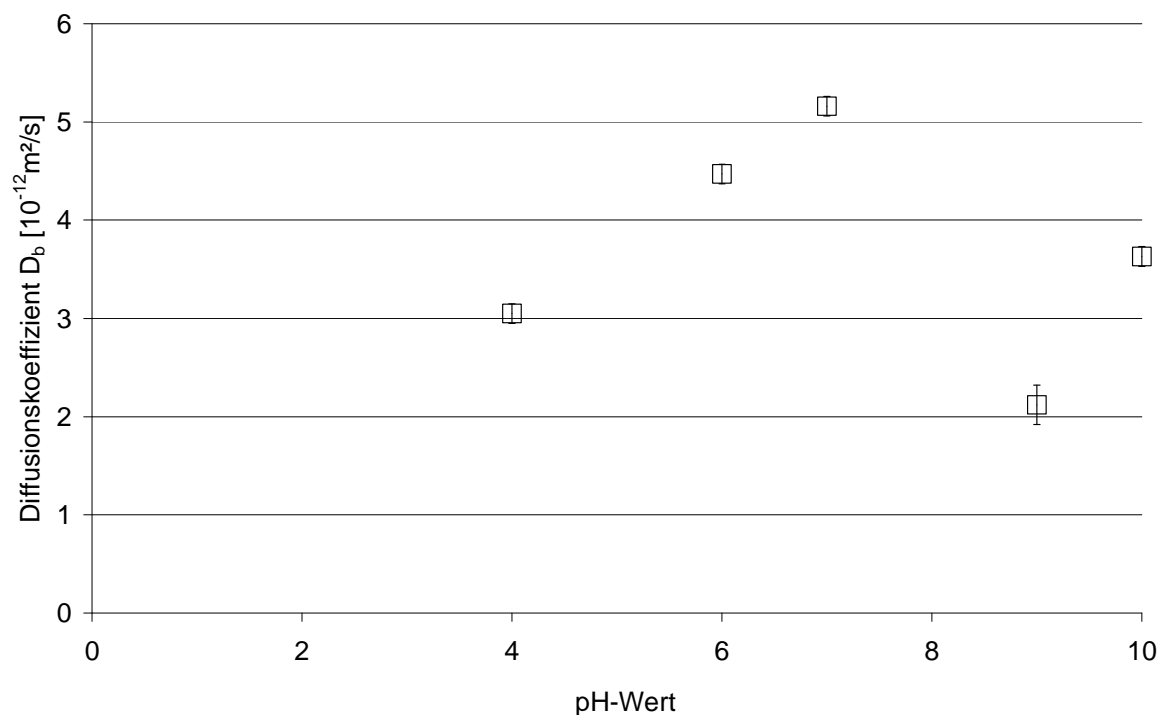


Abbildung 4.44: pH-Wertabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D_b in Vesikeln aus PLA-PEO

Sowohl die Werte des Diffusionskoeffizienten als auch des relativen eingekapselten Volumens schwanken um einen Mittelwert ($D_b = 3,5 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$, $p_b = 0,2 \%$) und haben ihr Maximum bei einem pH-Wert von 7 ($D_b = 5,2 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$, $p_b = 0,25 \%$). Die Werte für die mittlere Verweildauer schwanken zwischen 260 ms und 300 ms. Hier liegt das Maximum mit 300 ms bei pH 6.

4.6 Austauschverhalten aus PB-PEO Vesikeln

Neben den bereits beschriebenen Blockcopolymeren werden auch einzelne Versuche an PB-PEO15 (PB: PEO = 40: 25, $M_w=3340 \text{ g/mol}$) durchgeführt.

4.6.1 Austauschverhalten von Wasser

Als erstes wird die mittlere Verweildauer von Wasser in Vesikeln aus PB-PEO bestimmt. Es ergibt sich ein Wert von ca. 150 ms.

4.6.2 Einfluss der Temperatur auf das Austauschverhalten

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der mittleren Verweildauer von der Temperatur wird eine Vesikelprobe NMR-spektroskopisch untersucht, wobei die Temperatur schrittweise von 25 auf 37°C erhöht wird. Gemessen wird auch diesmal immer das Austauschverhalten von Wasser. Auch im Fall von PB-PEO wird analog zum PI-PEO eindeutig ein Einfluss der Temperatur deutlich, wie in Abbildung 4.45 und Tabelle 8.15 (siehe Anhang) zu erkennen ist. Mit steigender Temperatur nimmt die mittlere Verweildauer um einen Faktor 1,5 von 100 ms auf 70 ms ab, und somit die Permeabilität der Membran zu.

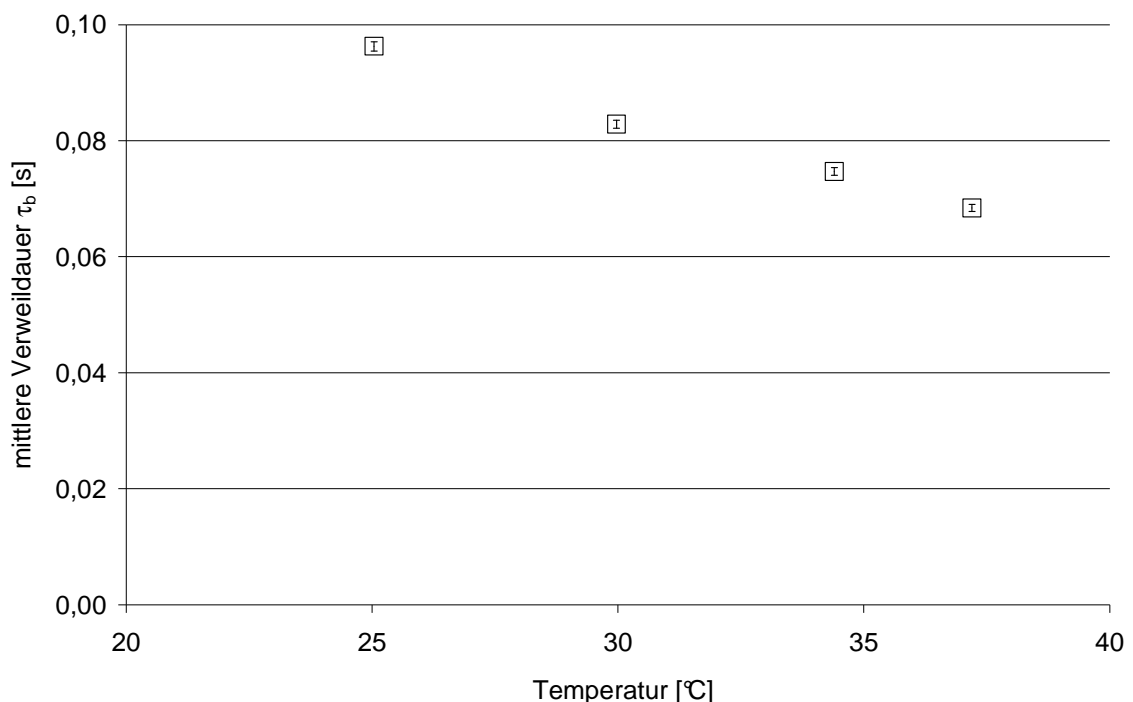


Abbildung 4.45: Abhängigkeit der Verweildauer τ_b von Wasser in Vesikeln aus PB-PEO von der Temperatur.

Die Werte für den Diffusionskoeffizienten D_b erhöhen sich im Laufe dieser Versuchsreihe nur minimal von $3,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ auf $3,7 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Im Gegensatz dazu minimiert sich die relative eingekapselte Menge Wasser linear um einen Faktor 3 von 2,2 % auf 0,7 %.

Auch im Fall von PB-PEO kann über die entsprechende Auftragung (siehe Abbildung 4.46) die Aktivierungsenergie für den Membrantransfer berechnet werden.

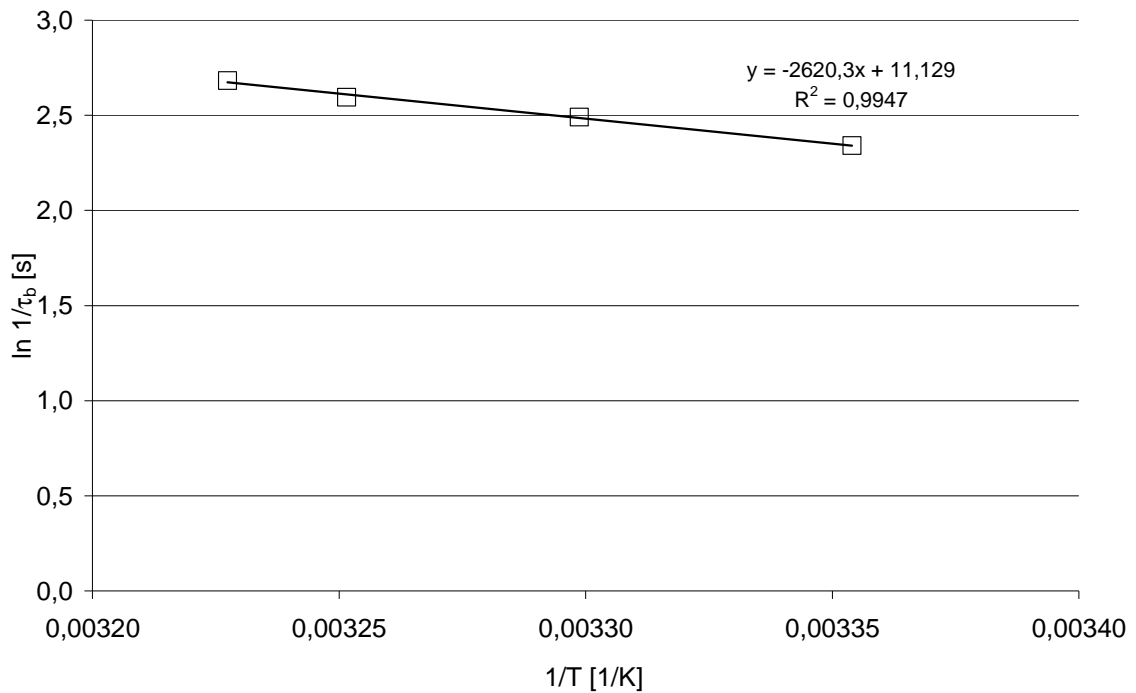


Abbildung 4.46: Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A für den Membrandurchtritt aus PB-PEO Vesikeln.

Es ergibt sich ein Wert von ca. $22,3 \text{ kJ/mol} \pm 1,8 \text{ kJ/mol}$.

5 Diskussion

5.1 Herstellung und Charakterisierung der Vesikelsysteme

Wie bereits mehrfach beschrieben, führen verschiedene präparative Ansätze zur erfolgreichen Darstellung von Vesikelsystemen. Eine sehr zeitsparende Methode stellt die neu entwickelte „Tintenstrahldrucker“-Methode dar^[45]. Mit ihrer Hilfe werden im Fall des P2VP-PEOs innerhalb weniger Minuten sehr kleine Vesikel (50 nm) mit einer sehr geringen Polydispersität ($PD_2 < 0,2$) hergestellt.

Im Gegensatz zur „Tintenstrahldrucker“-Methode ist aus der Literatur bekannt, dass bei der Anwendung dieser Chloroform-Methode sehr polydisperse, multilamellare Vesikel entstehen^[96]. Dies kann im Fall des P2VP-PEOs eindeutig widerlegt werden. Die entstehenden Vesikel haben einen Durchmesser zwischen 100 nm und 500 nm (je nach Darstellungsansatz) mit einer Polydispersität von 0,08 bzw. 0,28, in Abhängigkeit vom verwendeten Blocklängenverhältnis. Daher kann bei diesen Vesikeldispersionen auch auf eine weiterführende Aufarbeitung mittels Extrusion oder Ultraschall verzichtet werden, da diese Aufarbeitung nur zum Zweck der Verkleinerung der Vesikel und der Verringerung der Polydispersität der Dispersion angewandt wird. Alle Ergebnisse in Kapitel 4.1.1 zeigen jedoch eindeutig, dass in diesem Fall eine Aufarbeitung mittels Extrusion keine Veränderung der Größe der Vesikel bzw. der Polydispersität mit sich führt.

Allerdings zeigen diese Ergebnisse ebenfalls, dass es nicht möglich ist, eine definierte Vesikelgröße reproduzierbar darzustellen. Den größten Nachteil der Chloroform-Methode stellt allerdings der benötigte Zeitaufwand dar, da eine Mischung der Chloroformlösung mit Wasser einige Tage gerührt werden muss, damit das organische Lösungsmittel vollständig verdunstet. Unter Berücksichtigung all dieser Vor- und Nachteile wird die Chloroform-Methode standardmäßig verwendet, um Vesikeldispersionen aus P2VP-PEO herzustellen.

Bei den Untersuchungen der weiteren Polymere PI-PEO und PLA-PEO fällt zuerst einmal der Einfluss des pH-Wertes sehr stark ins Gewicht. Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, ist bei der Darstellung von Vesikel darauf zu achten, dass ein neutraler pH-Wert von 7 eingehalten wird. Um dies zu gewährleisten, müssen alle Darstellungen in einem Puffermedium bei einem entsprechenden pH-Wert durchgeführt werden.

Die Anwendung der „Tintenstrahldrucker“-Methode bei diesen beiden Polymeren entfällt, da sich in Ethanol keine echten Polymerlösungen sondern Dispersionen bilden. Diese Dispersionen entstehen wahrscheinlich aufgrund von Mizellbildung der Polymere in Ethanol. Werden diese Dispersionen in das Lösungsmittel Wasser gedruckt, so entstehen keine

Vesikel, sondern die bereits vorhandenen Mizellen bleiben erhalten. Zur Darstellung echter Polymerlösungen muss daher die Polarität der Lösungsmittel variiert werden. So entstehen unter Verwendung von Chloroform echte Lösungen. Diese können jedoch nicht für die „Tintenstrahldrucker“-Methode verwendet werden, da es zur Bildung der Vesikel nötig ist, dass sich das organische Lösungsmittel mit Wasser mischt. Im Fall des Chloroforms entstehen beim Druck zwei Phasen und die Vesikeldarstellung entspricht dem Prinzip der Chloroform-Methode. Des Weiteren ist es im Fall des PI-PEOs nur mit THF als Lösungsmittel gelungen, Vesikel mit Hilfe der „Tintenstrahldrucker“-Methode herzustellen^[92].

Als weitere Methoden stehen die Chloroform-Methode und die Wasserquellmethode zur Verfügung. Mit diesen beiden Methoden entstehen etwa gleich große Vesikel, welche mit Hilfe einer entsprechenden Aufarbeitung wie Extrusion weiter verkleinert werden können. Dies liegt daran, dass die entstehenden Vesikelmembranen keine starren Strukturen aufweisen, sondern einem ständigen Prozess der Zerstörung und der Neubildung unterliegen. Werden diese Vesikel mit Druck durch eine Membran mit einer entsprechenden Porengröße gepresst, so wird die Vesikelstruktur zerschlagen. Nach diesem Prozess rekombinieren die Membranbruchstücke erneut. Allerdings ist es nicht möglich, die Größe der Vesikel mit dieser Methode zu steuern.

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz einer Extrusion durch eine Membran mit einer Porengröße von 100 nm Vesikel mit einem durchschnittlichen Radius von 150 nm entstehen. Dies könnte auf einen, unter diesen Bedingungen, minimalen thermodynamisch stabilen Radius hindeuten, da es, auch nach häufigem Extrudieren, nicht möglich ist, kleinere Vesikel herzustellen. Des Weiteren belegen die in Abbildung 4.2 gezeigten cryo-TEM-Bilder sehr anschaulich, dass das Rekombinieren der Membranbruchstücke nach der Extrusion zu viel diffuseren Morphologien führt. Während die Vesikel vor der Extrusion eine sehr einheitliche Struktur mit sehr geringer Polydispersität aufweisen, bilden sich nach der Extrusion viele multilamellare Strukturen aus. Somit sollte im Fall des PI-PEOs auf eine Aufarbeitung mittels Extrusion verzichtet werden.

Dies gilt ebenfalls für Vesikel aus PLA-PEO. Es ist bekannt, dass Polylaktid chemisch relativ labil, bzw. biologisch sehr leicht abbaubar ist. Die Ergebnisse der Vesikeldarstellung mit diesem Polymer weisen darauf hin, dass die Bildung der Vesikel unter konstanten Bedingungen durchgeführt werden muss. Kleinste Verunreinigungen im Polymer oder Schwankungen in den Versuchsbedingungen, wie pH-Wert und Temperatur, haben eine sofortige Zersetzung der Vesikel zur Folge, wie auch anhand der Ergebnisse in Kapitel 4.1.3 belegt wird. Aus diesem Grund sollte keine Aufarbeitung der Vesikeldispersionen erfolgen, da auch hier, analog zu Vesikeln aus PI-PEO, mit einer Zerstörung der Vesikelstrukturen zu

rechnen ist.

