Nanopartikel aus modifizierten Polysacchariden mittels Ouzo-Effekt

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

vorgelegt von

Eugen M. Aschenbrenner

Ulm an der Donau, 2011

Amtierender Dekan:	Herr Prof. Dr. Axel Groß
1. Gutachter:	Frau Prof. Dr. Katharina Landfester
2. Gutachter:	Herr PD Dr. Ulrich Ziener
Datum der Promotion:	21.12.2011

Für meine Familie

1. EINLEITUNG 1

2. THEORETISCHER TEIL 3

2.1. Polyglucane 3

2.1.1. Dextran 5
2.1.2. Stärke 10
2.1.3. Pullulan 12

2.2. HLB-Werte 13

2.3. Heterophasensysteme 15

2.3.1. Stabilisatoren für Emulsionen und Dispersionen 15
2.3.2. Miniemulsion 20
2.3.3. Herstellung von polymeren Nanopartikeln 21
Nanopräzipitation - der polymere Ouzo-Effekt 22

2.4. Enzymatische Reaktionen 28

2.4.1. Lipasen und Esterasen 32

3. MESSMETHODEN 34

3.1. Photonenkreuzkorrelationsspektroskopie (PCCS) 34

3.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM) 36

3.3. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) 37

3.4. Messung der Oberflächenspannung nach Du Noüy 38

4. EXPERIMENTELLER TEIL 40

4.1. Synthese von Polysaccharidderivaten 40

4.1.1. Synthese von Dextryl-Methacrylat (DexMA) 40
4.1.2. Synthese von Dextryl-Benzoat-Methacrylat (DexBMA) und Dextryl-Hexanoat-Methacrylat (DexHMA) 41
4.1.3. Synthese von Fluoresceinisothiocynat modifiziertem DexBMA und DexMA 42
Synthese von FITC-DexMA 42
Synthese von FITC-DexBMA 43
Bestimmung der HLB-Werte 43

4.2. Herstellung der Dispersionen mithilfe des Ouzo-Effekts 44

4.2.1. Allgemeines Verfahren 44
4.2.2. Bestimmung des Ouzo-Bereichs 45
4.2.3. Variation der Zutropfgeschwindigkeit 45
4.2.4. Quervernetzung der DexBMA-Partikel in Dispersion 46
4.2.5. Herstellung von Hydrogelpartikeln mittels polymeren Ouzo-Effekts 46
4.2.6. Einkapselung von Farbstoffen mittels Ouzo-Effekt 47

4.3. DexMA als Stabilisator ... 48

4.4. Enzymatische Veresterungen in wässriger Umgebung ... 49

4.5. Probenvorbereitung ... 50

4.5.1. REM-Aufnahmen ... 50
4.5.2. PCCS-Messungen ... 50
4.5.3. Bestimmung der Oberflächenspannung der DexMA-Lösungen ... 51
4.5.4. HPLC-Analytik ... 51

4.6. Verwendete Chemikalien ... 51

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION ... 53

5.1. Funktionalisierung von Polysacchariden ... 53

5.1.1. Analyse und Charakterisierung ... 54
5.1.2. Einstellung des Substitutionsgrades ... 58

5.2. Polymerer Ouzo-Effekt ... 63

5.2.1. Herstellung von Polymerdispersionen mittels polymeren Ouzo Effekts ... 63
Bestimmung des Ouzo-Arbeitsbereichs ... 65
Konzentrationsvariation und Variation des Substitutionsgrades ... 70
Einfluss des Substitutionsgrades und der Hydrophilie ... 73
Einfluss der Viskosität ... 76
Einfluss des Molekulargewichts des Polymers ... 80
Einfluss des Lösemittels ... 82
Einfluss des Verhältnisses Polymerlösung zu Wasser ... 87
Einfluss der Zugabereihenfolge ... 88
Einfluss der Zutropfgeschwindigkeit der Polymerlösung auf die Partikelgrößen ... 92
5.2.2. Quervernetzung und Quellbarkeit der hydrophoben Nanopartikel ... 95
5.2.3. Hydrogel-Nanopartikel mittels inversem polymeren Ouzo-Effekts ... 98
Dextrane als Hydrogel-Nanopartikel ... 99
Stärke als Hydrogel-Nanopartikel ... 102
5.2.4. Verkapselung von Farbstoffen in einer Polysaccharidmatrix ... 104
5.2.5. Untersuchung des Zeta-Potentials der Dispersionen ... 109
5.2.6. Enzymatischer Abbau der Dextranderivate ... 110
5.2.7. Ausblick ... 112

5.3. Stabilisierung von Emulsionen mittels modifizierten Dextranen ... 116

5.3.1. Oberflächenspannung der Lösungen der polymeren Stabilisatoren ... 116
5.3.2. Herstellung von Polystyrol-Nanopartikeln mit DexMA als polymerem Stabilisator ... 118

5.4. Enzymatische Reaktionen in wässriger Miniemulsion ... 121

5.4.1. Enzymatische Veresterung ... 121

6. ZUSAMMENFASSUNG ... 126
Summary ... 130

7. LITERATUR ... 133

1. Einleitung

In den letzten Jahren und Jahrzehnten ist die fortschreitende Verknappung der fossilen Rohstoffe die treibende Kraft zur Entwicklung neuer Materialien auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Der Bedarf an Alternativen aus der Natur wird, nicht zuletzt auch wegen des sich entwickelnden öffentlichen Interesses an solchen Rohstoffen, wegen den Technologien, die zu nachhaltiger Rohstoffnutzung führen, und wegen dem Bewusstsein, dass eine rein fossile Zukunft unrealistisch ist, immer höher. Nachwachsende Rohstoffe sollen nach und nach die Rolle der fossilen übernehmen können, deshalb wird für die Erforschung und Nutzbarmachung dieser ubiquitär vorkommenden Rohstoffe und Materialien ein hoher Aufwand betrieben. Ein politischer Antrieb für diese Entwicklung sind die Klimaschutzvorgaben der Europäischen Union. Diese zielen darauf ab, den Treibhausgasausstoß bis zum Jahr 2020 um 20 bis 30% zu reduzieren[1]. Eines dieser als „gefährlich“ eingestuften Stoffe ist das Kohlendioxid. Um die Emission dieses als „Klimakiller“[2] betitelten Gases zu verringern, werden viele Initiativen ins Leben gerufen. Beispielsweise wird die Erzeugung von sogenanntem „Biodiesel“, welcher durch Umesterung von aus der Landwirtschaft stammenden Ölen (hauptsächlich Raps- oder Sojaöl) mit Methanol hergestellt wird, untersucht und vorangetrieben. Die Umweltbilanz der Methode, nach der dieser Treibstoff hergestellt wird, ist jedoch nicht optimal. Ein Teilaspekt der kontrovers geführten Diskussion zu diesem Themengebiet ist die Prozessführung, welche aufgrund der hohen Reaktionstemperaturen recht energieintensiv ist. Es gibt aber bereits Ansätze für die Optimierung dieser. Die Herstellung kann beispielsweise unter enzymatischer Katalyse ablaufen. Diese läuft bereits bei Raumtemperatur, damit kann Energie eingespart werden, was bereits am Anfang der Wertschöpfungskette zu CO_2-Einsparungen führt[3]. Pflanzenöle sind aber nicht nur zur Herstellung von alternativen Treibstoffen wertvoll, sondern auch als Ausgangsverbindungen für die Synthese von polymeren Werkstoffen[4]. Diese können einen Teil der fossilen Ausgangssubstanzen einsparen oder sogar vollständig ersetzen. Eine Hauptkomponente der Öle ist Glycerin, es fungiert als

Grundgerüst, welches als „Polyol“ für Polykondensationsreaktionen, z.B. mit Isocyanaten zu vernetztem Polyurethan, genutzt werden kann[5]. Weitere wertvolle Bestandteile der Öle sind die ungesättigten Fettsäuren, welche zu vernetzten Alkyd-Harzen verarbeitet werden können[6]. Beide Komponenten sind ebenfalls über enzymatische Katalyse zugänglich. Ein sehr großes Augenmerk liegt auf einer weiteren Gruppe der Materialien aus der Natur, den Kohlenhydraten. Der Einsatz dieser Stoffgruppe in der deutschen Industrie wird in einem Arbeitsbericht einer Organisation des Bundestags mit 1,2 Mio. Tonnen pro Jahr beziffert, eine enorme Menge. Diese können heutzutage bereits einige Anwendungen der fossilen Materialien ersetzen. Ein hervorragendes Beispiel dafür sind die Celluloseester, welche als Bindemittel für Farben, Beschichtungen und Folien Verwendung finden. Weiterhin sind Naturfaser-verstärkte Kunststoffe (NFKs), welche aus Cellulosefasern und einem duroplastischen Polymer bestehen, im Fahrzeugbau im Einsatz. Diese bieten nicht nur Ersatz für die fossilen Materialen, sondern helfen auch, das Fahrzeuggewicht zu senken und tragen so auch zur effizienteren Energienutzung bei.

Aus diesen Überlegungen gingen auch die Auswahl der Materialien und die Motivation dieser Arbeit hervor. Hier sollte die Nutzung von regenerativen Rohstoffen für die Herstellung von Nanopartikeln mithilfe einer energiearmen Methode untersucht werden. Die hier untersuchten Polysaccharide bieten eine breite Plattform für Modifikationen und sind somit besonders geeignet für die Variation unterschiedlicher Parameter. Die Herstellungsmethode für diese Nanopartikel ist der sogenannte „Ouzo-Effekt“, dieser wird im Lauf der Arbeit beschrieben und mithilfe der modifizierten Polysaccharide untersucht.

2. Theoretischer Teil

Im Folgenden wird auf die für das Verständnis der Arbeit nötigen Grundlagen eingegangen. Dabei liegt das Augenmerk auf der Beschreibung der Polysaccharide, die als Ausgangsverbindung dienen, und deren derzeitige Verwendung sowie auf dem Potential für zukünftige Anwendungen. Zudem werden die theoretischen Grundlagen für die Generierung und Stabilisierung von Dispersionen und für enzymatische Reaktionen abgehandelt.

2.1. Polyglucane

Polyglucane sind Polysaccharide, die ausschließlich aus Anhydroglucose-Einheiten aufgebaut sind (Struktur siehe Abbildung 2-1). In dieser Gruppe von Polysacchariden tritt, trotz lediglich einer funktionellen Gruppe, eine sehr große strukturelle Vielfalt auf.

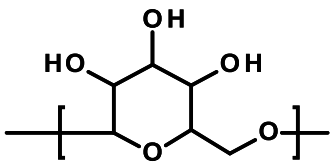


Abbildung 2-1 Anhydroglycose-Einheit, 1,6-glycosidisch verknüpft.

Gründe hierfür sind die Position der glycosidischen Bindung, welche die Struktur und Eigenschaften der Hauptkette beeinflusst, die Stereochemie des anomeren Kohlenstoffs, welche entscheidend für die physikalischen Eigenschaften der Polymers ist, wie es am Beispiel Amylose (α-1,4-Glycose) und Cellulose (β-1,4-D-Glucose) allein schon im Fall der Löslichkeit der beiden zu sehen ist, und die Art, das Muster und die Anzahl der Verzweigungen entlang der Hauptkette, wie bei den

beiden Komponenten der Stärke Amylopektin und Amylose zu sehen ist. In Tabelle 2-1 ist eine Auflistung der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe gezeigt.

Tabelle 2-1 Natürliche Polyglucane mit Herkunft und Struktur.

Polyglucan	Herkunft	Struktur
Dextran	Bakterien	α-(1,6)-D-Glucose mit α-(1,2)-, α-(1,3)- und oder α-(1,4)-D-Glucose-Verzweigungen
Stärke	Pflanzen	Amylopektin (α-(1,4) und α-(1,6) –D-Glucose) Amylose (α-(1,4)-D-Glucose)
Pullulan	Pilze	α-(1,6)-Maltotriose (3 x α-(1,4)-D-Glucose)
Cellulose	Pflanzen	β-(1,4)-D-Glucose
Glucogen	Tiere	α-(1,4)- mit α-(1,6)-D-Glucose Verzweigungen

Das wohl wichtigste Polyglucan, die Cellulose, ist nicht nur das mit Abstand am weitesten verbreitete natürliche Polymer, sondern auch die häufigste organische Verbindung überhaupt[7]. Laut der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., eine Initiative des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, liegt der industrielle Bedarf an Polyglucanen in Deutschland bei 1,35 10^6 t, wovon Cellulose etwa 35% ausmacht (Stand: Dez. 2009)[8]. Der prozentuelle Anteil ist so gering, weil lediglich die Nutzung als Cellulosefaser oder Chemiezellstoff eingehen. Papierzellstoff und Holz sind nicht in dieser Zahl mit eingerechnet. Cellulose ist zudem das Polymer, welches sowohl nativ als auch chemisch modifiziert am längsten im Gebrauch des Menschen ist. Es war, in Form von Nitrocellulose, der erste industriell genutzte thermoplastische Naturwerkstoff und fand eine recht große Bandbreite von Anwendungen, von Sprengstoff über Billardkugeln bis hin zu Zelluloid-Filmrollen. Heutzutage ist sowohl der Gebrauch der nativen Cellulose als Naturfaser oder Papiergrundstoff, als auch die chemisch modifizierte Variante, des Cellulose-Acetats, als Ersatz für Kunststoffe in der Verpackungs- und Bekleidungsindustrie sehr weit verbreitet. Trotzdem haben auch weitere Polysaccharide wirtschaftliche Bedeutung, wie die in dieser Arbeit verwendeten Polysaccharide Dextran, Stärke und Pullulan, wobei Stärke das

höchste wirtschaftliche Potential der drei aufweist. Diese drei Polysaccharide werden im Folgenden näher betrachtet.

2.1.1. Dextran

Eines der wichtigsten, bakteriell synthetisierten Polysaccharide für den Gebrauch in medizinischen und industriellen Anwendungen ist das Dextran. Es ist ein sogenanntes neutrales Homoglucan, was bedeutet, dass es ein Homopolymer ist, dessen Hauptkette aus α–1,6-verknüpften D-Glucopyranose-Repetiereinheiten (Anhydroglucose, AGU) aufgebaut ist und außer Hydroxylgruppen keine weiteren funktionellen Gruppen aufweist. Die chemische Struktur von Dextran ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

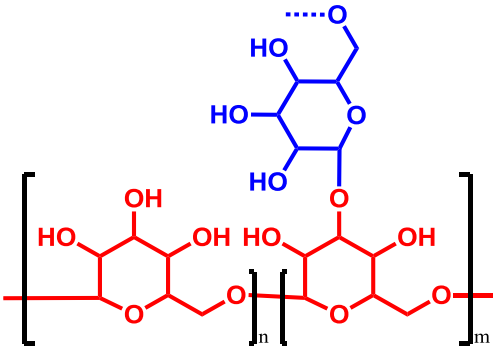


Abbildung 2-2 **Vereinfachte chemische Struktur von Dextran, als Hauptkette α-1,6-glycosidisch gebundene Glucopyranose Einheiten (rot) mit α-1,3-glycosidisch gebundenen Verzweigungen (blau).**

Die Existenz dieses Polymers ist schon sehr lange bekannt. Louis Pasteur beobachtete im Jahre 1861 das Auftreten von Dextran in Wein und wies die mikrobielle Herkunft nach[9]. Seinen Namen verdankt das Dextran Carl Scheibler. Er entdeckte die starke Rechtsdrehung der Polarisationsebene des Lichts, welche bei wässrigen Lösungen des Polymers auftritt. Aus dem lateinischen Wort „dexter“, das im Deutschen „rechts“ bedeutet, entstand letztlich der Name dieser Verbindung[10]. Heutzutage erfolgt die Herstellung biotechnologisch, durch Fermentation von

Saccharose mit Bakterien aus der Ordnung der Milchsäurebakterien (*lactobacillales*). Weit verbreitet ist der Einsatz der Gattungen *leuconostoc* und *streptococcus*, insbesondere der Art *leuconostoc mesenteroides*. Es treten je nach bakterieller Herkunft unterschiedliche Verzweigungsgrade auf. Die Verzweigungen sind auf die Hydroxylgruppen verteilt (α-1,2, α-1,3 und α-1,4), wobei die α–1,3-Verzweigungen bei *leuconostoc* am häufigsten vorkommen[11]. Die Länge der Verzweigungen beträgt jedoch zumeist nur wenige Glucoseeinheiten[12]. Die in dieser Arbeit verwendeten Dextrane entstammen der Herstellung mittels des *leuconostoc mesenteroides* Stammes NRRL B512F. Die Polysaccharide weisen eine statistisch verteilte Anzahl an Verzweigungen von etwa 5%, hauptsächlich an der α-1,3-Position, auf[13]. Die kommerzielle Nutzung von Dextranen ist durch den, verglichen mit Stärke und Cellulose, relativ hohen Preis großindustriell eingeschränkt. Jedoch konnte es sich als Spezialchemikalie für bestimmte Nischenanwendungen in der Medizin oder Industrie durchsetzen. Im Jahr 2004 erwirtschaftete das Dextran mit seinen Derivaten mit einer weltweiten Jahresproduktion von 2600 t einen Betrag von 520 Mio €[14]. Dextran wird im menschlichen Körper durch Enzyme, die Dextranasen (1,6-Alpha-D-glucan-6-glucanohydrolase **E.C. 3.2.1.11**)[15], welche in Leber, Milz, Niere und im unterem Gastrointestinal-Trakt auftreten, abgebaut[16]. Aufgrund seiner Biokompatibilität und Abbaubarkeit im menschlichen Körper wurden Dextran und seine Derivate unter anderem im (bio)medizinischen Sektor bereits erfolgreich etabliert. Einige Anwendungen sind in Tabelle 2-2 aufgelistet. Die dänische Firma Pharmacosmos vertreibt beispielsweise sowohl native Dextrane als auch modifizierte Derivate für klinische Anwendungen, wie die Lagerung von Transplantatorganen[17], Trägerstoff für Impfstoffe und Implantatkomponenten.

Tabelle 2-2 Dextran und seine Derivate und deren Anwendungen[4, 6, 16, 18-21].