Zur Lagerungsfähigkeit der verwendeten Vesikeldispersionen lässt sich festhalten, dass alle über einen kurzen Zeitraum von sieben Tagen stabil bleiben. Vesikel aus P2VP-PEO und PI-PEO zeigen darüber hinaus die beste Lagerfähigkeit. Untersuchungen ergeben, dass diese bis zu 6 Wochen ohne eine deutliche Änderung der Größe lagerbar sind. Allerdings setzt sich in beiden Fällen mit der Zeit ein weißer Niederschlag ab. Da es sich bei dem vorliegenden System um eine Dispersion von Vesikeln in Wasser handelt, kommt es aufgrund einer Entmischung zur Trennung zwischen Wasserphase und Vesikelmateriale. Die Blockcopolymere setzen sich als weißer Niederschlag am Boden des Gefäßes ab. Durch regelmäßiges mechanisches Schütteln wird dieser Entmischung vorgebeugt. Im Gegensatz zum PI-PEO und P2VP-PEO ist bekannt, dass sich Polylaktid mit der Zeit zersetzt, da es, wie bereits erwähnt, biologisch sehr leicht abbaubar ist. Dieser Effekt wird auch mit Hilfe der ^1H -PFG-NMR beobachtet. Hier nimmt die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln innerhalb von sieben Tagen um 20 % ab. Dies spricht eindeutig dafür, dass die Permeabilität der Vesikelwand aus PLA-PEO durch Abbau des Laktids ansteigt. Somit ist es besonders bei diesem Polymer sehr wichtig, Vesikel zeitnah zum Experiment darzustellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Spezialfall des P2VP-PEOs die „Tintenstrahldrucker“-Methode eine sehr gute Herstellungsmethode darstellt. Allerdings ist diese Methode für eine ^1H -NMR-Untersuchung nicht anwendbar, da störende Lösungsmittelsignale die Sondensignale überlagern können, wie im Kapitel 5.2 diskutiert wird. Dieser Aspekt wird durch die Verwendung der Chloroform-Methode umgangen, welche somit für alle Polymere zur Vesikeldarstellung herangezogen wird. Auf eine Aufarbeitung mittels Extrusion wird in allen Fällen verzichtet, da sie für Vesikel aus P2VP-PEO keine Auswirkung auf die Vesikelgröße zeigt, und für PI-PEO und PLA-PEO eher eine Zerstörung der vorhandenen Vesikelstrukturen zu erwarten ist. Im Hinblick auf die Stabilität fällt besonders der biologische Abbau des Laktids in PLA-PEO Vesikeln ins Gewicht. Dadurch ist die Haltbarkeit der entsprechenden Vesikel stark begrenzt. Verglichen damit ist die Lagerung von Vesikeln aus P2VP-PEO und PI-PEO über mehrere Wochen unproblematisch.

5.2 Interpretation der ^1H -PFG-NMR Messungen

Wie bereits im Kapitel 5.1 ausführlich diskutiert stellt die neuartige „Tintenstrahldrucker“-Methode die optimale Darstellungsmethode für Vesikelsysteme dar. Allerdings kommt es aufgrund des verwendeten Lösungsmittels Ethanol gerade im Hinblick auf ^1H -PFG-NMR-Messungen zu Problemen.

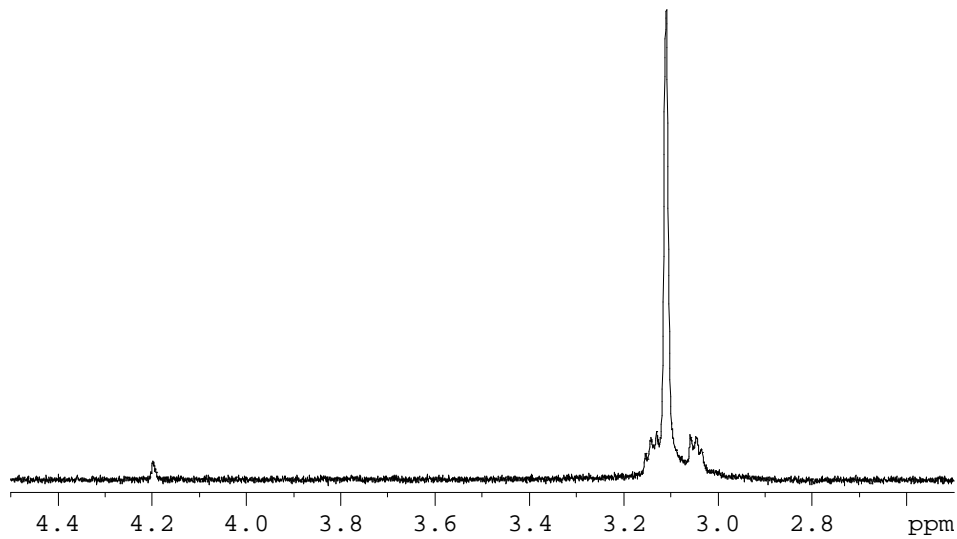
Es können Überlagerungen mit anderen Sondensignalen auftreten, wie im Fall des Polyethylenoxids beschrieben (siehe Kapitel 4.2). Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht geklärt werden, aus welchem Grund es bei manchen Versuchen zu Überlagerungen kommt, andere Darstellungsreihen hingegen getrennte Signale im ^1H -NMR Spektrum liefern. Um diesen nicht absehbaren Effekt zu vermeiden, müssen zur Durchführung der „Tintenstrahldrucker“-Methode weitere Lösungsmittel untersucht werden. Allerdings konnte kein Lösungsmittel gefunden werden, welches mit Wasser mischbar ist und keine Signale im Bereich von 3,1 ppm im ^1H -NMR-Spektrum ausweist. Daher werden alle Vesikeldispersionen mit der Chloroform-Methode hergestellt.

Des Weiteren treten bei den ^1H -PFG-NMR-Untersuchungen, bei denen PEO als Sonde verwendet wird, ebenfalls wesentliche Probleme auf. Zum einen ist auch PEO im verwendeten Blockcopolymer P2VP-PEO als hydrophiler Teil enthalten. Somit kommt es zu einer Überlagerung der beiden Signale, des reinen PEOs als Sonde und des PEOs der Vesikel. Allerdings ist das Signal des Vesikel-PEOs so schwach, dass es weniger als 0,02% der Intensität des PEOs Signals bei 3,1 ppm beansprucht. Dies wird anhand der gezeigten Spektren in Abbildung 5.1 verdeutlicht.

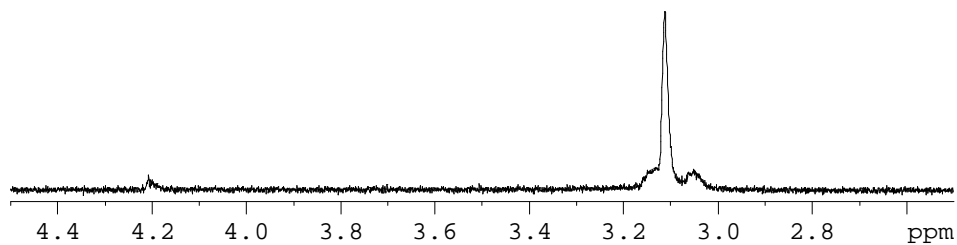
Des Weiteren kann gerade mit PEO als Sonde mit vergleichsweise hohen Konzentrationen (2 Gew%) und sehr geringen Scanzahlen gearbeitet werden. So werden die meisten ^1H -NMR-Experimente mit einer Scanzahl von 4 bis 8 Scans durchgeführt. Dadurch verschwindet das Signal des P2VP-PEOs bei 3,1 ppm fast vollständig im Rauschen des Spektrums, wie anhand der Abbildung 5.1 c verdeutlicht.

Eine weitere Frage ist, ob die untersuchten Sonden wirklich im Vesikel eingekapselt sind, oder ob eine Verringerung der lateralen Mobilität auf eine äußere Anhaftung der Sonde an die Vesikelmembran zurückzuführen ist. Anhand des durchgeführten ^1H -PFG-NMR-Experiments werden zwei verschiedene Fraktionen detektiert. Zum einen eine frei bewegliche Fraktion, zum anderen eine immobilisierte Fraktion. Diese immobilisierte Fraktion sollte die eingekapselten Sonden darstellen.

a



b



c

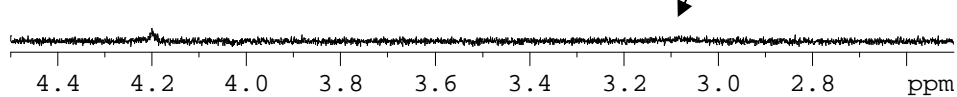


Abbildung 5.1: ^1H -NMR Spektrum a) von PEO 400 in einer Vesikeldispersion aus P2VP-PEO, b) einer reinen PEO 400 Lösung c) einer reinen Vesikeldispersion aus P2VP-PEO

Da die erhaltenen Signale im Spektrum (siehe Abbildung 2.29) sehr schmal sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Rotationsmobilität der Sonden uneingeschränkt ist. Dies wäre nicht der Fall, wenn die Sonde durch Wechselwirkungen mit dem Blockcopolymer an der Membran haften würde. Des Weiteren kann anhand des durchgeführten pH-Versuchs gezeigt werden, dass die Sonde eingekapselt sein muss. Bei diesem Versuch wird PEO 200 als Sonde in Vesikeln aus P2VP-PEO bei einem neutralen pH-Wert eingekapselt. Anschließend wird mit Hilfe der ^1H -PFG-NMR ein im Kapitel 3.3 beschriebenes Experiment durchgeführt.

Man erhält einen erwarteten Verlauf der Zerfallskurve wie in Abbildung 4.21 (oben) dargestellt. Nun werden die Vesikel mit Hilfe eines sauren pH-Wertes zerstört. Wie später noch diskutiert wird, ist es bei Vesikeln aus P2VP-PEO möglich, die Vesikel durch Steuerung des pH-Wertes zu zerstören (siehe Kapitel 5.7.2). Mit dieser Lösung wird ebenfalls ein analoges ^1H -NMR-Experiment durchgeführt und man erhält ebenfalls zwei Steigungen im Diagramm. Allerdings weisen diese andere Werte auf als im Fall der Vesikeldispersion mit

PEO 200 als Sonde (siehe Abbildung 4.21 unten). Diese Steigungen können zum einen dem als Sonde enthaltenden PEO 200 (steile Anfangssteigung), zum anderen dem frei in der Lösung diffundierenden Blockcopolymer P2VP-PEO zugeordnet werden. Dieses ist mit einer Molmasse von 7350 g/mol um mehr als das 35fache schwerer als die verwendete Sonde, und daher auch um ein Vielfaches langsamer. Der mit Hilfe dieses Experimentes ermittelte Diffusionskoeffizient für das P2VP-PEO liegt mit $9,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ in der gleichen Größenordnung wie der Wert der freien Diffusion in einer reinen P2VP-PEO Lösung ($1,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Dies beweist eindeutig, dass alle in der Lösung vorhandenen Vesikel vollständig zerstört sind.

Sollte nun das PEO 200 weiterhin äußerlich durch Wechselwirkungen an das P2VP-PEO gebunden sein, so würde dieser Zustand unabhängig von einer Vesikelformation vorliegen. Das bedeutet, dass sich die Zerfallskurven der Messungen mit intakten und zerstörten Vesikeln nur minimal unterscheiden dürften. Da jedoch ein ganz anderer Verlauf detektiert wird, welcher eindeutig durch die freie Diffusion der Sonde und des Blockcopolymer zustande kommt, kann festgehalten werden, dass das PEO in den Vesikeln eingekapselt wird. Gegen dieses Experiment spricht, dass aufgrund der sauren Zerstörung der Vesikel auch die möglichen Wechselwirkungen zwischen dem PEO und dem Blockcopolymer verändert werden. Dies kann leider mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden nicht untersucht werden.

Eine Möglichkeit, dies nachzuprüfen, wäre eine Untersuchung mit radioaktiv markierten Sonden. In diesem Fall würde mit Hilfe der Säulenchromatografie untersucht werden, wie schnell die radioaktiv markierte Sonde aus den Vesikeln entweicht. Allerdings ist diese Methode erst für Verweildauern von mehreren Minuten anwendbar, so dass sie für das hier vorliegende System keine Anwendung findet.

Die gefundenen mittleren Verweildauern von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO liegen im Bereich von 200 ms.

5.3 Zeitaufgelöste ^1H -PFG-NMR-Messung

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass es mit Hilfe der in der Literatur beschriebenen ^1H -PFG-NMR Methode nur möglich ist, sehr kurze Verweilzeiten der Sonden in den Vesikeln zu detektieren^[57, 85, 88]. Dabei ist die Aufspreizung der Zerfallskurven abhängig von der detektierten Verweildauer der Sonden. Aus diesem Grund kann es wegen der geringen Permeabilität zu einer Überlagerung aller Zerfallskurven kommen. Die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffträgersysteme zeigen teilweise einen vergleichbaren Effekt. Daraus wird geschlossen, dass Verweilzeiten in Vesikeln im Minuten- bzw. Stundenmaßstab erwartet werden können.

Um auch diese Vesikel charakterisieren zu können, wird eine zeitaufgelöste ^1H -PFG-NMR-Methode entwickelt und optimiert, mit deren Hilfe es nun möglich ist, standardmäßig Verweilzeiten zwischen 20 s und mehreren Stunden zu ermitteln. Die Entwicklung dieser Methode wird hauptsächlich an Liposomen aus EPC und Glukose als Sonde durchgeführt. Für dieses System sind die zu bestimmenden Permeationskoeffizienten bereits mit Hilfe weiterer analytischer Methoden systematisch untersucht worden^[97]. Somit ist es möglich diese Kombination aus Wirkstoffträger und Sonde als „Standard“ zu verwenden. Mit Hilfe der entwickelten Methode (siehe Kapitel 3.4) und den für dieses System optimierten Versuchsparametern wird eine Zeit von 3 h für den Austausch von Glukose durch Liposomen-Membranen aus EPC ermittelt. Diese mittlere Verweildauer stimmt mit den vorgegebenen Werten anderer Analysenmethoden überein.

Aus diesem Grund wird diese zeitaufgelöste Methode auch für weitere Systeme eingesetzt. Dabei handelt es sich vor allem um Liposomen mit einem Polymerskelett, welche von A. Neub in seiner Dissertation entwickelt und untersucht wurden^[86]. Für diese Systeme können Verweilzeiten bis zu 9 h bestimmt werden. Dies belegt gleichzeitig den großen Vorteil dieser neuen Methode. Bei bisherigen Charakterisierungen von Membranen in Hinblick auf ihre Permeabilität werden hauptsächlich chromatographische oder mikroskopische Verfahren verwendet. Bei diesen ist es notwendig, dass die verwendete chemische Sonde eine Markierung, z. B. in Form von Fluoreszenz oder Radioaktivität, aufweist.

Im Fall der ^1H -PFG-NMR werden die im Sondenmolekül vorhandenen Protonen als Markierung verwendet, so dass auf ein weiteres „labeln“ verzichtet werden kann. Des Weiteren tritt besonders bei fluoreszenzmarkierten Sonden das Problem auf, dass die Intensität der Färbung mit der Zeit sehr stark abnimmt. Daher kann es vorkommen, dass mikroskopisch nur eine Betrachtung von Verweilzeiten im Minutenmaßstab möglich ist. Im Gegensatz dazu ermöglicht es die neu entwickelte zeitaufgelöste Messmethode auf

Grundlage der ^1H -PFG-NMR jetzt Verweilzeiten bis zu mehreren Monaten zu untersuchen. Dazu müssen zwei verschiedene, experimentelle Ansätze durchgeführt werden. Im Falle relativ kurzer Verweildauern im Maßstab von Minuten oder Stunden wird die Messung vollständig ohne Unterbrechung durchgeführt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Laufzeit der ^1H -PFG-NMR Messung mindestens der dreifachen erwarteten Verweilzeit entspricht.