Dextran	Verwendung
natives Dextran	Blutersatzflüssigkeiten Gleitmittel für Kontaktlinsen Beschichtung von med. Präparaten (keine Opsonisierung von Proteinen) iron-dextran (Imferon®) Behandlung von Eisenmangel Ferritpartikel in der hypethermischen Tumortherapie
Dextranester	Phosphate: Zytostatikum für Tumorzellen Sulfate: antivirale Wirkung (Herpes), Kosmetik Methacrylate: Hydrogele, Wundverschlüsse
Dextrankonjugate	Konjugate mit Bioaktiven Substanzen als Arzneistoffe Insulinkonjugate Fluoreszenzmarkierte Dextrane zur Untersuchung humanphysiologischer Prozesse

Dextran weist eine gute Löslichkeit sowohl in Wasser als auch in polaren organischen Lösemitteln wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Dimethylacetamid auf. Es ist kommerziell verfügbar in unterschiedlichen, relativ eng verteilten Molekulargewichtsbereichen. Diese Eigenschaften und das Vorhandensein der zahlreichen Hydroxylgruppen machen das Dextran sehr interessant für chemische Modifikationen. Einfach zugänglich sind z.B. Ester, sowohl organische[22-24], anorganische[25, 26] als auch gemischte[27], Ether[28, 29] sowie Konjugate medizinischer Wirkstoffe[30]. Diese Derivate des Dextrans weisen deutlich veränderte chemische Eigenschaften auf. So wurde z.B. bei gemischten Dextranestern der Phosphorsäure und langkettigen Carbonsäuren, wie z.B. Palmitinsäure, eine wachstumshemmende Wirkung auf bestimmte Tumorarten festgestellt[18].

In Abbildung 2-3 sind drei der möglichen Funktionalisierungen dargestellt.

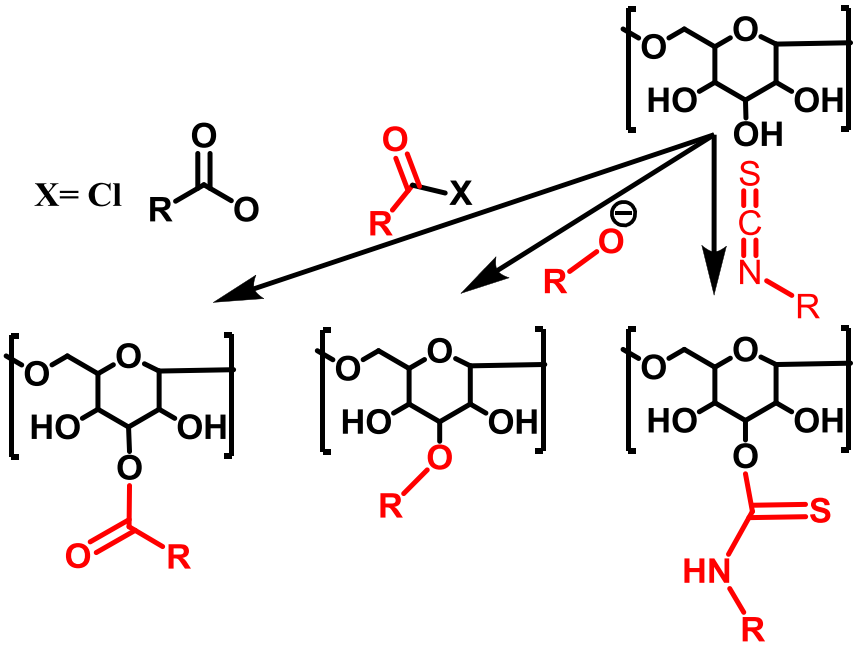


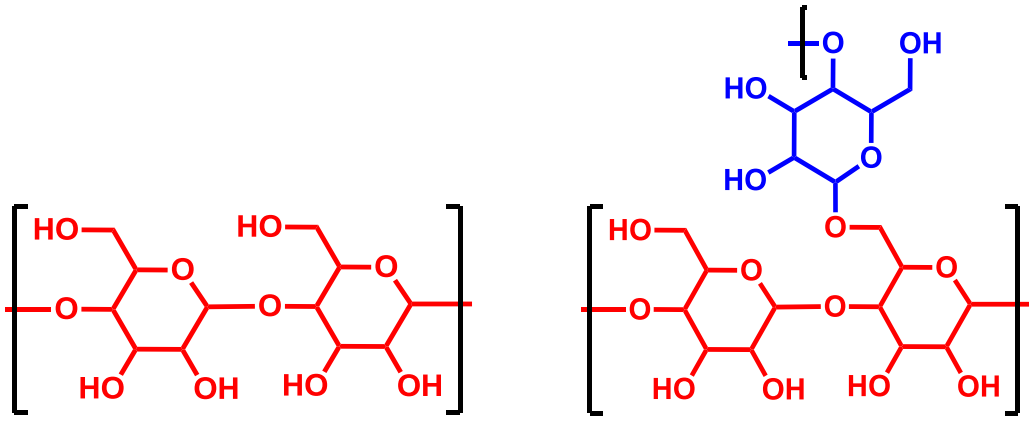
Abbildung 2-3 **Reaktionen zur Funktionalisierung von Dextran (und allen anderen verwendeten Polysacchariden) links Veresterung mittels Säureanhydrid oder –chlorid, Mitte Veretherung mittels Alkoholat und rechts Thiocarbamat-Bildung mittels Isothiocyanat.**

Im einfachsten Fall kann man die Hydrophilie verringern und damit die Löslichkeit der Derivate in organischen Lösemitteln erhöhen. Diese hängt unmittelbar mit dem Substitutionsgrad und dem Substituenten zusammen. Dadurch eröffnen sich viele Möglichkeiten zur Verwendung der Derivate, u.a. als polymere Werkstoffe, vornehmlich aber als Nanopartikel, z.B. mit eingebauten Schaltern für den gezielten Abbau oder als Träger für bestimmte Wirkstoffe[31]. Selbst die Möglichkeit des gezielten Wirkstofftransports, des sogenannten „targeted delivery“ ist gegeben. Durch Funktionalisierung der Polymere mit Folsäure lassen sich gezielt Krebszellen ansteuern[32]. Belädt man diese Partikel mit einem Zytostatikum wie Doxorubicin, lässt sich dieses direkt in Zellen transportieren, ohne die gesunden Zellen übermäßig zu belasten[33]. In neueren Veröffentlichungen wird auch berichtet, dass Dextrane durch Modifikation einen amphiphilen Charakter aufweisen und sich als Emulgatoren für Emulsionspolymerisationen einsetzen lassen[34]. Die Gruppe um Dellacherie beschreibt die Reduktion sowohl der Oberflächen- als auch der Grenzflächenspannung (Wasser/Dodekan) durch Natriumsulfopropyl- und/oder

Phenoxy-substituierten Dextranen[35-37]. Die Dextrane werden als Stabilisatoren eingesetzt, um eine Styrol-Emulsion herzustellen und diese zu Polystyrol-Nanopartikeln zu polymerisieren[38]. Weiterhin wurde die proteinabstoßende Wirkung von Dextran untersucht. Dies wurde anhand eines Vergleichs von Adsorption von Fibrinogen an sowohl Dextran- als auch Polyethylenglycol (PEG)-modifizierten Styroloberflächen gezeigt[39]. Dabei konnte das Dextran einen mit dem PEG vergleichbaren Wert für die Abstoßung von Proteinen erreichen und könnte sich evtl. für Anwendungen, bei denen eine Proteinadsorption hinderlich ist, empfehlen. Das Dextran ist zusätzlich durch die Tatsache, dass es eine deutlich geringere Toxizität als PEG aufweist eine gute Alternative zu diesem[40]. Hierbei könnte das Aufbringen von Dextran-Hydrogelen auf Oberflächen die gewünschte Wirkung erzielen. Diese sind durch Modifizierungen von Dextranen zugänglich. Die Forschungsgruppe um Levesque zeigte, dass durch Veränderung der Eigenschaften auch eine andere Wirkung erzielt werden kann: Anhand von peptidvernetzten Dextranhydrogelen[41] zeigen die Autoren, dass ein erhöhtes Zellwachstum auf diesen Materialien festgestellt werden kann. Diese Tatsache macht Dextran-Hydrogele als Matrix für Gewebeaufbau, das sogenannte „Tissue Engineering“, sehr interessant[42]. Eine weitere Herangehensweise zur Herstellung von Dextranhydrogelen ist die 1-3-dipolare Cycloaddition, die sogenannte „Click“-Chemie. Dabei kann das Dextran sowohl mit Azid-Funktionalitäten als auch mit Alkin-Resten modifiziert werden und über Cu-Katalyse zu Hydrogelen „geclickt“ werden. Es wird davon berichtet, dass die Hydrogele durch geschickte Prozessführung sogar schichtweise aufgebaut werden können, dabei sind die beiden Click-Komponenten über eine hydrolysierbare Carbonatester-Gruppe an das Dextran gekoppelt und können dadurch hydrolytisch abgebaut werden[43].

2.1.2. Stärke

Stärke ist neben Cellulose das am weitesten verbreitete Polysaccharid. Für die industrielle Nutzung werden jährlich europaweit 9,4 Mio. t Stärke aus Kartoffeln, Mais und Weizen für die chemische Industrie, die Lebensmittelindustrie und für die Papierherstellung erzeugt und ein Umsatz von 7,5 Mrd. € erreicht (Stand Dez. 2009)[44]. Als pflanzliches Polysaccharid entstammt die Stärke der pflanzlichen Fotosynthese und wird von den Pflanzen zur Energiespeicherung verwendet. Sie findet aufgrund ihrer Häufigkeit und Eigenschaften breite Anwendung nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie. Ein wichtigstes Einsatzgebiet ist die Papierherstellung, sie wird auch als Klebstoff für Pappe, als Biokunststoff für Verpackungen und zur Herstellung von Bio-Ethanol eingesetzt. Stärke ist wie das Dextran ein Homoglucan, besteht aber aus zwei Hauptkomponenten: zum einen die Amylose, die unverzweigt ist und aus α-1,4-glycosidisch gebundener D-Glucopyranose besteht; Zum anderen das Amylopektin, welches ebenfalls über das α-1,4-glycosidische Backbone verfügt, jedoch α-1,6-glycosidisch verzweigt ist (Abbildung 2-4).


HO
O
OH
HO
O
HO
O
HO
O

allerdings so aufwendig, dass es wirtschaftlich sinnvoller ist, die Pflanze, aus der das Polysaccharid gewonnen wird, genetisch so zu modifizieren, dass nur einer der beiden Bestandteile gebildet wird. Die Firma BASF ließ sich deshalb die Kartoffel „Amflora“ patentieren. Diese gentechnisch veränderte Kartoffel ist entwickelt und modifiziert worden, um fast ausschließlich Amylopektin herzustellen[45]. Die EU-Kommission hat den Anbau für 2010 genehmigt, seitdem wird die genmodifizierte Kartoffel, trotz sehr kontroverser öffentlicher Haltung, angepflanzt. Amylose, die zweite Hauptkomponente der nativen Stärke hingegen, ist für ihre filmbildenden Eigenschaften bekannt und wird daher zur Herstellung von bioabbaubaren Folien verwendet[46].

Die chemischen Modifizierungen, die bereits im Kapitel Dextran beschrieben sind, lassen sich ebenso mit Stärke durchführen. Ein Derivat der Stärke, die Hydroxyethylstärke, ist bereits für einige Systeme im Nanomaßstab etabliert, so lässt sich z.B. durch Grenzflächenreaktionen in Miniemulsion eine Kapselbildung beobachten. Hierzu werden wässrige Hydroxyethylstärke-Lösungen emulgiert und mit hydrophoben Di-Isocyanaten, die sich in der kontinuierlichen Phase befinden zur Reaktion gebracht. Dadurch bildet sich eine Hülle aus Polyurethan und Polyharnstoff. In diesen Nanokapseln lassen sich hydrophile Farb- und Wirkstoffe einbringen und in Zellen zu transportieren. Es ist sogar gelungen, DNA innerhalb dieser Kapseln zu amplifizieren[47]. Für die Stärke sind, wie für das Dextran, Herstellungsmethoden für Hydrogele beschrieben. Die Stärke wird dabei z.B. mit Glycidylmethacrylat funktionalisiert und über radikalische Polymerisation in Lösung zu Hydrogelen vernetzt. Das Potential als Drug-Delivery-Material für Darmerkrankungen wird dabei von den Autoren besonders hervorgehoben[48].

2.1.3. Pullulan

Bei Pullulan handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, welches aus Stärke durch Fermentation mit dem hefeartigen Mikromyzeten *aureobasidium pullulans* entsteht. Es besteht aus Maltotrioseeinheiten, drei α-1,4-glycosidisch gebundenen D-Glucopyranose-Einheiten, welche wiederum über α-1,6-glycosidische Bindungen miteinander verbunden sind (Abbildung 2-5). Pullulan ist somit ein lineares Molekül, es sind keine Verzweigungen bekannt[49]. Hauptthersteller und auch Abnehmer dieses Polyglucans ist Japan, im Besonderen die Hayashibara-Gruppe. In Japan und den USA ist Pullulan nicht nur als gesundheitlich unbedenklich eingestuft, in Japan ist es aufgrund seiner Unverdaubarkeit durch menschliche Amylasen als ein kalorienarmer Essenszusatzstoff und Verdickungsmittel im Einsatz[50].

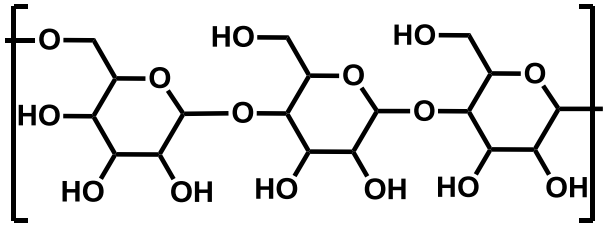


Abbildung 2-5 Vereinfachte chemische Struktur von Pullulan - eine Maltotrioseeinheit verknüpft über α-1,6-glycosidische Bindungen.

Weitere Anwendungsgebiete finden sich in der pharmazeutischen Industrie, wo Pullulan beispielsweise als Beschichtungsmaterial für Medikamente, die verlangsamt freigesetzt werden sollen, dient[51]. Pullulan wird zudem in der Kosmetikindustrie als Beimengung zu Lotions, Puder und Shampoos zugesetzt. Die Herstellung von Nanopartikeln aus einem Derivat des Pullulans, dem Pullulan-Acetat, ist ebenfalls bereits beschrieben worden[52].

2.2. HLB-Werte

Der „Hydrophile-Lipophile-Balance“-Wert (HLB-Wert) ist der meistgenutzte Wert zur Einstufung von Tensiden. Er dient als Maß für die Menge der hydrophoben Anteile im Vergleich zu den hydrophilen Anteilen im Polymermolekül. Griffin führte diese empirische Kenngröße im Jahr 1949 ein, um Vorhersagen treffen zu können, welche Tenside für welche Heterophasensysteme geeignet sind[53]. Dabei handelt es sich um eine, nach der Gleichung (2-1), erhaltene Näherung. Hierbei werden die Molmassen der lipophilen Bestandteile ins Verhältnis zur Gesamtmasse des Moleküls gesetzt und von einem willkürlich gewählten Vorfaktor 20 subtrahiert:

$$HLB = 20 * (1 - \frac{M\ lipophil}{M\ gesamt}) \quad (2\text{-}1)$$

Diese Berechnung erwies sich allerding als relativ ungenau, deshalb wurden viele experimentelle und theoretische Ansätze[54, 55] entwickelt, um dessen Modell zu verbessern und zu optimieren. Die Methode nach Davies[56] konnte sich bisher am besten etablieren[57]. Dabei ist jeder funktionellen Gruppe ein Inkrement zugeordnet. Die Inkremente werden je nach Gruppe in hydrophile und lipophile Bestandteile kategorisiert. Die Anzahl der funktionellen Gruppen, die in dem jeweiligen Polymer vorkommen, wird mit dem Inkrement multipliziert und nach Gleichung (2-2) zur Berechnung des HLB-Wertes genommen. Die Zahl 7 wurde in die Gleichung eingefügt um die Vergleichbarkeit mit der Methode nach Griffin zu ermöglichen:

$$HLB = 7 + \quad Hydrophile\ Inkremente - \quad Hydrophobe\ Inkremente \quad (2\text{-}2)$$

Die daraus ermittelten Werte können zur in Tabelle 2-3 gezeigten Klassifizierung und damit zur groben Abschätzung der Anwendungsbereiche genutzt werden.

Tabelle 2-3 **Einstufung HLB-Werte[58].**

HLB-Wert	Verwendungszweck
1,5-3	Antischaummittel
3-8	Wasser/Öl-Emulgatoren
7-9	Netzmittel
8-18	Öl/Wasser-Emulgatoren
13-15	Waschaktive Substanzen
12-18	Lösungsvermittler für wässrige Systeme

Diese Werte sind auch geeignet, um einen Näherungswert für die relative Hydrophile oder Hydrophobizität von Polymeren zu erhalten. Deshalb können die Werte auch als qualitativer Vergleich der Hydrophobizität ähnlicher Polymere untereinander genutzt werden. Im Verlauf der Arbeit wird dieser Wert als ein solches Maß gebraucht.

2.3. Heterophasensysteme

Heterophasensysteme bestehen mindestens aus zwei Komponenten, die eine Mischungslücke aufweisen, wodurch sich eine Grenzfläche ausbilden kann. Dabei unterscheidet man zwischen der dispersen oder inneren Phase, als welche die dispergierten Komponenten vorliegen, und der kontinuierlichen Phase, welche die dispergierten Komponenten umgibt. Die jeweiligen Komponenten können dabei in allen drei Aggregatzuständen (gasförmig, flüssig, fest), mit Ausnahme von gasförmig/gasförmig, vorliegen. Es sind mehrere Methoden zur Herstellung solcher dispergierten Systeme bekannt. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Herstellungsmethoden, mit besonderem Augenmerk auf Dispersionen fest/flüssig, behandelt.