Dies stellt gleichzeitig den größten Nachteil dieser Methode dar. Werden Austauschzeiten von Tagen oder Wochen erwartet, ist es möglich, in entsprechenden regelmäßigen Intervallen ein ^1H -PFG-NMR Experiment durchzuführen. Dabei ist es wichtig, dass die untersuchte Probe keine Zersetzung aufweist, da dies zu einer Verringerung der Signalintensität führt. Diese Intensität stellt die Grundlage der Versuchsauswertung dar. Wie in Kapitel 3.4 gezeigt, wird die Intensität des FIDs bzw. des Signals gegen die Zeit aufgetragen und mit Hilfe einer Gleichung beruhend auf einer Kinetik 1. Ordnung ausgewertet. Zerfällt nun diese Intensität aufgrund einer Zersetzung der Probe, so ist folglich auch keine Auswertung mehr möglich.

Ein weiteres Problem tritt bei sehr kurzen Austauschzeiten auf. Hier ist darauf zu achten, dass ein Mittelweg zwischen einer optimalen Mischung der Vesikeldispersion mit der Sondenlösung, und einer kurzen Mischzeit von wenigen Sekunden gefunden wird. Dauert das Mischen der beiden Komponenten bei sehr permeablen Vesikeln zu lange, so befindet sich das System vor Starten der Messung bereits nahezu im Gleichgewicht. Eine Konsequenz daraus ist, dass kaum mehr ein Signalanstieg detektiert werden kann. Wird hingegen die Mischung der Komponenten nicht ausreichend durchgeführt, dann ist der Signalverlauf aufgrund der in der Probe auftretenden Inhomogenitäten nicht auswertbar.

Dieser Effekt zeigt gleichzeitig eine Limitierung der Methode auf. Aufgrund der erforderlichen optimalen Mischung der Komponenten ist es nicht möglich, mittlere Verweildauern unter 20 s zu bestimmen.

5.4 Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten

Die untersuchten Vesikel sollen in späteren Anwendungen als Wirkstoffträgersysteme genutzt werden. Für diesen Einsatz ist es von großer Bedeutung, mögliche Einflüsse auf die Permeabilität der Vesikelmembran zu untersuchen. Diese Durchlässigkeit kann mit Hilfe der ^1H -PFG-NMR durch Berechnung der durchschnittlichen Verweildauer von Sondenmolekülen in den Vesikeln sehr genau untersucht werden. Dieses Austauschverhalten sollte zum einen von den Eigenschaften der Vesikel wie z. B. der Bilayerdicke und der Größe, zum anderen von den physikalisch-chemischen Versuchsbedingungen abhängen. Des Weiteren kann ein Einfluss der benutzten Sonde nicht ausgeschlossen werden.

In den folgenden Kapiteln werden alle untersuchten Einflüsse eingehend diskutiert, begonnen wird dabei mit den Eigenschaften der benutzten Vesikel.

5.4.1 Einfluss des Radius

Aus der Literatur ist bekannt, dass die mittlere Verweildauer von Sondenmolekülen in den Liposomen von der Größe dieser Liposomen abhängen^[98]. Die durchgeführten Experimente mit Vesikeln aus P2VP-PEO zeigen hingegen zwei unterschiedliche Ergebnisse. Bei großen Sonden ($R_H > 5$ nm) und relativ kleinen Vesikeln ($R_H < 60$ nm) ist eindeutig eine Abhängigkeit der mittleren Verweildauer vom Radius der Vesikel zu erkennen (siehe Abbildung 4.11). Bei größeren Vesikeln ($R_H \geq 200$ nm) und kleineren Sonden (z. B. PEO 200, $R_H = 0,43$ nm) kann kein Einfluss der Größe der Vesikel auf die mittlere Verweildauer bestimmt werden (siehe Abbildung 4.10). Um dies zu erklären kann vermutet werden, dass sich der Austauschprozess im gewählten Zeitfenster auf die nähere Umgebung der Vesikelmembran beschränkt und somit die mittlere Verweildauer der Sonden in den Vesikeln unabhängig von ihrer Größe ist. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich, da gerade kleine Sonden eine sehr hohe molekulare Beweglichkeit aufweisen.

Im Fall des PEO 200, welches einen Diffusionskoeffizienten von $5,5 \cdot 10^{-10}$ m²/s in Wasser besitzt, liegt die mittlere Verschiebung bei 24 μ m/s. Daher legt diese Sonde im gewählten Zeitfenster zwischen 100 ms und 300 ms eine viel größere Wegstrecke zurück, als eine Sonde mit einem größeren hydrodynamischen Radius. So legt das PEO 100000 ($R_H = 5$ nm) nur eine mittlere Wegstrecke von 5 μ m pro Sekunde zurück, was einem fünftel der Wegstrecke des PEO 200 entspricht. Daher ist es zu erklären, dass die Größe der hier verwendeten Vesikel, sie liegt bei 500 nm, für kleine Sonden keinen Einfluss zeigt. Diese durchqueren die Vesikel in 100 ms durchschnittlich fünfmal, während große Sonden diese im gewählten Zeitfenster höchstens einmal durchqueren können. Somit kann auf die Definition einer ausschließlich am Austauschprozess beteiligten Randzone verzichtet werden, auch wenn Stöße der Sonden untereinander oder mit der Vesikelwand zu einer starken Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit führen können.

Weiterführende Experimente mit Sonden unterschiedlicher Größe (siehe Kapitel 4.3.2) weisen auf zwei unterschiedliche Mechanismen beim Durchqueren der Vesikelwand hin. Dies wird im folgenden Kapitel 5.5 ausführlich diskutiert und daher an dieser Stelle nur kurz erörtert. Wird davon ausgegangen, dass sich das verwendete Polyethylenoxid als Knäuel in der Lösung bewegt, so ist es für kleine Knäuele ($R_H = 0,43$ nm) möglich, ohne Formationsänderung die Vesikelwand zu passieren. Somit wäre eine Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit wesentlich kleiner als im Fall großer Sonden ($R_H > 1$ nm). Diese müssten sich erst teilweise entknäueln, um als gestrecktes Polymer die Membran zu passieren, was zu einer starken „Abbremsung“ führen müsste.

Eine wichtige Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist, dass bei der Vesikeldarstellung darauf zu achten ist, dass die Vesikeldispersion eine möglichst geringe Polydispersität aufweist. Je breiter die Größenverteilung der Vesikeldispersion ist, desto stärker tritt die beschriebene Abhängigkeit hervor. Im Fall der Blockcopolymeren PI-PEO und PLA-PEO werden Wassermoleküle als Sonden verwendet, welche sehr klein sind, so dass der Effekt der Größe der Vesikel bei diesen Untersuchungen vernachlässigbar ist. Wenn allerdings im Fall dieser Blockcopolymeren ein Vergleich zwischen den Verweildauern der verwendeten Wirkstoffmodellsubstanzen (siehe Kapitel 4.3.2.3, 4.4.2, 4.5.2) gezogen werden soll, wäre es nötig eine monodisperse Vesikeldispersion mit gleicher mittlerer Größe der Vesikel aus allen verwendeten Blockcopolymeren herzustellen.

Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht möglich, da keine entsprechende Präparationsmethode zur Verfügung steht. Für P2VP-PEO und PI-PEO wäre dies die beschriebene „Tintenstrahldrucker“-Methode (siehe Kapitel 2.1.3 und Kapitel 3.2.1). Allerdings kann diese aufgrund der in Kapitel 5.2 beschriebenen Probleme für die durchgeführten NMR-Experimente nicht verwendet werden.

5.4.2 Einfluss der Bilayerdicke

Von einem theoretischen Ansatz aus betrachtet, sollte die Bilayerdicke ebenfalls einen sehr starken Einfluss auf die mittlere Verweildauer von Sonden in den Vesikeln haben, wobei eine lineare Abhängigkeit in Betracht gezogen werden könnte. Diese Abhängigkeit kann mit Hilfe von Vesikeln aus P2VP-PEO und PEO 200 als Sonde bestätigt werden. Hier ergibt sich bei einer Vergrößerung der Bilayerdicke von 9 nm auf 13 nm eine lineare Erhöhung der mittleren Verweildauer um 60%. Daher stellt die Variation der Bilayerdicke eine sehr gute Möglichkeit dar, die Permeabilität der verwendeten Vesikel zu steuern. Je dicker die Membran ist, desto größer wird die mittlere Verweildauer der Sonden in den Vesikeln und desto geringer ist somit die Permeabilität der Membran. Der anscheinend lineare Zusammenhang dieser beiden Werte ermöglicht es, eine Bilayerdicke zu bestimmen, welche die gewünschte mittlere Verweildauer zur Folge haben würde.

Allerdings ist die Permeabilität im Fall des P2VP-PEO sehr hoch, die Verweildauern z. B. von PEO liegen im Maßstab von Millisekunden bis Sekunden in Abhängigkeit von der verwendeten Molmasse. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel 5.5 noch einmal genauer diskutiert. Um eine Verweildauer z. B. von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO von ca. 1 s zu erzielen, müsste eine Bilayerdicke von 39 nm vorliegen. Wird dieser Wert auf die Molmasse des zu verwendenden Blockcopolymeren umgerechnet, so ergibt sich ein Wert von ca. 27000 g/mol. Aufgrund dieser Größe ist es fraglich, ob mit Hilfe dieses Polymeren überhaupt Vesikel entstehen. Auf Grundlage des Modells von Israelachvili [siehe Gleichung 2.3] muss neben dem Volumen der Blockcopolymermoleküle auch ein passendes

Produkt aus mittlerem Flächenbedarf der Kopfgruppe sowie der Konturlänge der hydrophoben Gruppe gegeben sein, um einen Packungsparameter zwischen $\frac{1}{2}$ und 1 zu erzielen. Somit muss das zu synthetisierende Polymer neben der gesuchten Molmasse auch ein entsprechendes Blocklängenverhältnis aufweisen. Ist dieses Blockcopolymer dargestellt, besteht weiterhin die Frage, ob sich mit diesem Vesikel bilden lassen. Laut dem Modell von Israelachvili sollte dies der Fall sein, allerdings wäre das entsprechende Blockcopolymer sehr groß. Sollte es sich zu Doppelschichten und schließlich zu Vesikeln selbstorganisieren, ist davon auszugehen, dass aufgrund des benötigten Krümmungsradius sehr große Vesikel entstehen. Dies wäre somit wieder kontraproduktiv, da die verwendeten Vesikel, um als Wirkstoffträger fungieren zu können, kleiner als 1 μm im Durchmesser sein sollten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass reines P2VP-PEO als Vesikelmateriale zur Anwendung als Wirkstoffträger nicht geeignet ist. Nur über die Bilayerdicke und die Größe der Vesikel ist es nicht möglich, eine geeignete Permeabilität zu erzielen, um als Wirkstoffträger eingesetzt werden zu können. Aus diesem Grund ist es nötig weitere Blockcopolymere mit hydrophoberen Monomereinheiten herzustellen und zu untersuchen.

5.4.3 Einfluss des verwendeten Blockcopolymers

Um weitere Blockcopolymere zu synthetisieren, welche Vesikel bilden, sollte folgender Aspekt berücksichtigt werden: aufgrund ausreichender Ergebnisse im Fall von Liposomen ist bekannt, dass Polyethylenoxid einen so genannten „stealth effect“ bewirkt^[3]. Das bedeutet, dass entsprechende, maskierte Wirkstoffträgersysteme wesentlich langsamer vom Immunsystem des menschlichen Körpers als Fremdstoffen identifiziert werden. Aus diesem Grund ist es auch im Hinblick auf Vesikel wichtig, dass PEO als hydrophiler Teil der Membran erhalten bleibt. Somit kann nur der hydrophobe Bereich des verwendeten Blockcopolymers variiert werden. Es ist davon auszugehen, dass die Permeabilität der Membran stark von der Polarität dieses Teils abhängt. Dies kann sehr gut an der mittleren Verweildauer von Wasser in Vesikeln aus P2VP-PEO, PI-PEO, PB-PEO und PLA-PEO diskutiert werden. Die Membran der Vesikel aus P2VP-PEO stellt für Wasser keinerlei Barriere dar, da es mit Hilfe der ^1H -PFG-NMR nicht möglich ist einen eingekapselten Anteil zu detektieren. Die mittlere Verweildauer ist somit kürzer als 10 ms.

Im Gegensatz dazu liegt die durchschnittliche Verweildauer von Wasser in den Vesikeln aus PI-PEO und PB-PEO bei 150 ms. Da die verwendeten Blockcopolymere sowohl eine ähnliche chemische Struktur als auch ein ähnliches Blocklängenverhältnis aufweisen, sind gleiche Permeabilitäten zu erwarten. Im Gegensatz dazu ist die mittlere Verweildauer von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO mit 250 ms wesentlich höher. Dies ist im ersten Moment der Betrachtung eher überraschend, da die Hydrophobie des PLA-Blockes geringer ist als die des PI- bzw. PB-Blockes.

Allerdings ist in diesem Fall der Einfluss der Bilayerdicke entscheidend. Wie im Kapitel zuvor beschrieben, ist die mittlere Verweildauer auch abhängig von der Bilayerdicke. Das verwendete Blockcopolymer PLA-PEO weist mit einer Blocklängeinheit von 100 PLA-Molekülen einen etwa dreimal so großen hydrophoben Abschnitt auf wie die benutzten PI-PEO bzw. PB-PEO Blockcopolymere mit jeweils 33 Monomereinheiten. Wird dies mit in Betracht gezogen, so erweist sich die längere mittlere Verweildauer von Wasser in PLA-PEO Vesikeln ebenfalls als ein Effekt der Bilayerdicke. Trotzdem zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass eine Änderung der Polarität des hydrophoben Teils der Vesikelmembran einen großen Einfluss auf die Permeabilität besitzt.

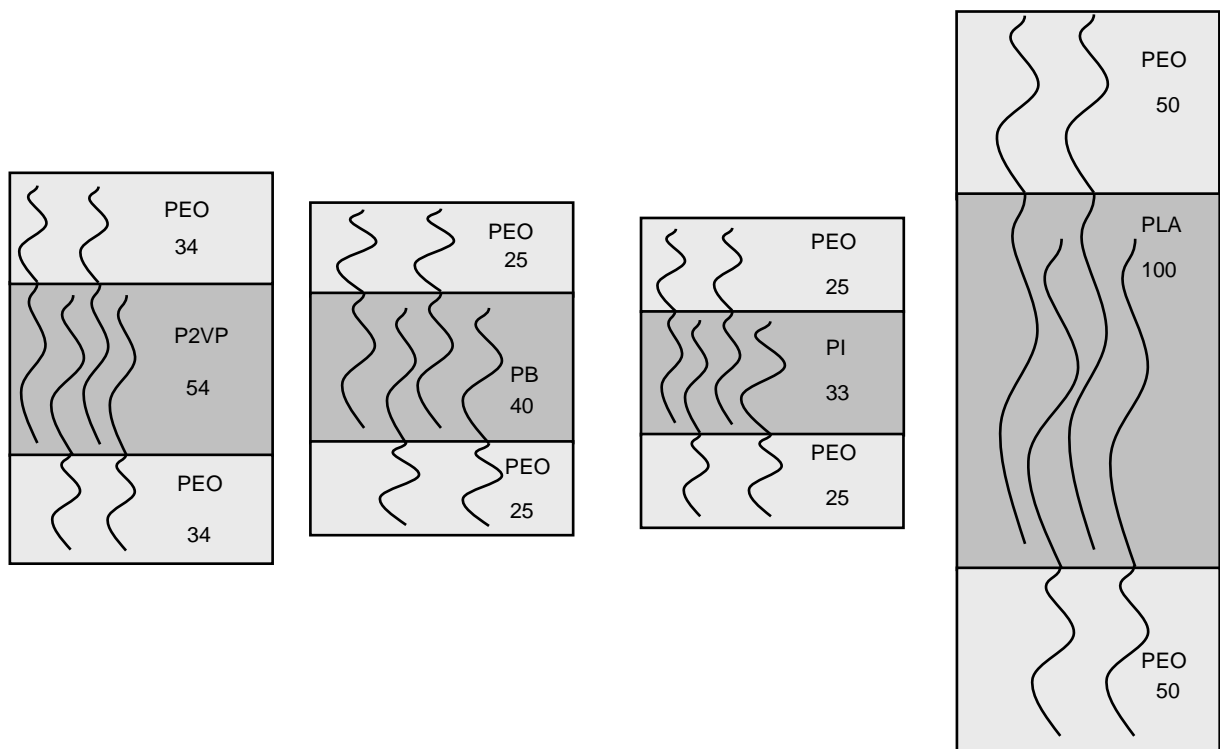


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Verhältnisses zwischen dem hydrophilen (hellgrau) und dem hydrophoben Teil (dunkelgrau) der Vesikelmembran. Die Zahlen geben die Anzahl der Monomereinheiten an.