2.3.1. Stabilisatoren für Emulsionen und Dispersionen

Emulsionen sind fein verteilte Tröpfchen, dispergiert in einer kontinuierlichen Phase, mit der sie nicht mischbar sind. Da bei Flüssigkeiten mit Mischungslücke üblicherweise ein makroskopisch entmischtes Zweiphasen-System thermodynamisch favorisiert wird, ist zur Herstellung von fein verteilten Tröpfchen, der sogenannten Emulgierung, Energie für die Generierung der zusätzlichen Grenzfläche nötig. Üblicherweise geschieht das durch Rühren, Durchmischen mittels eines Rotor-Stator-Sytstems oder durch Hochdruckhomogenisierung des Zweiphasen-Systems. Das bedeutet, es muss Arbeit zur Generierung der zusätzlichen Grenzfläche verrichtet werden. Die Arbeit kann durch die Absenkung der Grenzflächenenergie verringert werden. Dies geschieht durch den Einsatz von Tensiden, wie z.B. Natiumdodecylsulfat (SDS). Aufgrund ihrer amphiphilen Struktur, d.h. einer langen, hydrophoben aliphatischen Kette und einer hydrophilen Sulfat-Kopfgruppe, sind sie in der Lage, sich an der Grenzfläche hydrophil/hydrophob anzuordnen. In Folge dessen wird die Grenzflächenenergie herabgesetzt. Durch einen weiteren Effekt dieser Tenside lässt sich die Stabilität der Emulsionen gewährleisten. Die negativ

geladene Sulfat-Kopfgruppe schafft eine geladene Grenzfläche, welche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bei Annäherung von Emulsionstropfen repulsive Kräfte zeigt. Somit stoßen sich die gleichgeladenen Tropfenoberflächen ab und die Tropfen selber können nicht kollidieren. Dadurch ist der Tropfen gegen die sogenannte Koaleszenz geschützt und fließt nicht mit anderen Tropfen zusammen. Dies ist in Abbildung 2-6 schematisch dargestellt.

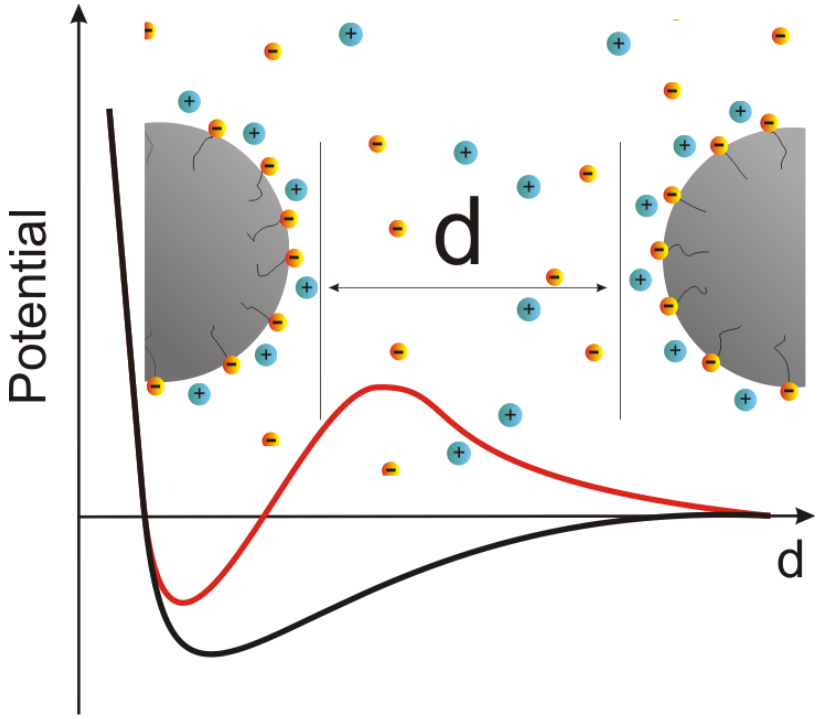


Abbildung 2-6 **Potentialverlauf in Abhängigkeit von der Entfernung der Tropfen voneinander, mit Tensid (rot) ohne Tensid (schwarz).**

Die rote Kurve in Abbildung 2-6 zeigt eine Potentialbarriere, die sich aufgrund einer positiv geladenen Helmholtz-Schicht, welche die negativ geladene Tropfenoberfläche umgibt, aufbaut. Diese verhindert das Zusammenfließen bzw. die Koaleszenz. Sind keine Ladungen oder sonstige repulsive Kräfte an der Tropfenoberfläche vorhanden, so beschreibt die schwarze Kurve den Potentialverlauf bei der Annäherung der Tropfen in der Emulsion. Hier fehlt die Barriere und die Tropfen werden kollidieren

und zu größeren Tropfen zusammenfließen. Schließlich kommt es zur kompletten Phasentrennung.

Der Einsatz von solchen ionischen Tensiden ist jedoch nicht immer vom Vorteil, denn bei Verwendung von Lösungen mit hoher Ionenstärke wird die Helmholtz-Schicht stark gestaucht und kann das Zusammenfließen der Tropfen nicht mehr verhindern. Eine weitere Einschränkung der ionischen Stabilisierung ist die Unverträglichkeit mit biologischen Systemen, wie beispielsweise im Fall von enzymatischen Reaktionen[59]. Für diese Fälle kann man sich die sogenannte sterische Stabilisierung zu Nutze machen. Mit diesem Begriff werden Stabilisierungsmechanismen, die nicht ionischer Natur sind, beschrieben. Dazu werden amphiphile Polymere, meistens Blockcopolymere, genutzt, die auf der Oberfläche der Partikel oder Tropfen adsorbieren. Diese ordnen sich, wie in Abbildung 2-7 gezeigt, nach ihrer Polarität in den unterschiedlichen Phasen, an der Grenzfläche an[60].

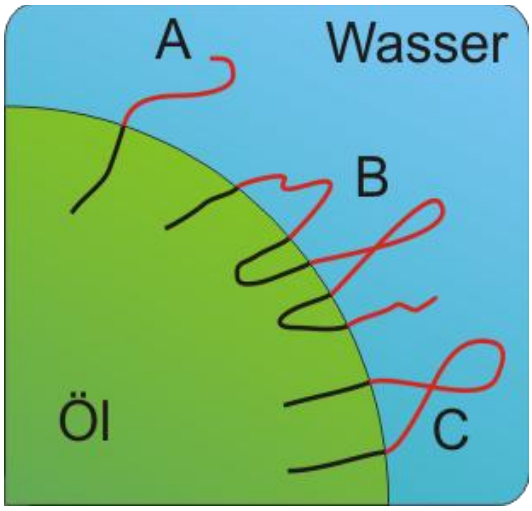


Abbildung 2-7 Grenzfläche eines Tröpfchens oder Partikels mit adsorbierten Blockcopolymeren (polymere Tenside).

Abbildung 2-7 zeigt den Fall der direkten Emulsion, d.h. eines Öl-in-Wasser-Systems. In dieser Abbildung entspricht der schwarze Anteil der Tenside dem hydrophoben Block und der rote Anteil dem hydrophilen Block. Je nach

Blockverteilung entlang der Polymerkette ist die Adsorption auch unterschiedlich. In der Abbildung sind schematisch drei Fälle dargestellt. Im Fall A ist es ein Polymer bestehend aus zwei Blöcken, wie z.B. Lutensol AT 50, bei dem der hydrophile Teil aus 50 Einheiten Ethylenglycol und der hydrophobe aus einem C18-Alkohol besteht, welcher über eine Etherbindung ans Polymer gebunden ist. Der Fall B beschreibt die Polymere mit mehreren hydrophilen und hydrophoben Blöcken. Im letzten Fall C ist ein Triblockpolymer des Typs ABA zu sehen. Die hydrophilen Bestandteile der polymeren Stabilisatoren ragen in die kontinuierliche Phase und bilden eine stabilisierende Schicht. Nähern sich nun zwei Tröpfchen einander an, steigt die Konzentration der hydrophilen Polymerketten im Zwischenraum der beiden Tröpfchen, dies ist schematisch in Abbildung 2-8 dargestellt. Folgende zwei Effekte kommen dabei zum Tragen.

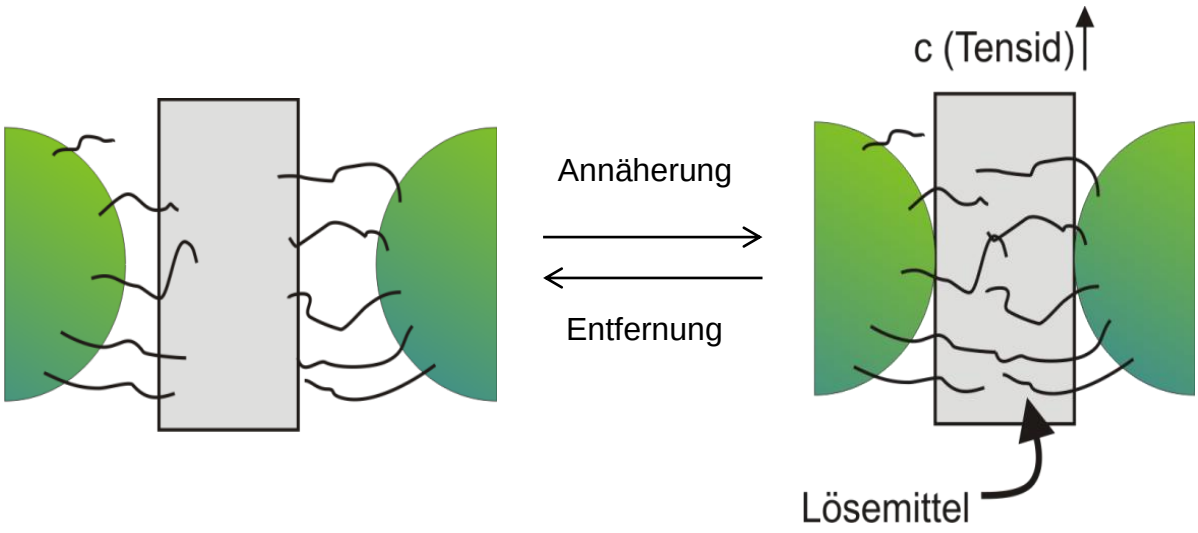


Abbildung 2-8 Schematische Darstellung der Annäherung zweier sterisch stabilisierter Partikel.

Der erste Effekt ist die Erhöhung des osmotischen Drucks, da die Konzentration des Lösemittels im Vergleich zur Umgebung geringer ist und die Konzentration des Polymers lokal (graues Rechteck in Abbildung 2-8) stark erhöht ist. In Gleichung (2-3) ist die physikalische Grundlage für diesen Effekt mathematisch ausgedrückt:

$$\Pi_{osm} = c_{pol} \cdot R \cdot T \qquad (2\text{-}3)$$

Mit: *Π* (osmotischer Druck [Pa]),
R (ideale Gaskonstante [J/(K·mol)]),
T (Temperatur [K])
c (Konzentration des Polymers [mol/L])

Die erhöhte Polymerkonzentration stellt eine Veränderung des osmotischen Drucks dar und erzeugt somit einen Druckunterschied zwischen dem grauen Bereich und den farblosen Bereichen in Abbildung 2-8. Um diesem Druckunterschied auszugleichen, muss Lösemittel nachströmen, damit die Konzentration der Polymere sinkt. Dadurch entfernen sich die Kolloide voneinander und der Abstand zwischen den Partikeln vergrößert sich.
Der zweite Effekt ist die Senkung der Entropie. Bei einer erhöhten Polymerkonzentration in einem eingeschränkten Zwischenraum sinkt die Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten deutlich. Da die Entropie proportional zur Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten ist, sinkt diese auch:

$$S = k_B \cdot \ln \Omega \qquad (2\text{-}4)$$

Mit: *S* (Entropie [J/K]),
k_B (Boltzmann Konstante [J/K])
Ω (Zahl der möglichen Mikrozustände)

Da die Entropie nach der Gibbs-Helmholtz Gleichung (2-5) in die Gesamtenergie (freie Gibb'sche Energie ΔG) des Systems eingeht, erhöht sich diese und das System reagiert darauf mit Abstoßung der Kolloide. Dadurch werden mehr Anordnungsmöglichkeiten geschaffen und somit wird eine Entropieerhöhung bewirkt und ein energieärmerer Zustand erreicht, womit dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik entsprochen wird:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2\text{-}5)$$

Mit: ΔG (Freie Gibbs Enthalpie [J])
ΔH (Enthalpie [J])
T (Temperatur [K])
ΔS (Entropie [J/K])

Beide Effekte tragen damit zur Verringerung der Kollisionen der Tröpfchen bei, und damit verhindern sie die Koaleszenz. Bei dieser Art der Stabilisierung ist allerdings darauf zu achten, dass die Komponenten der Dispersion für die Teilblöcke der Stabilisatoren ein gutes Lösemittel darstellen, denn die stabilisierende Wirkung kann nur bei gequollenen Polymerketten erreicht werden. Sind diese in einem kollabierten Zustand, ist der Raum, den die Ketten einnehmen, deutlich kleiner und die Tropfen kommen sich näher, was zu Koaleszenz führen kann. Die Temperatur hat ebenfalls eine Auswirkung auf die Güte des Lösemittels, diese ist als weiterer Einflussfaktor für die Stabilisierung der Emulsionen zu beachten[61].

2.3.2. Miniemulsion

Die Miniemulsion ist ein spezielles Heterophasensystem. Sie besteht aus dispergierten Tröpfchen, die durch sehr hohe Scherkräfte (z.B. Ultraschall oder Hochdruckhomogenisator) in einer kontinuierlichen Phase hergestellt werden. Diese müssen, um deren Stabilität zu gewährleisten, gegen Koaleszenz und zusätzlich gegen die sogenannte *Ostwald*-Reifung stabilisiert werden. Die *Ostwald*-Reifung kommt aufgrund des unterschiedlichen *Laplace*-Drucks in verschieden großen Tropfen nach Gleichung (2-6) zustande. Bedingt durch die Diffusion der inneren Phase durch die kontinuierliche Phase wachsen die größeren Tropfen, die einen kleineren *Laplace*-Druck aufweisen, auf Kosten der kleineren.

Der Laplace Druck ist definiert als:

$$\Delta p_{innen-außen} = \frac{2\sigma}{r} \quad (2\text{-}6)$$

Dem kann durch Zugabe eines geeigneten osmotischen Reagenzes, bei Öl-in-Wasser-Miniemulsionen ein stark hydrophobes Agens wie Hexadekan, entgegengewirkt werden. Dadurch baut sich ein osmotischer Druck nach Gleichung (2-2) auf, der die Diffusion der inneren Phase einschränkt. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, durch Polymerisation der inneren Phase Nanopartikel herzustellen, die eine exakte Abbildung der vorherigen Nanotröpfchen darstellen und aufgrund der unterdrückten Diffusion auch die gleiche Zusammensetzung wie vor der Reaktion besitzen[62, 63].

2.3.3. Herstellung von polymeren Nanopartikeln

Es existieren viele unterschiedliche Methoden, um polymere Nanopartikel herzustellen[64]. Diese lassen sich in zwei große Kategorien unterteilen. Einerseits gibt es die Synthese von Nanopartikeln, bei der niedermolekulare Monomere zum Polymer reagieren, wie z.B. im Fall der Emulsionspolymerisation. Andererseits ist es auch möglich, Bulk-Materialien (wie bereits gebildete Polymere) zu Nanostrukturen zu verarbeiten.

1. Nanopartikel aus Monomeren: Die bedeutendste und meistgenutzte Methode für die Herstellung von Polymerlatizes aus Monomeren insgesamt ist wohl die Emulsionspolymerisation. Bei dieser wird ein Monomer durch Rühren in der kontinuierlichen Phase dispergiert und bildet so die innere Phase aus, die neu geschaffene Grenzfläche wird durch Zugabe von Tensiden stabilisiert. Dabei werden zwei Fälle unterschieden. Es wird von einer direkten Emulsion gesprochen, wenn die kontinuierliche Phase wässrig ist und die innere Phase eine hydrophobe Verbindung, im umgekehrten Fall spricht man von einer inversen Emulsion. Ist das dispergierte Monomer olefinischer Natur, kann es durch Zusatz eines Radikalinitiators zu einem Polymer reagieren. Dieses ist dann in Form von sphärischen Nanopartikeln in der Dispersion zu finden. Die Herstellung von Dispersionen im Nanometer-Maßstab kann nicht nur, in Emulsionspolymerisation erfolgen. Es ist zwar der verbreitetste Weg, jedoch auch einigen Limitierungen unterworfen. Zwei wichtige Voraussetzungen

müssen dabei von den Monomeren erfüllt sein. Die Monomere müssen hydrophob sein, dabei jedoch eine gewisse Löslichkeit in Wasser besitzen und zudem radikalisch polymerisierbar sein.

2. Partikel aus bereits gebildeten Polymeren: Bereits gebildete Polymere können nicht zur Herstellung von Nanopartikeln nach oben genannter Methode genutzt werden. Zu diesem Zweck kann man sich anderer Methoden bedienen. Dazu bietet sich die sog. Emulsions-Lösemittel-Diffusions-Technik (emulsion/solvent-diffusion technique) an[65]. Dabei werden hydrophobe Polymere in einem flüchtigen hydrophoben Lösungsmittel gelöst, in wässrigen Tensid-Lösungen emulgiert und durch anschließendes Verdampfen des Lösemittels ausgefällt. Die dabei entstehenden Kolloide werden durch das Tensid in der wässrigen Phase gegen Koagulation stabilisiert. Dies führt zu nanopartikulären Systemen mit der Möglichkeit der Einkapselung verschiedenster Stoffe, wie z.B. Magnetit-Nanopartikel[66].

Nanopräzipitation - der polymere Ouzo-Effekt

Eine sehr elegante und einfache Methode zur Herstellung nanopartikulärer Dispersionen ist die sogenannte Nanopräzipitation, welche auch als der polymere Ouzo-Effekt bezeichnet wird[67]. Diese Bezeichnung stammt von einem alkoholischen Getränk, welches im Mittelmeerraum, im Speziellen in Griechenland, als „Ouzo“ bezeichnet wird. In Frankreich und in der Türkei werden ähnliche Getränke unter den Namen „Pastis“ und „Raki“ hergestellt. In diesen liegt ein Extrakt von Anissamen, dessen Hauptbestandteil Anethol ist, in einem Ethanol-Wasser-Gemisch gelöst vor. Gibt man zu dieser homogenen Lösung zusätzlich Wasser, ein Nichtlösemittel für Anethol, ist instantan eine Trübung zu beobachten. Diese ist durchaus für einen längeren Zeitraum stabil und darauf zurück zu führen, dass eine Separation der ätherischen Öl Phase von der wässrigen Phase stattfindet. Dadurch entsteht eine Emulsion mit fein verteilten Tröpfchen von Öl in Wasser, welche ohne den Zusatz von Tensiden stabil bleibt.