Im direkten Vergleich der mittleren Verweildauern von Glukose in den drei Vesikelarten P2VP-PEO, PI-PEO und PLA-PEO können die gleichen Argumente wie bereits bei dem Austauschverhalten von Wasser hervorgebracht werden. Auch im Fall der Glukose ist die mittlere Verweildauer in P2VP-PEO-Vesikeln geringer als in PI-PEO-Vesikeln, was durch die unterschiedliche Permeabilität aufgrund der Polarität des Blockcopolymers erklärt werden kann. Im Vergleich dazu verweilt Glukose in Vesikeln aus PLA-PEO am längsten. Dies ist wiederum ein Effekt der Bilayerdicke. Allerdings kann mit diesem Argument nicht geklärt werden, warum eine mittlere Verweildauer von 44 s für Glukose in Vesikeln aus PLA-PEO detektiert wird. Im Vergleich dazu ist die mittlere Verweildauer in Vesikeln aus P2VP-PEO oder PI-PEO mit 0,34 s bzw. 0,38 s wesentlich geringer.

Ein möglicher Erklärungsversuch beinhaltet als Grundlage den sehr langen hydrophoben Abschnitt des PLA-PEOs. Dieses Polymer weist ein Monomerverhältnis von 100 PLA : 50 PEO auf. Daher sind die verwendeten Ketten sehr lang und es kann bei der Bildung der relativ kleinen Vesikel ($R_H = 250 \text{ nm}$) zu einer Verschlingung der Ketten untereinander kommen. Durch diese Verkettung erscheint die Membran wesentlich undurchlässiger, da vor allem große Sonden wie Glukose, diese nur sehr langsam durchdringen. Bei sehr kleinen Molekülen wie z. B. Wasser tritt dieses Verhalten nicht auf, die Moleküle durchdringen die Membran ohne in den Verschlingungen zurückgehalten zu werden. Im Vergleich zum PLA-PEO sind die weiteren verwendeten Blockcopolymere mit einem Monomerverhältnis von 54 : 34 für P2VP-PEO und 33 : 27 für PI-PEO sehr kurzketzig, so dass hier eine Verschlingung der Polymerketten eher unwahrscheinlich ist.

Der Einfluss des Blockcopolymers auf das Austauschverhalten kann auf mehrere Arten verwendet werden, um die Permeabilität der Vesikelmembran weiter zu verringern. Zum einen liegt es nahe, Blockcopolymere mit hydrophoberen Bausteinen zu synthetisieren. Dabei muss, wie bereits beschrieben, sehr genau darauf geachtet werden, dass noch ein entsprechender Packungsparameter eingehalten wird, um eine Selbstorganisation zu Vesikeln zu garantieren. Zum anderen ist es denkbar, längere Polymerketten mit größeren hydrophoben Anteilen darzustellen, wobei auch hier darauf zu achten ist, dass die entstehenden Polymere nicht zu groß werden, um einen Einfluss des Vesikelradius, wie im Kapitel 5.4.1 ausführlich beschrieben, zu vermeiden.

Ein ganz anderer Ansatz ist nutzbar, indem in die bereits vorhandene hydrophobe Schicht der Membran noch weitere hydrophobe Substanzen eingelagert werden. So ist z. B. untersucht worden, welchen Effekt Chloroform bei der Zugabe zu Vesikeln auf die Permeabilität der Membran hat (siehe Kapitel 5.6). Es kann für Vesikel aus PI-PEO und PLA-PEO gezeigt werden, dass die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln durch Zugabe von Chloroform stark verringert wird. Dies wird im Kapitel 5.6 noch einmal ausführlich diskutiert. Tendenziell ist es folglich vorstellbar, die Permeabilität von Vesikelmembranen zum einen über den hydrophoben Teil des Polymers, zum anderen durch Zugabe entsprechender unpolarer Substanzen zu verringern.

Im Hinblick auf diese Substanzen sollte vor allem der Einfluss von solchen Verbindungen, welche für den menschlichen Organismus ungefährlich sind, untersucht werden.

5.5 Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten

5.5.1 Einfluss des hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde

Wenn man, wie im Kapitel 5.3 diskutiert, davon ausgegangen werden kann, dass die verwendeten Sonden in den Vesikeln eingekapselt werden, dann ist es möglich, die Abhängigkeit der mittleren Verweildauer der Sonde von ihren Eigenschaften zu untersuchen. So wird der hydrodynamische Radius der verwendeten Sonden (PEO und PVA) systematisch erhöht und die resultierende mittlere Verweildauer in den Vesikeln bestimmt (siehe Kapitel 4.3.2). In einer Auftragung der mittleren Verweildauer bzw. der Austauschkonstante gegen diesen Radius werden eindeutig zwei Bereiche sichtbar (siehe Abbildung 5.3). Für kleine hydrodynamische Radien (PEO < 2 nm und PVA < 5 nm) wird eine lineare Abhängigkeit gefunden. Diese Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius der Sonde ist im zweiten Teilbereich der Kurve kaum noch vorhanden. Für größere Sonden (PEO > 2 nm, PVA > 5 nm) wird ein Teilbereich mit einer sehr geringen Steigung detektiert.

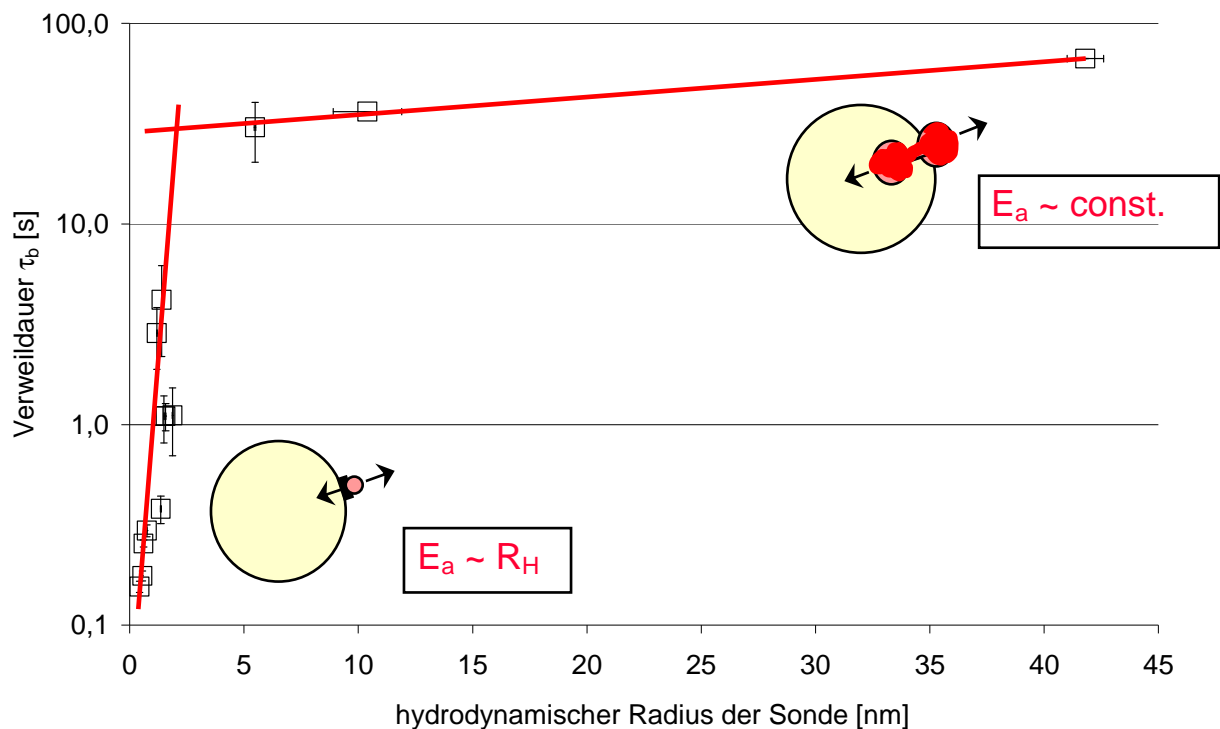


Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Verweildauer vom hydrodynamischen Radius der Sonde, skizzierter Mechanismus des Membrandurchtritts

Diese beiden Bereiche können, wie im Kapitel 5.4 kurz erwähnt, mit zwei verschiedenen Mechanismen beim Membrandurchtritt erklärt werden. Kleine Moleküle können überwiegend durch in der Vesikelwand entstandene „Löcher“ ohne Konformationsänderungen als Knäuel die Membran durchqueren. In diesem Fall ergibt sich allerdings eine sehr starke Abhängigkeit der benötigten Aktivierungsenergie von der Größe der Sonden.

Ab einem hydrodynamischen Radius von ca. 5 nm dominiert ein weiterer Mechanismus: Der Durchtritt erfolgt in diesem Fall durch ein Strecken und Einfädeln der Polymerketten. Ein Ende dieser Polymerkette durchdringt die Vesikelmembran und knäuelnd sich im Inneren des Vesikels erneut, während die restliche Kette noch gestreckt die Membran durchquert. In diesem Fall hat die Größe der Sondenmoleküle und somit die benötigte Aktivierungsenergie einen wesentlich geringeren Anteil an der Abhängigkeit der mittleren Verweildauer als bei kleinen Sonden.

Im Fall der zusätzlich untersuchten Sonden Glukose, Inulin und Dextran wird ebenfalls deutlich, dass die mittlere Verweildauer der Sonden in den Vesikeln von ihrem hydrodynamischen Radius abhängt. Im vorliegenden Fall weist das Inulin in allen drei untersuchten Vesikeldispersionen die längste mittlere Verweildauer auf. Dies ist zunächst unerwartet, da das Inulin mit 5000 g/mol eine wesentlich geringere Molmasse als Dextran (72000 g/mol) aufweist. Messungen des hydrodynamischen Radius der Sonde zeigen allerdings, dass Inulin in Wasser mit 110 nm ein sehr großes Sondenmolekül darstellt. Daher sollte auch in diesem Fall eine Abhängigkeit der mittleren Verweildauer vom hydrodynamischen Radius und nicht von der Molmasse der Sonde untersucht werden. Wie bereits erwähnt zeigt sich auch hier für alle drei Sonden und alle Vesikelarten eine Größenabhängigkeit. Je größer die Sonde, desto langsamer der Austausch durch die Membran. Der Verlauf dieses Austausches entspricht dem ermittelten Verlauf für PEO und PVA. Daher liegen dem Austausch der Wirkstoffmodellsubstanzen ebenfalls die bereits beschriebenen Mechanismen zugrunde.

5.5.2 Einfluss der Polarität der verwendeten chemischen Sonde

Anhand der Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 sowie den dazugehörigen Tabellen ist ersichtlich, dass die beiden bereits beschriebenen Mechanismen für den Membrandurchtritt der Sondenmoleküle sowohl im Falle des Polyethylenoxides als auch des Polyvinylalkohols eintreten scheinen. Der auffälligste Unterschied zwischen diesen beiden Messreihen liegt in den ermittelten Austauschkonstanten. Diese sind für PVA wesentlich kleiner als für PEO, und somit ist die mittlere Verweildauer der PVA Moleküle in den Vesikeln wesentlich länger als die des PEOs. Dies könnte mit Hilfe der unterschiedlichen Polaritäten der beiden Polymere erklärt werden. PEO stellt, in Abhängigkeit von der Molmasse, ein wesentlich polareres Molekül dar als PVA. Somit lässt es sich zum einen leichter in Wasser lösen und zum anderen durchdringt es die Vesikelmembran schneller.

Wie anhand der Ergebnisse der Untersuchungen des Austauschverhaltens von Wasser in Kapitel 4.3 gezeigt, stellt die Membran aus P2VP-PEO eine relativ hydrophile Membran dar. Aus diesem Grunde ist es zu erklären, dass das polare Polyethylenoxid diese Membran sehr leicht durchdringt, ohne vom hydrophoben P2VP-Abschnitt stark zurückgehalten zu werden.

Im Falle hydrophoberer Blockcopolymere sollte das PEO, vergleichbar zu Wasser, wesentlich länger eingekapselt bleiben. Im Fall des unpolaren PVAs ist davon auszugehen, dass sich dieses für einen geringen Zeitraum in dem hydrophoben Teil der Vesikelmembran festsetzt, bevor es die Membran vollständig durchdringt. Mit diesem Aspekt könnten die unterschiedlichen Verweildauern der Sonden PEO und PVA erklärt werden. Allerdings kann aufgrund der in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Einflüsse der Vesikelgrößen nur eine qualitative Aussage über diesen Effekt gemacht werden, da es sich bei den untersuchten Vesikeln um zwei verschiedene Chargen handelt. Daher kann ein Einfluss aufgrund der unterschiedlichen Größen der Vesikel nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich wird im Fall der Messungen des PVA-Austausches die zeitabhängige Messmethode benutzt, so dass auch keine Diffusionskoeffizienten erhalten werden. Somit ist es auch nicht möglich den hydrodynamischen Radius der Vesikel über die Stokes-Einsteinsche Gleichung zu berechnen. Aussagen kann man allerdings, dass dem Austausch von PVA anscheinend ebenfalls zwei verschiedene Mechanismen, wie im Fall des PEOs beschrieben, zugrunde liegen.

5.6 Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten

Bei der Zugabe von Additiven zu Vesikelsystemen gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten. Zum einen wird ein Zusatz gewählt, von welchem bekannt ist, dass er einen erhöhenden Effekt auf die Permeabilität von Kapselsystemen ausweist. Zum anderen wird eine Substanz verwendet, welche sich in der hydrophoben Schicht des Bilayers einlagert. In der vorliegenden Arbeit werden dazu zum einen Ethanol als „aufweichender“ Zusatz und Chloroform als „abdichtender“ Zusatzstoff verwendet.

Die erhaltenen Ergebnisse unterscheiden sich sehr stark in Abhängigkeit vom verwendeten Blockcopolymer. Im Fall der Vesikel aus P2VP-PEO und Ethanol als Additiv kann gezeigt werden, dass dieses Lösungsmittel bis zu einer Zugabe von 12 Vol% keinen Einfluss auf die Permeabilität der Membran aufweist. Über diesen Konzentrationsbereich bleibt sowohl die mittlere Verweildauer (τ_b) als auch der Diffusionskoeffizient (D_b) und das relative eingekapselte Volumen (p_b) konstant.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Vesikel aus P2VP-PEO sich weder in ihrer Größe noch in der Menge der vorhandenen Vesikel verändern. Ab einer Volumenkonzentration von 12 Vol% Ethanol kommt es zu einem schlagartigen Aufklaren der Dispersion. Dies zeigt eindeutig eine Zerstörung der Vesikelstrukturen, was ebenfalls durch die nicht mehr messbare Verweildauer belegt werden kann. P2VP-PEO ist sehr gut löslich in Ethanol, weshalb es nicht verwundert, dass sich auch die entstandenen Vesikel wieder auflösen.

Durch Verringerung der Ethanolkonzentration z. B. durch Zugabe einer Pufferlösung, entsteht erneut eine Vesikeldispersion. Die entstehenden Vesikel weisen ähnliche Eigenschaften auf wie vor der Ethanolzugabe. Die mittlere Verweildauer der Sonde, in diesem Fall muss PEO 200 benutzt werden, verringert sich dabei nur gering. Ebenso bleiben die Vesikel in Bezug auf ihre Größe und ihr relatives eingekapseltes Volumen konstant. Hier kann keine Änderung detektiert werden. Daher hat Ethanol im Fall der Vesikel aus P2VP-PEO bis zu einer Volumenkonzentration von 12 Vol% keinen Einfluss auf die Permeabilität und die Stabilität der Vesikel.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigen Vesikel aus PI-PEO eindeutig eine Abhängigkeit von der zugegebenen Ethanolkonzentration. Hier bleibt sowohl die Größe der Vesikel als auch das relative eingekapselte Volumen bis zu einer Ethanolkonzentration von 40 Vol% konstant. Allerdings wird die mittlere Verweildauer von Wasser in den Vesikeln bis zu 50 % verringert. Dies bedeutet, dass die Permeabilität der Membran zunimmt. Ein sehr interessantes Phänomen in diesem Zusammenhang ist, dass diese Permeabilitätsänderung reversibel ist. Durch Verringerung der Ethanolkonzentration steigt die mittlere Verweildauer von Wasser wieder auf den Anfangswert von 190 ms an, was eindeutig auf eine erneute Verringerung der Permeabilität hinweist. Bei diesen Versuchen wird sowohl das Austauschverhalten von Wasser als auch von Ethanol untersucht. Die mittlere Verweildauer von Ethanol ist dabei wesentlich höher, so dass der Austausch langsamer ist als der von Wasser. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass der detektierte Wasseraustausch nicht durch einen Austausch der Protonen des Wassers mit dem Ethanol zustande kommt. Hierbei würden die Protonen des Wassers mit dem vermutlich in der Membran eingelagerten Ethanol austauschen und somit würde ein Durchqueren der Membran nur vorgetäuscht werden. In diesem Fall müsste für Ethanol eine vergleichbare Verweildauer detektiert werden, da auch die Ethanolprotonen austauschen könnten.