Vitale und Katz suchen in ihrer Veröffentlichung[68] nach den für den Effekt verantwortlichen Zusammenhängen und mechanistischen Details. Dabei stellen sie die These auf, dass sich die Emulsion mittels des Ouzo-Effekts in einem sehr engen Konzentrationsbereich zwischen der spinodalen und binodalen Kurve im Drei-Komponenten-Phasendiagramm (ternäres Phasendiagramm) ausbildet (Abbildung 2-9).

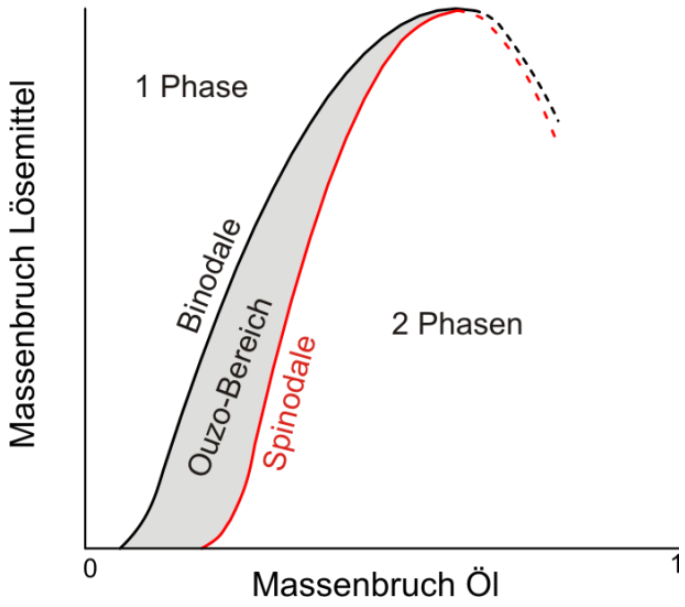


Abbildung 2-9 **Drei-Komponenten-Phasendiagramm mit den Komponenten hydrophobe Flüssigkeit (Öl) Lösemittel und Nichtlösemittel nach Vitale und Katz[68].**

Die Binodale, die auch thermodynamische Mischbarkeitsgrenze genannt wird, beschreibt die Zusammensetzung des Systems, bei welcher die Entmischung einsetzt. Die Spinodale, oder auch Stabilitätslimit genannt, beschreibt die Zusammensetzung, bei der sich das System spontan und rasch entmischt. Der Effekt tritt zwischen diesen beiden Grenzlinien auf und wird durch eine Übersättigung einer Substanz in einem Nichtlösemittel verursacht. Die Substanz bildet Nukleationskeime, welche sich zu Tröpfchen zusammenschließen. Diese sind kinetisch kolloidal stabilisiert, das bedeutet, sie befinden sich in einem metastabilen thermodynamisch ungünstigen Zustand, können aber die Energiebarriere, die zur Koaleszenz führt,

nicht überwinden. Dadurch kann eine Stabilität der Emulsionen von mehr als 6 Monaten beobachtet werden[69].

Dieser Effekt ist ebenfalls bei Lösungen von hydrophoben Polymeren in mit Wasser mischbaren organischen Lösemitteln zu beobachten. Hierzu wird eine Polymerlösung mit Wasser gemischt. Als Lösemittel sind hierfür z.B. Aceton oder THF geeignet. Die am häufigsten beschriebenen Polymere, die hierfür verwendet werden sind die biokompatiblen und –abbaubaren Polymere PLA (Polylactid)[70] und PLGA (Polylactid-*co*-Glycolid)[71]. Lange bevor die Nanotechnologie als ein großes Forschungsgebiet erkannt wurde, fand dieser Effekt bereits Anwendung, sowohl für die Herstellung von Dispersionen zur Stabilisierung von Pigmenten[72], aber auch als Reinigungsverfahren für industriell hergestellte Polymere[73].

Die Technik wurde von Fessi et al.[74] in den späten 1980er Jahren für die Herstellung von polymeren, dispergierbaren, kolloidalen Systemen patentiert[75]. Die Autoren verwendeten in Aceton gelöstes Polylactid und Benzylbenzoat mit Indomethacin und tropften dieses Gemisch zu einem großen Überschuss an Wasser, einem Nichtlösemittel für das Polymer und die anderen Komponenten. Dies bewirkte eine Trübung der wässrigen Phase mit einer blauen Opaleszenz bedingt durch die Bildung von Öltropfen, welche in einer Polymerhülle vorlagen. Die Hülle bildete sich durch die Abscheidung des Polymers an der Grenzfläche von den neu gebildeten Öltropfen zu Wasser. Seitdem steigt das Interesse an der Erforschung dieser Technik stetig. Sowohl synthetische als auch natürliche Polymere werden zu diesem Zweck verwendet und zumeist als Nanoträgersysteme, sogenannte „Nanocarrier“, für bestimmte Wirkstoffe untersucht[31, 76-80]. Der Phasenbereich, in welchem dieser Effekt zur Herstellung von Dispersionen verwendet werden kann, ist wie bereits beim Ouzo-Effekt von Flüssigkeiten beschrieben, ebenfalls sehr eng. Zwei Methoden, um in diesen Phasenbereich zu gelangen, werden in der Literatur beschrieben[81]. Zum einen ist das Zugeben einer hinreichend gering konzentrierten Polymerlösung in ein Nichtlösemittel für das Polymer möglich. Das Lösemittel muss dabei in jeglicher Zusammensetzung mit dem Nichtlösemittel mischbar sein und, um es später aus der Dispersion entfernen zu können, muss es zudem sehr flüchtig sein. Zum anderen

kann die Dialyse einer Polymerlösung in einem schwer flüchtigen Lösemittel, wie z.B. DMSO, gegen Wasser erfolgen[80]. Mechanistisch ist dieser Effekt wenig belegt. Es gibt jedoch Erklärungsansätze, die eine plausible Grundlage zum Verständnis dieses Phänomens legen. Hier werden die zwei in der Literatur diskutierten Mechanismen kurz vorgestellt.

„Diffusion-Stranding"- oder Agglomerations-Mechanismus

Der erste Erklärungsansatz ist bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts von LaMer[82] vorgeschlagen worden. LaMer schildert die Ausbildung von Schwefelpartikeln aus einer ethanolischen Lösung von Schwefel. Es wird beschrieben, dass sich kleine Aggregate in einem Volumen ausbilden, welche dann ebenfalls aggregieren, bis eine kolloidale Stabilität erreicht ist. Dieses Konzept lässt sich auf die Polymere übertragen. Es können sich bei Zugabe von Nichtlösemittel durch einerseits Diffusion des Lösemittels aus dem Tropfen und andererseits durch Diffusion des Nichtlösemittels in den Tropfen und der dadurch bedingten Übersättigung des Polymers in dem Lösemittelgemisch ebenfalls kleine Primäraggregate ausbilden und sich in einem diskreten Volumen zu größeren kolloidal stabilisierten Partikeln zusammenschließen und damit auch die Grenzfläche zum Nichtlösemittel verringern. Diese Prozesse finden auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden statt[68], und das System entmischt sich in zwei Komponenten, die Polymerketten und das Lösemittelgemisch. Die schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 2-10 gezeigt.