Daher kann festgehalten werden, dass es sich bei dem Austausch dieser beiden Komponenten um ein Durchdringen der Vesikelmembran handelt und es folglich möglich ist, die Permeabilität der Membran in einem kleinen Fenster durch die entsprechende Zugabe an Ethanol zu steuern. Zusätzlich kann anhand der Werte für p_b gezeigt werden, dass die untersuchten Vesikel stabil bleiben. Im Gegensatz dazu variieren die Werte von D_b sehr stark. Dies kann zum einen bedeuten, dass sich der mittlere Radius der Vesikel im Lauf der Versuchsreihe stark verändert. Zum anderen stellen Wassermoleküle eine sehr kleine Sonde dar, mit deren Hilfe es, beruhend auf der Diskussion in Kapitel 5.4.1, nicht möglich ist, eine Vesikelgrößenbestimmung durchzuführen. Aus diesem Grund wird die Schwankung der D_b -Werte nicht weiter betrachtet.

Werden Vesikel aus PLA-PEO untersucht, so nimmt auch hier die mittlere Verweildauer von Wasser in Abhängigkeit von der zugegebenen Ethanolkonzentration ab. Allerdings ist dieser Prozess nicht reversibel wie im Fall der Vesikel aus PI-PEO. Des Weiteren zeigen die Werte für D_b und p_b , dass die Vesikel unter den gegebenen Bedingungen nicht stabil sind. So verringert sich p_b z. B. von 0,7 % auf 0,2 %.

Somit kann zusammenfassend gezeigt werden, dass Ethanol keinen Effekt auf Vesikel aus P2VP-PEO hat. Die Vesikel werden aufgrund der guten Löslichkeit in Ethanol ab einer Volumenkonzentration von 13 Vol% vollständig zerstört, bilden sich aber bei Verringerung der Ethanolkonzentration neu. Es liegt in diesem Fall folglich ein schaltbares System vor, mit dessen Hilfe es möglich ist, Wirkstoffe durch Zugabe von Alkohol schlagartig freizusetzen. Allerdings weisen Vesikel aus P2VP-PEO, wie bereits in den vorangehenden Kapiteln deutlich beschrieben, eine sehr hohe Permeabilität auf. Aufgrund dieser Ergebnisse und der im Kapitel 5.7 folgenden Diskussion sollte jedoch Weiterentwicklungen mit dem Polymer P2VP-PEO durchgeführt werden. Vesikel aus PLA-PEO sind im Gegensatz zu Vesikeln aus PI-PEO sehr empfindlich gegenüber Ethanol. In diesem Fall nimmt die mittlere Verweildauer mit steigender Ethanolkonzentration ab, wobei es sich allerdings nicht um einen reversiblen Prozess handelt. Zusätzlich wird die Anzahl der Vesikel sehr stark dezimiert. Das interessanteste System im Hinblick auf die Steuerung der Permeabilität mit Hilfe von Ethanol bilden Vesikel aus PI-PEO. Hier kann die Permeabilität der Membran durch entsprechende Variation des Alkoholgehalts reversibel gesteuert werden.

Ein gegenläufiger Effekt sollte mit Hilfe hydrophober Lösungsmittel wie z. B. Chloroform erzielt werden. Hier könnte davon ausgehen werden, dass sich die Chloroformmoleküle in den hydrophoben Bereich der Vesikelmembran einlagern, wodurch die Durchlässigkeit derselben weiter verringert wird. Bei Vesikeln aus PLA-PEO und PI-PEO kann dieser Effekt mit Hilfe des Austausches von Wasser nachgewiesen werden. Hier wird die mittlere Verweildauer von Wasser von 125 ms für PI-PEO-Vesikel und 240 ms für PLA-PEO-Vesikel auf mehrere Sekunden erhöht. Daher ist es auch nicht möglich genaue Verweilzeiten zu bestimmen. Für diese Bestimmung müsste die zeitaufgelöste Messmethode (siehe Kapitel 3.4) verwendet werden. Dies ist allerdings nicht möglich, da es sich bei den Vesikeldispersionen um wässrige Systeme handelt. Somit befindet sich das Wasser bereits im Gleichgewichtszustand innerhalb und außerhalb der Vesikel und es kann kein Signalanstieg in Abhängigkeit der Zeit detektiert werden. Zur genaueren Untersuchung dieses Verhaltens müssten folglich zusätzliche Sondenmoleküle verwendet werden.

Ein erneutes Erhöhen der Permeabilität der Vesikelmembran durch Verdampfen des Chloroforms ist nicht möglich, da die erhaltenen Zerfallskurven des NMR-Experiments nicht

mehr auswertbar sind. Daher ist davon auszugehen, dass die Membran der Vesikel aufgrund des sehr hohen Dampfdrucks des Chloroforms in Teile zerfällt, und sich anschließend nur sehr schwer wieder zu vollständigen Vesikeln zusammenlagert. Eine bessere Alternative zur Steuerung der Permeabilität der Membran stellt daher die Synthese von Blockcopolymeren mit längerer hydrophober Kette dar. Allerdings müssen in diesem Fall die im Kapitel 5.4.2 und 5.4.3 beschriebenen Aspekte berücksichtigt werden.

Vesikel aus P2VP-PEO zeigen im Vergleich zu Vesikeln aus PI-PEO und PLA-PEO einen anderen Trend. Hier nimmt zum einen die mittlere Verweildauer der Sonde durch die Zugabe von Chloroform ab, zum anderen entstehen sehr große Vesikel. Anhand der Zerfallskurven in Abbildung 4.17 kann gesagt werden, dass die entstandenen Vesikel eine Größe von $1,5\ \mu\text{m}$ aufweisen müssen. Diese Zerfallskurven können mit der beschriebenen Zerfallsfunktion in Kapitel 2.3.2 nicht mehr angepasst werden. Es muss auf eine numerische Simulation auf Basis der „finiter Elemente“, wie in der Literatur beschrieben^[85, 99], zurückgegriffen werden.

5.7 Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten

5.7.1 Einfluss der Temperatur

Im Vergleich der verschiedenen Blockcopolymer-vesikel miteinander zeigen sich in Bezug auf die Temperaturabhängigkeit der mittleren Verweildauer zwei unterschiedliche Ergebnisse. Im Fall der Vesikel aus P2VP-PEO kann, wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, keine eingekapselte Wasserfraktion beobachtet werden. Daher wird in diesem Fall auf PEO 200 als Sonde zurückgegriffen. Hier kann keine Abhängigkeit der mittleren Verweildauer von PEO 200 von der Versuchstemperatur bestimmt werden. Aus diesem Grund kann auch im Gegensatz zu den weiteren Vesikeln keine Aktivierungsenergie für den Membrandurchtritt bestimmt werden.

Dies bedeutet, dass die Membran der P2VP-PEO Vesikel, wie bereits erwartet, sehr durchlässig ist, und somit auch nur eine sehr geringe Aktivierungsenergie für den Durchtritt durch die Membran benötigt wird. Des Weiteren ist es denkbar, dass sich im vorliegenden Fall zwei unterschiedliche Mechanismen überlagern. Dann würde sich die Permeabilität durch die Temperaturerhöhung ebenfalls erhöhen. Dies ist sehr wahrscheinlich, da die molekulare Beweglichkeit mit der Temperatur zunimmt. Gleichzeitig müsste allerdings die Beweglichkeit der PEO Sonde verringert werden, um die Permeabilitätserhöhung zu kompensieren. Somit ist dieser Aspekt nicht haltbar, da sich auch die Diffusionsgeschwindigkeit des PEOs mit steigender Temperatur erhöht.

Eine weitere Vermutung legt eine Phasenumwandlung des Blockcopolymeren im untersuchten Temperaturbereich zugrunde. Dadurch würde sich die Durchlässigkeit der Membran verringern. Zeitgleich würde eine Erhöhung der molekularen Beweglichkeit der Sonde diese wieder ausgleichen. Allerdings kann eine solche Phasenumwandlung mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Analysemethoden nicht bestimmt werden.

Für Vesikel aus den anderen Blockcopolymeren kann mit Hilfe des Austausches von Wasser eine Aktivierungsenergie für den Membrandurchtritt bestimmt werden. Im Fall des PI-PEO zeigt sich eindeutig eine reversible Abhängigkeit der mittleren Verweildauer in den Vesikeln von der Temperatur. So verringert sich diese linear von 130 ms auf 80 ms und steigt beim Abkühlen wieder auf 140 ms an. Dies zeigt, dass sich die Beweglichkeit der Polymere in der Membran mit steigender Temperatur erhöht (siehe Abbildung 4.31). Dadurch wird die Struktur des Bilayers gelockert und die Permeabilität der Membran erhöht sich. Dabei bleibt das relative eingekapselte Volumen konstant. Nur die Vesikelgröße, bestimmbar über den Diffusionskoeffizient D_b , ändert sich im Verlauf des Experiments sehr stark. Allerdings wird dieser ebenfalls durch den Austausch von Wasser bestimmt.

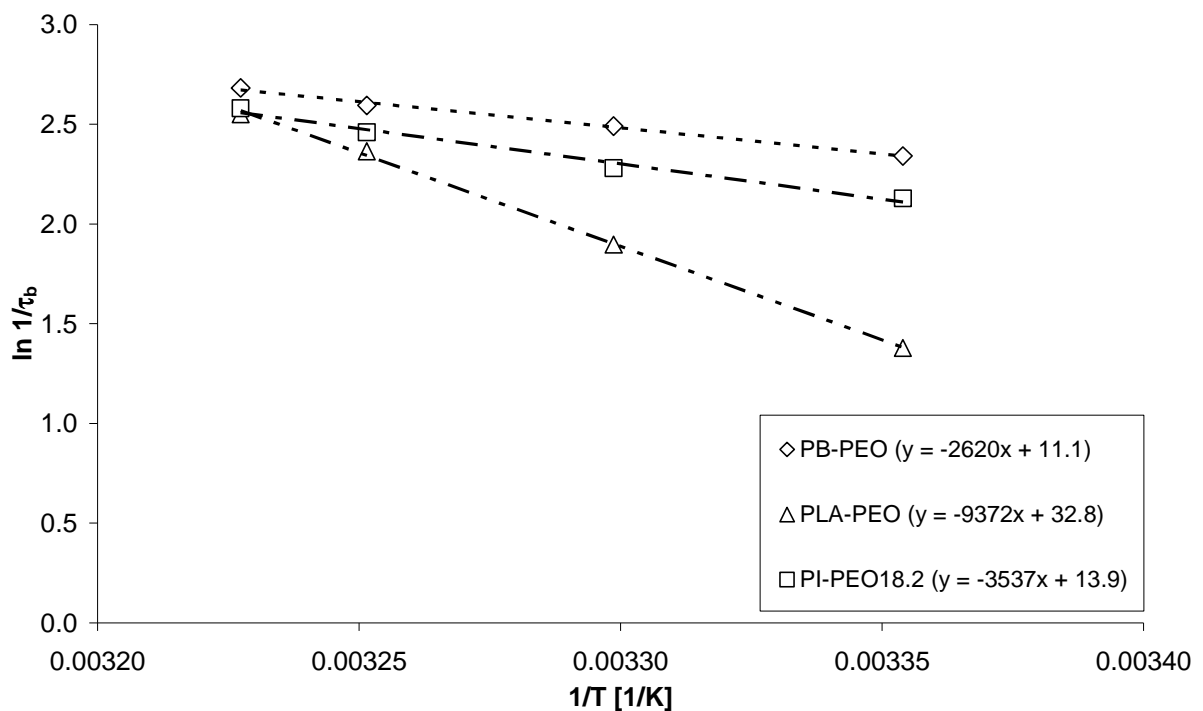


Abbildung 5.4: Arrhenius-plot des Wasseraustausches durch Membranen aus PB-PEO, PLA-PEO, und PI-PEO.

Wie bereits in Kapitel 5.4.1 beschrieben, sind kleine Sonden nicht dazu geeignet, die Größe der Vesikel zu bestimmen. Somit kann die Schwankung von D_b auf diese sehr kleine und somit ungeeignete Sonde zurückgeführt werden. Durch eine Auftragung von $[\ln(1/\tau_b)]$ gegen $[1/T]$, wie sie auch in Abbildung 5.4 gezeigt wird, wird eine Aktivierungsenergie von 28 kJ/mol bestimmt.

Dies belegt auch noch einmal eindeutig, dass die Membran der PI-PEO Vesikel eine wesentlich geringere Permeabilität aufweist als die der Vesikel aus P2VP-PEO.

Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur und dem vergleichbaren Monomerverhältnis sollte auch die Membran der Vesikel aus PB-PEO eine vergleichbare Aktivierungsenergie aufweisen. Dies kann bestätigt werden. Es ergibt sich ein Wert von 22 kJ/mol. In beiden Fällen (PI-PEO und PB-PEO) besteht der hydrophobe Teil der Membran aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen, welche nur schwache Wechselwirkungen zu Wasser ausbilden. Somit wird der Hauptteil der Aktivierungsenergie verbraucht, um Wassermoleküle aus der wässrigen Phase zu lösen und in die Membran einzulagern. Würde man dies in einem hypothetischen Vakuum durchführen, dann entspricht die Aktivierungsenergie mit 44 kJ/mol der Verdampfungsenthalpie von Wasser. Die verbleibenden Unterschiede von 22 kJ/mol für PB-PEO und 16 kJ/mol für PI-PEO entsprechen folglich den schwachen Wechselwirkungen zwischen Wasser und dem aliphatischen Teil der Membran.

Im Gegensatz dazu ist die Hydrophobie von PLA wesentlich geringer als die von PI bzw. PB. Somit wird für Vesikel aus PLA-PEO eine geringere Aktivierungsenergie erwartet. Allerdings wird ein Wert von 75 kJ/mol bestimmt. Dies liegt vor allem an dem sehr langen PLA-Block des Polymers. Dies weist, wie bereits mehrfach erwähnt, eine Blocklängenverhältnis von 100 : 50 auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Fall ein fast kristalliner Zustand der Membran vorliegt. Aufgrund des Platzbedarfs der langen Polymerketten kommt es zu einer Verschlingung der einzelnen Monomerstränge untereinander, so dass die Membran keinen amorphen Zustand mehr ausweist. Somit steigt ebenfalls der Wert der benötigten Aktivierungsenergie für den Membrandurchtritt.

5.7.2 Einfluss des pH-Werts

Weder für Vesikel aus PI-PEO noch für Vesikel aus PLA-PEO kann im relevanten Bereich von pH 4 bis pH 9 eine Abhängigkeit der mittleren Verweildauer vom pH-Wert detektiert werden. Dies ist zu erwarten, da weder Polylaktid noch Polyisopren durch Zugabe einer Säure eine Reaktion eingehen bzw. protoniert werden. Mikroskopisch werden Vesikeldispersionen mit einem pH-Wert bis zu 2 untersucht, und auch in diesen sind weiterhin Vesikel zu beobachten (siehe Abbildung 4.31). Auch beweisen die Werte D_b und p_b , dass sowohl Vesikel aus PI-PEO als auch aus PLA-PEO bis zu einem pH-Wert von 4 stabil bleiben. Es kann keine signifikante Veränderung dieser Werte gemessen werden.

Im Gegensatz dazu ändert sich die Stabilität von Vesikeln aus P2VP-PEO in Abhängigkeit des pH-Wertes schlagartig. Hier kann im Bereich von pH 5 bis pH 9 keine Änderung der

mittleren Verweildauer von PEO 200 in den Vesikeln detektiert werden. Wird der pH-Wert allerdings weiter gesenkt, so löst sich die Vesikelstruktur aufgrund der Protonierung des P2VP-Blockes auf. Durch diese Reaktion erhält der Stickstoff der Pyridineinheit des P2VP-Blockes eine positive Ladung und wird hydrophiler, mit der Konsequenz, dass sich die Vesikel auflösen.

Dieser Effekt ist sehr interessant, da es möglich ist durch Erhöhung des pH-Wertes eine Neubildung der Vesikel zu erzielen. Durch Erhöhung des pH-Wertes wird der P2VP-Block wieder deprotoniert, folglich wieder hydrophober und es entstehen neue Vesikel. Die Ergebnisse zeigen gleichzeitig, dass die mittlere Verweildauer von PEO 200 in den Vesikeln nach der Rekonstruktion gleich der mittleren Verweildauer vor der Säurezugabe ist. Daher ändert sich die Permeabilität nicht und es ist ein schaltbares System gefunden, mit dessen Hilfe es möglich ist eine schlagartige Freisetzung von Wirkstoffen zu erzielen.

6 Zusammenfassung

Der Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit ist es, Vesikel aus Blockcopolymeren auf ihre Eignung als Wirkstoffträgersysteme zu untersuchen. Dazu werden Vesikel aus vier verschiedenen Blockcopolymeren dargestellt und charakterisiert.

Darstellung der Vesikeldispersionen

Zur Darstellung werden hauptsächlich die neu entwickelte „Tintenstrahldrucker“-Methode aus dem Arbeitskreis Förster an der Universität Hamburg und die Chloroform-Methode verwendet. Die „Tintenstrahldrucker“-Methode ist allerdings nur für die Blockcopolymere P2VP-PEO und PI-PEO anwendbar. Bei dem Polymer PLA-PEO gelingt die Herstellung der Vesikel allein mit Hilfe der Chloroform-Methode herzustellen. Auf eine Aufarbeitung mittels Extrusion sollte bei allen Vesikeln verzichtet werden, da sie eine Zerstörung der Membranstruktur zur Folge hat.

Methoden zur Beobachtung molekularer Austauschvorgänge

Die Untersuchung des Austauschverhaltens der beschriebenen Vesikeln wird mit dem so genannten gepulsten Feldgradienten-NMR durchgeführt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, aufgrund des unterschiedlichen Diffusionsverhaltens die mobilen, freien Moleküle von eingekapselten Molekülen zu unterscheiden. Im Verlauf dieser Arbeit wird dafür zunächst die literaturbekannte Messmethode auf die gegebene Problemstellung zugeschnitten. Mit dieser Methode ist es möglich, einen sehr schnellen molekularen Austausch durch die Vesikelmembran zu detektieren. Für längere Verweilzeiten im Zeitrahmen von Minuten bis Stunden wird eine zweite Messmethode entwickelt und optimiert. Somit ist es unter Verwendung beider Methoden möglich, Verweildauern in Kapselsystemen in einem Zeitfenster von ca. 10 ms bis zu mehreren Monaten zu bestimmen.

Einfluss der Vesikeleigenschaften auf das Austauschverhalten

Die durchgeführten Untersuchungen an den Vesikelsysteme zeigen, dass es mit Hilfe des verwendeten Blockcopolymeren bzw. der Bilayerdicke der Membran möglich ist die mittlere Verweildauer und somit die Permeabilität der Membran zu steuern. Für lange Verweilzeiten eignet sich das Blockcopolymer PI-PEO am ehesten. Es ist, im Gegensatz zum PLA-PEO, welches sich schon nach einigen Tagen zersetzt, sehr gut lagerbar. Im Vergleich zur Durchlässigkeit dieser beiden Vesikelarten ist die Permeabilität der Vesikelmembran aus P2VP-PEO sehr hoch. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse eine lineare Abhängigkeit der Verweildauer von der Bilayerdicke, so dass es möglich ist, die Permeabilität über die Wandstärke der Vesikel und somit über ihre Molmasse und ihr Blocklängenverhältnis zu steuern. Als dritter Punkt kann ebenfalls gezeigt werden, dass im Fall sehr kleiner Vesikel

und großer Sondenmoleküle eine Abhängigkeit der Verweildauer vom Radius der Vesikel vorliegt. Für große Vesikel und kleine Sonden kann dieser Effekt nicht gefunden werden.

Einfluss der Eigenschaften der verwendeten chemischen Sonde auf das Austauschverhalten

Für alle Vesikelarten kann eine Abhängigkeit der Verweildauer von der Größe der verwendeten Sonde beobachtet werden. Dabei scheint der Membrandurchtritt der Sondenmoleküle aus zwei sich überlagernden Mechanismen zu bestehen. Für kleine Sonden ($R_H < 5$ nm) ist die Aktivierungsenergie für den Membrandurchtritt proportional zum hydrodynamischen Radius der Sonden. Diese können die Membran durchdringen, indem sich eine entsprechende Öffnung in der Membran ausbildet. Für größere Sonden ($R_H > 5$ nm) tritt dieser Mechanismus in den Hintergrund, ist allerdings noch minimal vorhanden. In diesem Fall müssen sich die Sondenmoleküle erst einmal entknäueln, um als gestreckte Moleküle in die Membran einzufädeln und sie zu durchdringen. In diesem Fall ist die Aktivierungsenergie für den Membrandurchtritt von der Molmasse unabhängig.

Einfluss von Additiven auf das Austauschverhalten

Im Hinblick auf den Einfluss von Additiven auf die Permeabilität der Vesikelmembranen zeigen die verwendeten Blockcopolymere ein unterschiedliches Verhalten. Im Fall von Vesikeln aus P2VP-PEO hat Ethanol bis zu einer Volumenkonzentration von 12 Vol% keinen Einfluss auf die Permeabilität. Bei höheren Konzentrationen lösen sich die Vesikel aufgrund der sehr guten Löslichkeit in Ethanol vollständig auf. Im Gegensatz dazu ist es durch die Zugabe von Ethanol möglich, die Permeabilität von Vesikel aus PI-PEO in einem kleinen Fenster reversibel zu steuern. Auch die Durchlässigkeit der Vesikel aus PLA-PEO lässt sich durch Zugabe von Ethanol erhöhen, es liegt allerdings kein reversibler Mechanismus vor. So ist es nicht möglich, die Permeabilität durch Senkung der Ethanolkonzentration erneut zu verringern. Im Gegensatz dazu verringert die Zugabe von Chloroform zu den Vesikeldispersionen aus PI-PEO und PLA-PEO die Permeabilität der Vesikelmembranen. Vesikel aus P2VP-PEO reagieren dagegen auf die Zugabe des Chloroforms mit einer Permeationserhöhung.

Einfluss der physikalisch-chemischen Randbedingungen auf das Austauschverhalten

Weitere Untersuchungen wurden im Hinblick auf den Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes durchgeführt. Im Fall der Vesikel aus P2VP-PEO konnte kein Einfluss der Temperatur gefunden werden. Dagegen kann für alle weiteren Vesikelarten eine Abhängigkeit des Austauschverhaltens von der Temperatur bestimmt werden, welche in beiden Richtungen einer Arrhenius-Funktion folgt. Daher ist es auch möglich, aus den gegebenen Werten durch die Auftragung eines Arrhenius-Plots die Aktivierungsenergie, welche für den Membrandurchtritt benötigt wird, zu bestimmen. Diese beschriebene Methode

stellt vermutlich den bisher einzigen experimentellen Ansatz dar, um zu diesen Werten zu gelangen. Die Änderung des pH-Wertes hat nur einen Einfluss auf Vesikel aus P2VP-PEO. Diese können mit Hilfe einer pH-Wert-Änderung systematisch zerstört und neu gebildet werden, während alle weiteren Vesikelarten pH-resistent sind.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Vesikel aus Blockcopolymeren noch nicht die eingeschränkte Permeabilität aufweisen, die nötig wäre, um sie als Wirkstoffträgersysteme im menschlichen Körper anwenden zu können. Bei den meisten untersuchten Systemen werden Verweildauern im Sekunden bis Minutenmaßstab detektiert. Wenn man die untersuchten Blockcopolymere untereinander vergleicht, dann weist das P2VP-PEO zwar die größte Permeabilität auf, allerdings sind alle weiteren Eigenschaften optimal für Wirkstoffträgersysteme. Vesikel aus diesem Blockcopolymer sind mit Hilfe der „Tintenstrahldrucker“-Methode sehr schnell und kostengünstig darstellbar. Die entstandenen Vesikel haben eine sehr geringe Größe und sind sehr homogen und unilamellar. Des Weiteren zeigen diese Vesikel als einzige eine Reaktion auf eine pH-Wert-Änderung. Es wäre mit ihrer Hilfe möglich, eine schlagartige Freisetzung von Wirkstoffen in den Zellen des menschlichen Körpers zu erzielen. Allerdings müsste dafür mit Hilfe des Blocklängenverhältnisses des hydrophilen und des hydrophoben Teils der Membran die Permeabilität der Vesikel noch deutlich erniedrigt werden. Wenn die Vesikel benutzt werden sollen um einen Depot-Effekt zu erzielen, dann sind Vesikel aus PI-PEO besser geeignet als Vesikel aus den anderen Blockcopolymeren. Sie zeigen eine zeitgleiche Haltbarkeit wie Vesikel aus P2VP-PEO, sind aber im Vergleich wesentlich undurchlässiger, weisen also eine viel geringere Permeabilität auf. Auch hier würde eine Optimierung des Vesikelsystems anhand der Bilayerdicke anstehen, um die Permeabilität der Membran weiter zu erniedrigen

7 Literatur

- [1] J. R. H. Müller, G. E. Hildebrand, *Pharmazeutische Technologie Vol. 2*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, Stuttgart, **1998**.
- [2] R. Schubert, in *Pharmazeutische Technologie* (Eds.: J. R. H. Müller, G. E. Hildebrand), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1998**, pp. 219.
- [3] I. F. Uchegbu, *Pharm. J.* **1999**, 263, 309.
- [4] S. Förster, M. Antonietti, *Adv. Mater.* **1998**, 10, 195.
- [5] N. Hadjichristidis, S. Pispas, G. Floudas, *Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications*, Wiley, Europe, **2002**.
- [6] M. Szwarc, *Nature* **1956**, 178, 1168.
- [7] M. Szwarc, M. Levy, R. Milkovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 2656.
- [8] U. Lipprandt, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2004**.
- [9] S. Förster, *Habilitationsschrift*, MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Teltow, **1999**.
- [10] T. Plantenberg, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2001**.
- [11] J. Selb, Y. Gallot, *Developments in block copolymers*, Elsevier, Amsterdam, **1985**.
- [12] T. J. Martin, K. Prochazka, P. Munk, S. E. Webber, *Macromolecules* **1996**, 29, 6071.
- [13] S. Förster, B. Berton, H.-P. Hentze, E. Krämer, M. Antonietti, P. Lindner, *Macromolecules* **2001**, 34, 4610.
- [14] H.-P. Hentze, E. Krämer, B. Berton, S. Förster, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, 32, 5803.
- [15] S. Förster, E. Krämer, *Macromolecules* **1999**, 32, 2783.
- [16] B. Eßwein, M. Möller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 623.
- [17] F. Ahmed, D. E. Discher, *J. Cont. Rel.* **2004**, 96, 37.
- [18] K. Yasugi, Y. Nagasaki, M. Kato, K. Kataoka, *J. Cont. Rel.* **1999**, 62, 89.
- [19] S. T. Balke, in *Modern Methods of polymer characterization* (Eds.: H. G. Barth, J. W. Mays), Wiley Interscience, **1991**.
- [20] G. R. Meira, in *Modern Methods of polymer characterization* (Eds.: H. G. Barth, J. W. Mays), Wiley Interscience, **1991**.
- [21] H. Pasch, B. Trathning, *HPLC of Polymers*, Springer, Heidelberg, **1997**.
- [22] <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html>, eingesehen: **01.02.2007**.
- [23] S. Förster, T. Plantenberg, *Angew. Chem.* **2002**, 712.
- [24] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, London, **1991**.
- [25] M. Antonietti, S. Förster, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 1323.
- [26] R. Köhn, *Dissertation*, Universität Hamburg **2002**.
- [27] A. Timmann, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg **2002**.

- [28] J. P. Reeves, R. M. Dowben, *J. Cell Physiol.* **1969**, 73, 49.
- [29] A. D. Bangham, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, 64, 275.
- [30] A. Napoli, M. J. Boerakker, N. Tirelli, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, J. A. Hubbell, *Langmuir* **2004**, 20, 3487.
- [31] A. T. Nikova, V. D. Gordon, G. Cristobal, M. R. Talingting, D. C. Bell, C. Evans, *Macromolecules* **2004**, 37.
- [32] P. J. Photos, L. Bacakova, B. Discher, F. S. Bates, D. E. Discher, *J. of Controlled Release* **2003**, 90, 323.
- [33] A. A. Reinecke, H.-G. Döbereiner, *Langmuir* **2003**, 19, 605.
- [34] R. Dimova, U. Seifert, B. Pouligny, S. Förster, H.-G. Döbereiner, *Eur Phys J E* **2002**, 7, 241.
- [35] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, 81, 303.
- [36] J. C.-M. Lee, H. Bermudez, B. Discher, M. A. Sheehan, Y. Won, F. S. Bates, D. E. Discher, *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, 73, 135.
- [37] F. Ahmed, D. E. Discher, *J. of Controlled Release* **2004**, 96, 37.
- [38] H. Kukula, H. Schlaad, M. Antionetti, S. Förster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1658.
- [39] B. M. Discher, Y. Won, D. S. Ege, J. C.-M. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, *Science* **1999**, 284, 1143.
- [40] D. S. Dimitrov, M. I. Angelova, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1987**, 73, 48.
- [41] M. Sauer, T. Haefele, A. Graff, C. Nardin, W. Meier, *Chem. Commun.* **2001**, 23, 2452.
- [42] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1987**, 152, 89.
- [43] J. M. H. Kremer, M. W. v. d. Esker, C. Pathmamanoharan, P. H. Wiersema, *Biochemistry* **1977**, 16, 3932.
- [44] C. Nardin, T. Hirt, J. Leukel, W. Meier, *Langmuir* **2000**, 16, 1035.
- [45] S. Hauschild, U. Lipprandt, A. Rumpelcker, U. Borchert, A. Rank, R. Schubert, S. Förster, *Small* **2005**, 1, 1177.
- [46] S. Hauschild, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **2004**.
- [47] F. Szoka, D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 4194.
- [48] A. Rumpelcker, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **2003**.
- [49] J. S. Higgins, H. C. Benoit, *Polymers and Neutron Scattering*, Clarendon Press, Oxford, **1994**.
- [50] W. Brown, T. Nicolai, *Dynamic light scattering*, Oxford University Press, New York, **1993**.
- [51] B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, Wiley, New York, **1976**.
- [52] A. J. Khintchine, *Acta Math.* **1934**, 109, 604.
- [53] N. Wiener, *Acta Math.* **1930**, 55, 118.
- [54] R. Brown, *Phil. Mag.* **1828**, 4, 161.

- [55] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1905**, 17, 349.
- [56] C. Finder, M. Wohlgemuth, C. Mayer, *Part. Part. Syst. Charact.* **2004**, 20, 1.
- [57] M. Wohlgemuth, *Dissertation*, Universität Duisburg, **2002**.
- [58] C. Finder, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2005**.
- [59] M. Drießen, *Bachelorarbeit*, Universität Duisburg-Essen, **2006**.
- [60] V. Wagner, D. Wechsler, *Zukünftige Technologien Nr. 50*, VDI Technologiezentrum GmbH, Düsseldorf, **2004**.
- [61] G. Barratt, *Cell. Mol. Life. Sci.* **2003**, 60, 21.
- [62] D. Hoffman, *Dissertation*, Universität Duisburg, **2001**.
- [63] R. Haag, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 280.
- [64] U. Massing, *Vortrag NanoMed* **2003**.
- [65] N. V. Majeti, M. N. V. R. Kumar, *Journal of pharmacy & Pharmaceutical sciences* **2000**, 3(2), 234.
- [66] M. Sameti, G. Bohr, M. N. V. R. Kumar, C. Kneuer, U. Bakowsky, M. Nacken, H. Schmidt, C.-M. Lehr, *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 266(1-2), 51.
- [67] J. Kreuter, in *Colloid drug delivery systems*, Dekker, New York, **1994**.
- [68] G. Birrenbach, P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1976**, 65, 1763.
- [69] J. Kreuter, P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1976**, 65, 1624.
- [70] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, P. Speiser, *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, 31, 331.
- [71] P. Couvreur, M. Roland, P. Speiser, in *US. Patent, Vol. 4, USA*, **1982**, p. 329.
- [72] E. Allemann, R. Gurny, E. Doelker, *J. Pharm. Biopharm.* **1993**, 39, 173.
- [73] N. A. Khouri-Fallouh, L. Roblot-Treupel, H. Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, *Int. J. Pharm.* **1986**, 28, 125.
- [74] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim, **1988**.
- [75] E. Breimaier, W. voelter, *Carbon-13-NMR-Spectroscopy*, VCH, Weinheim, **1987**.
- [76] G. Großmann, *Struktur und Bindung - Atome und Moleküle*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, **1989**.
- [77] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, New York, Stuttgart, **1992**.
- [78] T. C. Farrar, E. D. Becker, *Pulse and Fourier Transform NMR*, Academic Press, **1971**.
- [79] R. A. Komorowski, *High Resolution NMR-Spectroscopy of Synthetic Polymers in Bulk*, VCH Weinheim, **1986**.
- [80] S. W. Homans, *A Dictionary of concepts in NMR*, Clarendon Press, Oxford, **1992**.
- [81] G. M. Barrow, *Physikalische Chemie*, Bohmann-Verlag, Heidelberg, **1977**.
- [82] M. Vogt, *Dissertation*, Universität Duisburg, **2001**.

- [83] W. S. Price, *Concepts Magn. Res.* **1997**, 9, 299.
- [84] I. Broeckmann, *Dissertation*, Universität Duisburg, **2002**.
- [85] A. Rumpelcker, S. Förster, M. Zähres, C. Mayer, *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 8740.
- [86] A. Neub, *Dissertation*, Universität Freiburg, **2007**.
- [87] J. Kärgler, H. Pfeiffer, W. Heink, *Adv. Magn. Res.* **1988**, 12, 1.
- [88] M. Wohlgemuth, C. Mayer, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 260, 324.
- [89] M. Stolzenburg, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **2004**.
- [90] M. Stolzenburg, *persönliche Mitteilung*.
- [91] C. Bormann, *Bachelorarbeit*, Universität Duisburg-Essen, **2005**.
- [92] C. Kopschütz, *Diplomarbeit*, Universität Duisburg-Essen, **2006**.
- [93] R. Schubert, *Method Enzymol* **2003**, 367, 46.
- [94] F. Li, S. Li, M. Vert, *Macromol. Biosci.* **2005**, 5, 1125.
- [95] T. Riley, S. Stonik, S. R. Heald, *Langmuir* **2001**, 17, 3168.
- [96] K. Kita-Tokarczyk, J. Grumelard, T. Haefele, W. Meier, *Polymer* **2005**, 46, 3540.
- [97] G. J. Bresselleers, H. L. Goderis, P. P. Tobbacq, *Biochem. Biophys. Acta* **1984**, 772, 374.
- [98] A. Kimpfler, *Dissertation*, Universität Freiburg, **2003**.
- [99] C. Mayer, A. Bauer, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **2006**, 133, 22.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Liposoms ^[2]	1
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Austausches von Molekülen durch eine Polymersomen-Membran	2
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Verknüpfungen von verschiedenen Monomerblöcken in Copolymeren	4
Abbildung 2.2: Chemische Strukturen von Poly(2-vinylpyridin) und Polyethylenoxid	6
Abbildung 2.3: Mögliche Polymerstrukturen von Butadien	6
Abbildung 2.4: Mögliche Polymerstrukturen von Isopren.....	7
Abbildung 2.5: Molmassenverteilung eines P2VP-Monomers und eines P2VP-PEO Blockcopolymers ermittelt mittels GPC ^[8]	8
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Vorgänge in einem MALDI-TOF-Spektrometers ^[22]	9
Abbildung 2.7: MALDI-TOF-Spektrum eines P2VP-Monomers und eines P2VP-PEO Blockcopolymers ^[8]	10
Abbildung 2.8: ¹ H-NMR-Spektrum eines P2VP-PEO Blockcopolymers in CDCl ₃ bei 500 MHz	10
Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Überstrukturen von amphiphilen Molekülen ^[23]	11
Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Vesikelbildung ^[25]	12
Abbildung 2.11: Mögliche Morphologien der Vesikel.....	12
Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der „Tintenstrahldrucker“-Methode ^[45]	14
Abbildung 2.13: Zweidimensionales Schema der Brownschen Molekularbewegung eines Teilchens in Wasser.....	15
Abbildung 2.14: Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer Vesikeldispersion aus P2VP-PEO nach erfolgter Bildbearbeitung (38,1 µm Seitenlänge im Original).....	16
Abbildung 2.15: Phasenkontrastaufnahme einer Vesikeldispersion aus P2VP-PEO ^[59]	17
Abbildung 2.16: Fluoresceinmarkierte Vesikel aus P2VP-PEO ^[8]	18
Abbildung 2.17: Cryo-TEM Aufnahme von Vesikeln aus P2VP-PEO	18
Abbildung 2.18: Größe einiger „drug-delivery“-Systeme mit charakteristischen, durchschnittlichen Durchmessern im Vergleich zu einem roten Blutkörperchen und eines Bakteriums. Dabei ist zu beachten, dass rote Blutkörperchen gerade durch die kleinsten Blutgefäße im Körper wandern können ^[62]	21
Abbildung 2.19: Schematische Darstellung eines Liposoms	22

Abbildung 2.20: Anreicherung von Liposomen in einem Tumor aufgrund der erhöhten Permeabilität der Blutgefäße im Tumorgewebe ^[64]	23
Abbildung 2.21: Wirkstoff-Freisetzungsprofil nach Kreuter im Vergleich zwischen Nanosphären und Nanokapseln bei einem diffusionsgesteuerten Prozess.....	25
Abbildung 2.22: Schematische Darstellung der Präzessionsbewegung der Kerne im Magnetfeld B_0 ^[75]	27
Abbildung 2.23: Richtungsquantelung des Drehimpulses für $l = 1/2$	27
Abbildung 2.24: Richtung der makroskopischen Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem a) nach einem beliebigen Puls, b) nach einem 90° Puls, c) nach einem 180° Puls.....	28
Abbildung 2.25: Schematische Darstellung eines FIDs und dessen fouriertransformierten Frequenzspektrums	29
Abbildung 2.26: Die einfachste PFG-Pulsfolge (Hahn-Spin-Echo) und ihre Wirkung auf ein Vier-Spin Ensemble ^[83]	31
Abbildung 2.27: Die einfachste PFG-Pulsfolge (Hahn-Spin-Echo) und ihre Wirkung auf ein Vier-Spin Ensemble ^[83]	32
Abbildung 2.28: PFGSTE-Pulsfolge ^[84]	32
Abbildung 2.29: Signalzerfall von Wasser und Polyethylenoxid in Abhängigkeit von der Gradientenstärke ^[85]	33
Abbildung 2.30: Diagramm zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der freien Diffusion	34
Abbildung 2.31: Typische Bewegungsmuster von Molekülen in flüssiger Umgebung im Verlauf unterschiedlicher Zeitintervalle ^[86]	35
Abbildung 2.32: Abhängigkeit der Signalintensität von der Gradientenstärke für eine teilweise frei, teilweise eingekapselt vorliegende Komponente ^[86]	35
Abbildung 2.33: Stejskal-Tanner-Plot mit berechneten Zerfallskurven mit Δ von 100 bis 300 ms	37
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Apparatur für die anionische Polymerisation ^[8]	38
Abbildung 3.2: Fotografie der Glasapparatur für die anionische Polymerisation ^[89]	38
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der „Tintenstrahldrucker“-Methode ^[45]	40
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Herstellung von Liposomen mittels Detergens-entfernung ^[93]	43
Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau der Dialysekammer ^[86]	44
Abbildung 3.6: Stejskal-Tanner-Plot für den Austausch von Wasser durch Membranen aus PI-PEO Vesikeln	45

Abbildung 3.7: Ausgewertete Auftragung der Intensität des Sondensignals gegen die Zeit t.	47
Abbildung 4.1: Stabilität der Vesikel aus P2VP-PEO10 ^[91]	53
Abbildung 4.2: Cryo-TEM-Aufnahmen von Vesikeln aus PI-PEO vor (links) und nach Extrusion (rechts)	54
Abbildung 4.3: Abhängigkeit der Vesikelradien von der Polymerkonzentration bei der Chloroform-Methode	55
Abbildung 4.4: Abhängigkeit der Vesikelradien von der Polymerkonzentration bei der Wasser-Quell-Methode	55
Abbildung 4.5: Fäden der wässrigen Phase gelöst in CDCl ₃	57
Abbildung 4.6: Rückstand der wässrigen Phase gelöst in CDCl ₃	57
Abbildung 4.7: ¹ H-Spektrum einer Vesikeldispersion mit PEO 200 als Sonde und Ethanolverunreinigungen	58
Abbildung 4.8: ¹ H-NMR Spektrum einer Vesikeldispersion und mit PEO 200 als Sonde	59
Abbildung 4.9: Zerfallskurve des Wassers in Vesikeln aus P2VP-PEO	60
Abbildung 4.10: Abhängigkeit der mittleren Verweildauer von der Größe der verwendeten Vesikel für PEO 200	61
Abbildung 4.11: Abhängigkeit von $\tau_{1/2}$ von der Größe der verwendeten Vesikel für PEO 100000	61
Abbildung 4.12: Abhängigkeit von τ_b von der Bilayerdicke der Vesikel aus P2VP-PEO	63
Abbildung 4.13: Abhängigkeit von τ_b vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde (PEO) für Vesikel aus P2VP-PEO	64
Abbildung 4.14: Abhängigkeit von $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde (PVA) für Vesikel aus P2VP-PEO	64
Abbildung 4.15: Abhängigkeit von τ_b bzw. $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Wirkstoffmodelle	65
Abbildung 4.16: Abhängigkeit von τ_b von Ethanol in Vesikeln aus P2VP-PEO von der Ethanolkonzentration	66
Abbildung 4.17: Zerfallskurven des Ethanolaustausches vor (oben), nach der Chloroformzugabe (unten).	67
Abbildung 4.18: Zerfallskurven des Ethanolaustausches nach Abdampfen des Chloroforms.	68
Abbildung 4.19: Abhängigkeit von τ_b von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO10 von der Temperatur	69
Abbildung 4.20: Abhängigkeit von τ_b von PEO 200 vom pH-Wert für Vesikel aus P2VP-PEO	70

Abbildung 4.21: Zerfallskurven von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO bei pH 7 (oben) und bei pH 2 (unten)	71
Abbildung 4.22: Zerfallskurven von PEO 200 in Vesikeln aus P2VP-PEO nach Regeneration bei pH 7	72
Abbildung 4.23: Ausschnitt aus einem ^1H -NMR-Spektrum der Vesikeldispersion bei pH 2 ..	72
Abbildung 4.24: Zerfallskurven für den Wasseraustausch in PI-PEO Vesikeln.....	73
Abbildung 4.25: Abhängigkeit von τ_b bzw. von $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Wirkstoffmodelle	74
Abbildung 4.26: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO von der Ethanolkonzentration	75
Abbildung 4.27: Abhängigkeit von D_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO von der Ethanolkonzentration	75
Abbildung 4.28: Abhängigkeit von p_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO von der Ethanolkonzentration	76
Abbildung 4.29: Zerfallskurven des Wasseraustausches vor (oben) und nach (unten) der Chloroformzugabe.....	77
Abbildung 4.30: Zerfallskurven des Wassersignals nach der Chloroformzugabe (oben) und nach Abdampfen des Chloroforms (unten).....	78
Abbildung 4.31: Temperaturabhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO	79
Abbildung 4.32: Temperaturabhängigkeit von D_b (oben) und p_b (unten) von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO.....	80
Abbildung 4.33: Bestimmung der Aktivierungsenergie E_a für den Membrandurchtritt aus PI-PEO Vesikeln.....	81
Abbildung 4.34: Phasenkontrastaufnahme einer PI-PEO Vesikeldispersion bei pH ~ 2 ^[59]	81
Abbildung 4.35: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PI-PEO vom pH-Wert	82
Abbildung 4.36: Abhängigkeit von τ_b von Wasser vom Alter der PLA-PEO Vesikel.....	83
Abbildung 4.37: Abhängigkeit von $\tau_{1/2}$ vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Wirkstoffmodelle für Vesikel aus PLA-PEO	84
Abbildung 4.38: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO von der Ethanolkonzentration	85
Abbildung 4.39: Zerfallskurven des Wasseraustausches in Vesikeln aus PLA-PEO vor (oben) und nach (unten) Chloroformzugabe.....	86
Abbildung 4.40: Zerfallskurven des Wassersignals in Vesikeln aus PLA-PEO nach Abdampfen des Chloroforms.....	87
Abbildung 4.41: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO von der Temperatur.	88

Abbildung 4.42: Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A für den Membrandurchtritt von PLA-PEO Vesikeln.....	88
Abbildung 4.43: Abhängigkeit von τ_b von Wasser in Vesikeln aus PLA-PEO vom pH-Wert.	89
Abbildung 4.44: pH-Wertabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D_b in Vesikeln aus PLA-PEO	89
Abbildung 4.45: Abhängigkeit der Verweildauer τ_b von Wasser in Vesikeln aus PB-PEO von der Temperatur.	90
Abbildung 4.46: Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A für den Membrandurchtritt aus PB-PEO Vesikeln.....	91
Abbildung 5.1: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum a) von PEO 400 in einer Vesikeldispersion aus P2VP-PEO, b) einer reinen PEO 400 Lösung c) einer reinen Vesikeldispersion aus P2VP-PEO	96
Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Verhältnisses zwischen dem hydrophilen (hellgrau) und dem hydrophoben Teil (dunkelgrau) der Vesikelmembran. Die Zahlen geben die Anzahl der Monomereinheiten an.	103
Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Verweildauer vom hydrodynamischen Radius der Sonde, skizzierter Mechanismus des Membrandurchtritts.....	105
Abbildung 5.4: Arrhenius-plot des Wasseraustausches durch Membranen aus PB-PEO, PLA-PEO, und PI-PEO.	111

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Abhängigkeit der Struktur vom Packungsparameter ^[25-27]	12
Tabelle 2.2: Übersicht über aktuelle Wirkstoffträgersysteme ^[60]	20
Tabelle 3.1: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der „Tintenstrahldrucker“-Methode	41
Tabelle 3.2: Standardparameter der PFG-NMR-Messungen	44
Tabelle 3.3: Verwendete Polymere zur Bestimmung der Abhängigkeit von der Bilayerdicke	48
Tabelle 4.1: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit vom Radius der Vesikel	60
Tabelle 4.2: Werte für PEO 100000 in Abhängigkeit vom Radius der Vesikel	62
Tabelle 4.3: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit der Bilayerdicke der Vesikel	62
Tabelle 4.4: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Ethanol in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus P2VP-PEO	66
Tabelle 4.5: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus P2VP-PEO	69
Tabelle 4.6: Werte für die angepassten Zerfallskurven von PEO 200 in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus P2VP-PEO	70
Tabelle 4.7: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus PI-PEO	79
Tabelle 4.8: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit vom pH-Wert für Vesikel aus PI-PEO	82
Tabelle 4.9: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit vom Alter der Vesikel aus PLA-PEO	83
Tabelle 4.10: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus PLA-PEO	85
Tabelle 8.1: Eigenschaften der verschiedenen P2VP-PEO Polymere	128
Tabelle 8.2: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der Chloroform-Methode	128
Tabelle 8.3: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der Wasser-Quell-Methode	128
Tabelle 8.4: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der Film-Hydratationsmethode	128
Tabelle 8.5: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PLA-PEO mit der Chloroform-Methode	129
Tabelle 8.6: Konzentrationsabhängigkeit der Radien von PI-PEO Vesikeln bei der Chloroform-Methode	129

Tabelle 8.7: Konzentrationsabhängigkeit der Radien von PI-PEO Vesikeln bei der Quellung in Wasser	129
Tabelle 8.8: Radienverteilungen von Vesikeldispersionen aus PI-PEO dargestellt mit der „Tintenstrahldrucker“-Methode und THF bzw. Aceton als Lösungsmittel	129
Tabelle 8.9: Werte für die angepassten Zerfallskurven der chemischen Sonden in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde (PEO) für Vesikel aus P2VP-PEO	130
Tabelle 8.10: Werte der Verweildauer τ_b und der Austauschkonstante k_{ex} in Abhängigkeit der verwendeten Sonde (PVA) für Vesikel aus P2VP-PEO	131
Tabelle 8.11: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus PI-PEO	131
Tabelle 8.12: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Ethanol in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus PI-PEO	131
Tabelle 8.13: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus PLA-PEO	132
Tabelle 8.14: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit vom pH-Wert für Vesikel aus PLA-PEO	132
Tabelle 8.15: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus PB-PEO	132

Tabelle 8.1: Eigenschaften der verschiedenen P2VP-PEO Polymere

Polymer	Blocklängen		Mw/Mn		M [g/mol]
	P2VP	PEO	P2VP	P2VP-PEO	
P2VP-PEO6	29	15	1,19	1,09	3900
P2VP-PEO8	66	46	1,03	1,03	9200
P2VP-PEO10	54	34	1,09	1,1	7350

Tabelle 8.2: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der Chloroform-Methode

Polymermenge [mg]	Chloroform [ml]	Wasser [ml]	Polymerkonzentration [mg/ml]
5	5	5	1
19,5	8	8	2,4
19,9	4	4	5
20	4	4	5
20,5	5	10	2,1
21,1	4	4	5,3
22	8	8	2,8
22	4	4	5,5
22,5	4	4	5,6
51	5	5	10,2

Tabelle 8.3: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der Wasser-Quell-Methode

Polymermenge [mg]	Wasser [ml]	Polymerkonzentration [mg/ml]
5,5	5	1,1
12,5	5	2,5
20,2	10	2,0
20,3	10	2,0
21,8	5	4,4
23,2	5	4,6
49,9	5	10,0

Tabelle 8.4: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PI-PEO mit der Film-Hydratationsmethode

Polymermenge [mg]	Wasser [ml]	Polymerkonzentration [mg/ml]
20,9	10	2,1
21,5	8	2,7
23,1	8	2,9
23,9	8	3,0

Tabelle 8.5: Versuchsbedingungen zur Darstellung von Vesikeln aus PLA-PEO mit der Chloroform-Methode

Polymermenge [mg]	Chloroform [ml]	Wasser [ml]	Polymerkonzentration [mg/ml]
6,7	3	3	2,2
20,3	1	4	5,1
20,9	4	4	5,2
20,5	4	4	5,1
27,0	4	4	6,8

Tabelle 8.6: Konzentrationsabhängigkeit der Radien von PI-PEO Vesikeln bei der Chloroform-Methode

Konzentration Polymer [mg/mL]	mittlerer Radius [nm]
1,0	135 ± 0,5
2,0	174 ± 0,5
2,5	133 ± 0,4
2,8	171 ± 0,6
5,3	149 ± 0,4
5,5	148 ± 0,4
10,0	131 ± 0,5

Tabelle 8.7: Konzentrationsabhängigkeit der Radien von PI-PEO Vesikeln bei der Quellung in Wasser

Konzentration Polymer [mg/mL]	mittlerer Radius [nm]
1,0	163 ± 0,6
2,0	155 ± 0,6
2,5	173 ± 0,6
4,0	162 ± 0,4
10,0	128 ± 0,3

Tabelle 8.8: Radienverteilungen von Vesikeldispersionen aus PI-PEO dargestellt mit der „Tintenstrahldrucker“-Methode und THF bzw. Aceton als Lösungsmittel

Lösungsmittel	Druckmodus	mittlerer Radius [nm]
THF	Entwurf	147 ± 0,6
THF	Normal	185 ± 1,1
THF	Optimal	186 ± 0,5
Aceton	Entwurf	159 ± 1,7
Aceton	Normal	139 ± 1,2
Aceton	Optimal	124 ± 0,8

Tabelle 8.9: Werte für die angepassten Zerfallskurven der chemischen Sonden in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius der verwendeten Sonde (PEO) für Vesikel aus P2VP-PEO

PEO	M_w [g/mol]	R_H [nm]	D_a [10^{-10} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]
PEO 200	200	0,43 ± 0,01	5,7 ± 0,07	4,1 ± 0,2
PEO 300	300	0,55 ± 0,01	4,4 ± 0,06	1,7 ± 0,2
PEO 400	400	0,61 ± 0,01	4,0 ± 0,03	2,1 ± 0,1
PEO 600	600	0,75 ± 0,01	3,3 ± 0,02	1,6 ± 0,1
PEO 1300	1300	1,36 ± 0,02	1,8 ± 0,03	3,7 ± 0,3
PEO 1450	1450	1,50 ± 0,01	1,6 ± 0,01	2,5 ± 0,2
PEO 1500	1500	1,19 ± 0,01	2,0 ± 0,09	1,1 ± 0,1
PEO 2000	2000	1,40 ± 0,01	1,7 ± 0,09	1,1 ± 0,1
PEO 2150	2150	1,57 ± 0,01	1,6 ± 0,01	1,6 ± 0,1
PEO 3400	3400	1,87 ± 0,01	1,2 ± 0,08	2,3 ± 0,3
PEO 12000	12000	5,48 ± 0,03	0,5 ± 0,02	
PEO 100000	100000	10,40 ± 1,5	0,2 ± 0,03	
PEO 400000	400000	41,80 ± 0,8	0,06 ± 0,01	
PEO	M_w [g/mol]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
PEO 200	200	0,16 ± 0,01	6,4 ± 0,3	0,4 ± 0,01
PEO 300	300	0,18 ± 0,01	5,7 ± 0,2	0,3 ± 0,01
PEO 400	400	0,26 ± 0,01	3,9 ± 0,2	0,4 ± 0,01
PEO 600	600	0,30 ± 0,02	3,4 ± 0,1	0,3 ± 0,01
PEO 1300	1300	0,38 ± 0,06	2,6 ± 0,1	0,5 ± 0,04
PEO 1450	1450	1,10 ± 0,29	0,9 ± 0,04	0,5 ± 0,01
PEO 1500	1500	2,85 ± 0,97	0,4 ± 0,01	0,3 ± 0,01
PEO 2000	2000	4,18 ± 2,0	0,2 ± 0,12	0,2 ± 0,01
PEO 2150	2150	1,10 ± 0,17	0,9 ± 0,04	0,5 ± 0,01
PEO 3400	3400	1,11 ± 0,41	0,9 ± 0,04	0,3 ± 0,01
PEO 12000	12000	30,30 ± 10	0,03 ± 0,01	
PEO 100000	100000	36,36 ± 0	0,03 ± 0	
PEO 400000	400000	66,67 ± 0	0,02 ± 0	

Tabelle 8.10: Werte der Verweildauer τ_b und der Austauschkonstante k_{ex} in Abhängigkeit der verwendeten Sonde (PVA) für Vesikel aus P2VP-PEO

PVA	M_w [g/mol]	D_a [10^{-10} m ² /s]	R_H [nm]	$\tau_{1/2}$ [s]	k_{ex} [1/s]
1	ca. 4000	$0,6 \pm 0,07$	$4,35 \pm 0,52$	42	$0,02 \pm 0,001$
2	11000	$0,5 \pm 0,08$	$4,44 \pm 0,71$	132	$0,01 \pm 0,001$
3		$0,5 \pm 0,01$	$4,45 \pm 0,09$	55	$0,02 \pm 0,001$
4	200	$0,5 \pm 0,01$	$4,54 \pm 0,09$	95	$0,01 \pm 0,001$
5		$0,5 \pm 0,01$	$5,30 \pm 0,11$	250	$0,004 \pm 0,002$
6	37500	$0,4 \pm 0,01$	$6,01 \pm 0,15$	308	$0,003 \pm 0,0002$
7	72000	$0,3 \pm 0,01$	$8,17 \pm 0,27$	312	$0,003 \pm 0,0002$

Tabelle 8.11: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus PI-PEO

Ethanolkonzentration [Vol%]	D_a [10^{-09} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
0	$2,3 \pm 0,01$	$2,6 \pm 1,2$	$0,19 \pm 0,003$	$5,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
10	$1,8 \pm 0,02$	$5,6 \pm 0,7$	$0,18 \pm 0,001$	$5,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$
20	$1,7 \pm 0,01$	$4,7 \pm 0,3$	$0,16 \pm 0,004$	$6,3 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$
30	$1,3 \pm 0,01$	$6,1 \pm 0,5$	$0,12 \pm 0,004$	$8,3 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$
40	$1,1 \pm 0,01$	$12,0 \pm 1,4$	$0,10 \pm 0,007$	$10,0 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,3$
30	$1,2 \pm 0,02$	$12,0 \pm 1,1$	$0,12 \pm 0,008$	$8,3 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,2$
20	$1,4 \pm 0,01$	$9,1 \pm 1,1$	$0,17 \pm 0,002$	$5,9 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,4$
10	$1,8 \pm 0,01$	$5,4 \pm 0,3$	$0,18 \pm 0,005$	$5,6 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,1$

Tabelle 8.12: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Ethanol in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration für Vesikel aus PI-PEO

Ethanolkonzentration [Vol%]	D_a [10^{-10} m ² /s]	D_b [10^{-12} m ² /s]	τ_b [s]	k_{ex} [1/s]	p_b [%]
17	$9,4 \pm 0,03$	$3,3 \pm 0,2$	$0,25 \pm 0,005$	$4,0 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,01$
30	$7,7 \pm 0,02$	$3,8 \pm 0,2$	$0,23 \pm 0,004$	$4,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,01$
40	$6,9 \pm 0,02$	$4,4 \pm 0,3$	$0,20 \pm 0,003$	$5,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,01$
45	$6,3 \pm 0,02$	$5,1 \pm 0,2$	$0,15 \pm 0,003$	$6,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,01$
40	$6,3 \pm 0,02$	$4,4 \pm 0,2$	$0,17 \pm 0,003$	$5,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,01$
33	$6,8 \pm 0,03$	$4,9 \pm 0,5$	$0,15 \pm 0,002$	$5,9 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,01$
27	$7,3 \pm 0,03$	$4,2 \pm 0,4$	$0,17 \pm 0,005$	$5,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,01$
20	$8,5 \pm 0,05$	$3,2 \pm 0,6$	$0,18 \pm 0,007$	$5,6 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$

Tabelle 8.13: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus PLA-PEO

Temperatur [°C]	$D_a [10^{-09} \text{ m}^2/\text{s}]$	$D_b [10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}]$	$\tau_b [\text{s}]$	$k_{\text{ex}} [1/\text{s}]$	$p_b [\%]$
21,1	$1,8 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,01$	$2,9 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
25,0	$2,2 \pm 0,01$	$1,9 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,002$	$4,0 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
30,0	$2,3 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,003$	$7,4 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,02$
34,4	$2,7 \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,001$	$11,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
36,7	$2,8 \pm 0,03$	$3,3 \pm 0,1$	$0,08 \pm 0,002$	$12,5 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,02$
36,7	$2,8 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,001$	$11,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
34,4	$2,5 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,002$	$8,3 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
30,0	$2,5 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,1$	$0,16 \pm 0,001$	$6,3 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
25,0	$2,2 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,1$	$0,22 \pm 0,002$	$4,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$
21,1	$2,0 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,002$	$3,4 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$

Tabelle 8.14: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit vom pH-Wert für Vesikel aus PLA-PEO

pH-Wert	$D_a [10^{-09} \text{ m}^2/\text{s}]$	$D_b [10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}]$	$\tau_b [\text{s}]$	$k_{\text{ex}} [1/\text{s}]$	$p_b [\%]$
4,0	$2,1 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,01$	$3,4 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$
6,0	$2,1 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,01$	$3,3 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$
7,0	$2,1 \pm 0,01$	$5,2 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$
9,0	$2,2 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,2$	$0,26 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$
10,0	$2,0 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,1$	$0,26 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$

Tabelle 8.15: Werte für die angepassten Zerfallskurven von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur für Vesikel aus PB-PEO

Temperatur [°C]	$D_a [10^{-09} \text{ m}^2/\text{s}]$	$D_b [10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}]$	$\tau_b [\text{s}]$	$k_{\text{ex}} [1/\text{s}]$	$p_b [\%]$
25,0	$1,7 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,001$	$10,4 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,04$
30,0	$1,9 \pm 0,02$	$3,0 \pm 0,1$	$0,08 \pm 0,001$	$12,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,03$
34,4	$2,1 \pm 0,02$	$3,3 \pm 0,1$	$0,08 \pm 0,001$	$13,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,02$
37,2	$2,2 \pm 0,02$	$3,7 \pm 0,1$	$0,07 \pm 0,001$	$14,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,02$

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name: Dipl. Chem. Alina Leson
Geburtsdatum: 14. März 1979
Geburtsort: Duisburg
Familienstand: Verheiratet

Beruflicher Werdegang

- Seit 05/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Duisburg-Essen im Fachgebiet der Physikalischen Chemie.
Forschungsarbeiten zur Darstellung und Charakterisierung kolloidaler Wirkstoffträgersysteme. Charakterisierungsmethoden sind hierbei die Rasterkraftmikroskopie, Lichtmikroskopie und die NMR-Spektroskopie. Lehraufgaben im Bereich der physikalischen Chemie. Betreuung von Praktikanten, Diplom- und Bachelorarbeiten.
- 02/2004-04/2004 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Duisburg-Essen im Fachbereich Analytische Chemie. Betreuung von Studenten in verschiedenen Bereichen der instrumental-analytischen Praktika.
- 06/2003-12/2003 Anstellung als studentische Hilfskraft im Fachgebiet Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen. Unterstützung des Arbeitskreises bei der Darstellung neuer Fluorverbindungen

Promotion

- Seit 05/2004 Promotion im Fachgebiet der Physikalischen Chemie innerhalb des interdisziplinären Projektes „Block copolymer vesicles with controlled take-up/release function“ an der Universität Duisburg-Essen.
Thema: „**Untersuchung von Wirkstoffträgersysteme mit Hilfe der gepulsten Feldgradienten-NMR**“
Referent: Prof. Dr. C. Mayer; Korreferent: Prof. Dr. S. Förster (Universität Hamburg)

Studium

- 06/2003-12/2003 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dr. h.c. H.-J. Frohn, Anorganische Chemie
„Poly-Fluor-Aryl-Substitutionen an Pentafluorphenyliod(V)tetrafluorid
 $C_6F_5IF_4$ “
- 10/1998-12/2003 Chemiestudium an der Gerhard-Mercator-Universität-Gesamthoch-
schule Duisburg mit dem Wahlpflichtfach Analytische Chemie,
Abschluss: Diplom-Chemikerin.

Schulausbildung

- 1989-1998 Elly-Heuss-Knapp Gymnasium Duisburg,
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
- 1986-1989 Katholische Grundschule Henriettenstraße, Duisburg

Weitere Tätigkeiten

- 2000-2002 Tätigkeit als Werkstudentin bei der ThyssenKrupp Steel AG im Bereich
Oberflächen- und Schichtenanalytik. Untersuchung von metallischen
Oberflächen mit Hilfe der Glimmentladungsspektroskopie,
Untersuchung der Schichtzusammensetzung mit Hilfe der optischen
Emissions-Spektralanalyse
- 1998-1999 Studienvorbereitende bzw. studienbegleitende Praktika bei der
ThyssenKrupp Steel AG in Duisburg.

Beiträge zu Tagungen

Vorträge:

- 2. Xantener Gespräch zur medizinisch-biologischen Chemie "Von molekularen Wechselwirkungen zu Lebensvorgängen", Xanten, Dezember 2004
- 3rd Zsigmondy Kolloquium, Berlin, April 2006
- Controlled Release Society annual meeting, Freiburg, März 2007

Poster:

- 2nd International Symposium on Complex Materials, Stuttgart, Juni 2005
- 1st International Symposium on Polymer Vesicles, Beuggen, August 2005
- *42nd Meeting of the German Colloid Society, Aachen, September 2005
(ausgezeichnet mit dem Posterpreis der German Colloid Society)*
- 21st Conference of the European Colloid and Interface Society, Genf 2007 .

Veröffentlichungen

- A. Bauer, S. Hauschild, M. Stolzenburg, S. Förster, C. Mayer, Chemical Physics Letters 419 (2006) 430-433
- C. Mayer, A. Bauer, Progress in Colloid Polymer Science 133 (2006) 22-29
- A. Bauer, C. Kopschütz, M. Stolzenburg, S. Förster, C. Mayer, Journal of Membran Science, 284 (2006) 1-4
- A. Leson, S. Hauschild, A. Rank, A. Neub, R. Schubert, S. Förster, C. Mayer, Small 3 (2007) 1074-1083
- Y. Yan, H. Hoffmann, A. Leson, C. Mayer, Journal of Physical Chemistry B 111 (2007) 6161-6166
- A. Leson, V. Filiz, S. Förster, C. Mayer, Chemical Physics Letters, 444 (2007) 268-272