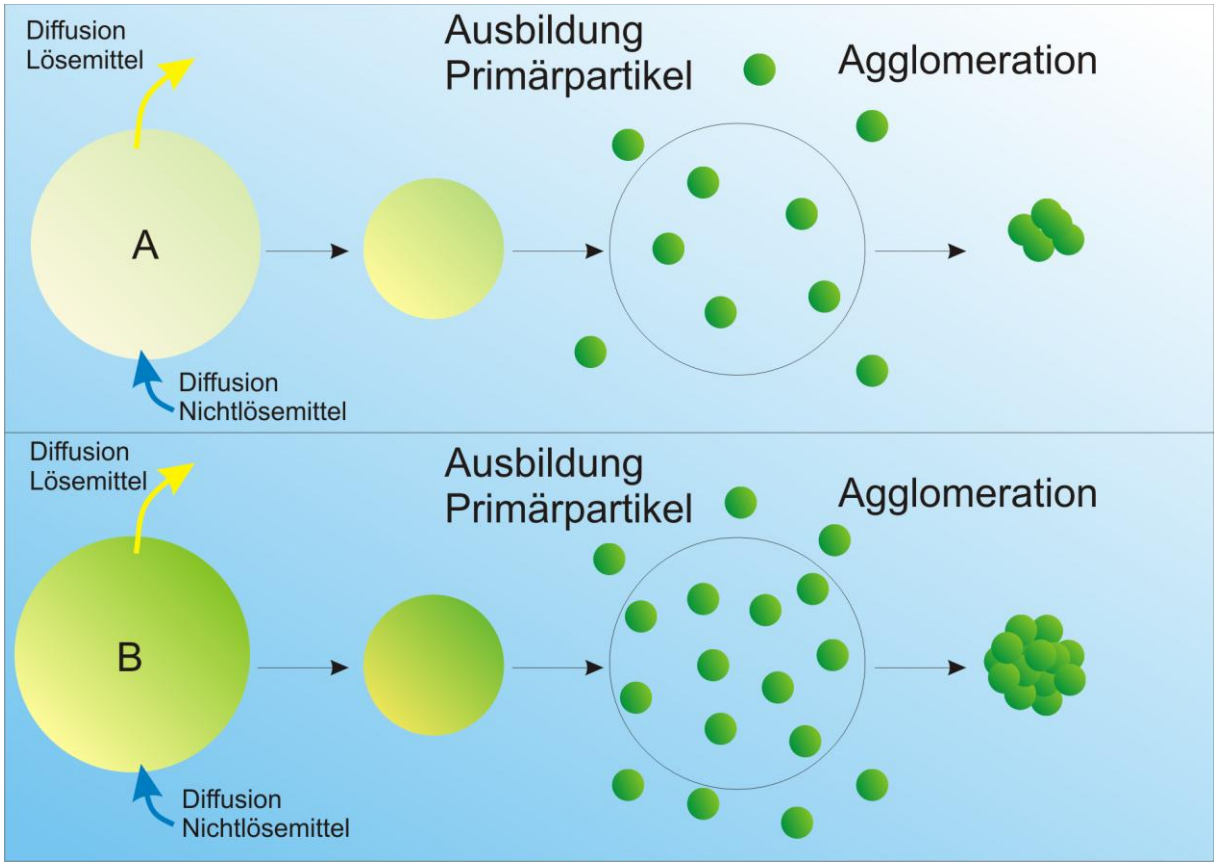


Abbildung 2-10 Schematische Darstellung des „Diffusion-Stranding"-Mechanismus für A) niedrige Polymerkonzentration und B) hohe Polymerkonzentration.

In Abbildung 2-10 ist zu sehen, dass die letztlich erhaltene Größe der Aggregate stark von der Konzentration abhängt. Je höher die Konzentration ist, desto mehr Polymerketten sind im gleichen Volumen der Lösung enthalten und desto höher ist die Anzahl der präzipitierten Primärpartikel und damit einhergehend wächst der Partikeldurchmesser. Da hier die Größe der gebildeten Primärpartikel als gleich angenommen wird, hängt das Volumen der letztlich gebildeten Partikel linear mit der Konzentration zusammen, deshalb wird für den Durchmesser eine Abhängigkeit nach Gleichung (2-6) erwartet[65, 83]:

$$c \sim V \rightarrow c \sim \overline{d}^{3} \qquad (2\text{-}6)$$

Es muss dabei darauf geachtet werden, eine bestimmte Konzentration nicht zu überschreiten, denn wird die Spinodale erreicht, kann die Präzipitation von deutlich größeren Aggregaten beobachtet werden[84].

„Nukleations und Wachstums“-Mechanismus

Der zweite Ansatz ist der von Vitale und Katz vorgeschlagene Nukleations und Wachstums“-Mechanismus („nucleation and growth“-Mechanismus)[68] für niedermolekulare Systeme. Hierbei wird davon ausgegangen, dass sich bei Erreichen einer Übersättigung der gelösten Substanz bei einem bestimmten Lösemittel/Nichtlösemittel-Verhältnis sich wenige Nukleationskeime ausbilden. Diese wachsen durch das Anlagern von weiteren Molekülen, welche durch Diffusionsprozesse aus der unmittelbaren Umgebung stammen. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl der Nukleationskeime mit der Konzentration der gelösten Substanz ansteigt. Das bedeutet, dass bei höherer Konzentration eine größere Anzahl von Partikeln und somit auch eine geringere Größe, aufgrund der Verteilung der Moleküle auf eine viel höhere Anzahl an Nukleationskeimen, zu erwarten ist. Dieses Konzept kann ebenso auf Polymere angewandt werden, dabei muss die kontinuierliche Phase aus einem Lösemittelgemisch bestehen, bei dem die Diffusion der Polymerketten möglich ist. Der von Heinze et al. beschriebene Prozess der Herstellung von Partikeln mit der Dialysemethode verläuft vermutlich nach diesem Mechanismus[85]. Dabei handelt es sich um die Nanopräzipitation von Polymeren, die in einem schwerflüchtigen Lösemittel wie DMSO oder DMF gelöst vorliegen und durch langsame Diffusion von Wasser über den Dialyseschlauch den Ouzo-Phasenbereich erreichen und dann präzipitieren. Da bei diesem Prozess zu jeder Zeit ein hoher Anteil an Lösemittel im System vorhanden ist, ist eine Diffusion der Polymerketten denkbar und daher erscheint dieser Mechanismus als plausibel. Der Mechanismus ist schematisch in Abbildung 2-11 dargestellt.

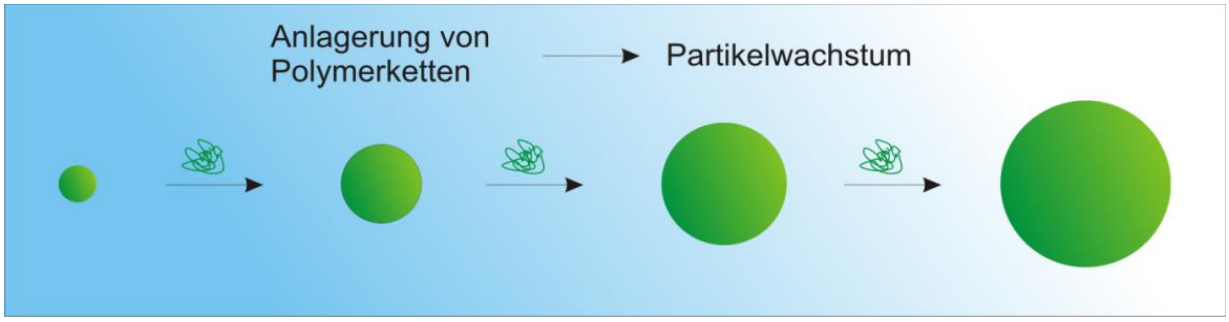


Abbildung 2-11 Schematische Darstellung des „Nucleation and Growth“-Mechanismus.

Tatsächlich ist es schwierig, einen einzelnen Mechanismus zu formulieren, denn abhängig von den äußeren Bedingungen, wie z.B. der Zusammensetzung des Lösemittelgemischs und der Löslichkeit des Polymers in diesem, kann ein Prozess dem anderen folgen oder gar zur gleichen Zeit stattfinden[86]. Die Aufklärung der Mechanismen ist Bestandteil aktueller Forschung und noch nicht völlig gesichert.

In der Literatur werden viele Einflüsse diskutiert, die bei der Partikelherstellung zu beachten sind. Die Konzentration der Lösung ist ein sehr entscheidender Faktor für die Partikelgrößen und deren Verteilung[83]. Damit verbunden ist die Viskosität der Polymerlösung, die ebenfalls als ein entscheidender Faktor gilt[65]. Weiterhin werden die Diffusionskoeffizienten der Lösemittel ineinander[87] und die Löslichkeit des Polymers[88] als Einflussgröße diskutiert.

2.4. Enzymatische Reaktionen

Katalytisch wirksame, hochmolekulare Proteine werden, per Definition, seit Kühne *Enzyme* (*griech*.: im Sauerteig) genannt[89]. Diese natürlichen Copolymere sind aus unterschiedlichen α-Aminosäuren aufgebaut. Die Reihenfolge, wie die einzelnen Aminosäuren aneinander gebunden sind, ist bei lebenden Organismen genetisch festgelegt und wird als *Primärstruktur* bezeichnet. Aus dieser Primärstruktur ergibt sich eine Faltung der Polypeptidketten, die *Sekundärstruktur*; typische natürliche

Formen sind die α-Helix und das β-Faltblatt. Die dreidimensionale Anordnung der gefalteten Ketten, die *Tertiärstruktur*, ist ebenfalls durch die Aminosäurensequenz bedingt. Diese entsteht durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Disulfid-Bindungen zwischen den Resten der verknüpften Aminosäuren. Enzyme, die aus mehreren Polypeptiden aufgebaut sind, weisen noch eine Überstruktur auf, die aus der Anordnung der einzelnen Ketten gegeneinander hervorgeht, die *Quartärstruktur*[90]. Erklärungsansätze für die Substratspezifizität der Enzyme versuchte Fischer schon am Ende des 19. Jahrhunderts zu finden. Er postulierte das Schlüssel-Schloss-Prinzip[91], in welchem eine starre Konformation der Enzyme nur eine bestimmte Substratart zulässt (Abbildung 2-12).



Abbildung 2-12: Schlüssel-Schloss-Prinzip von Enzymen. Darstellung des freien Enzyms (E) und Substrats (S), des Enzym-Substrat Komplexes (ES) und des enzymatisch katalysierten abgespaltenen Produkts (P).

Eine Erweiterung dieses Prinzips stellt die „Induced-fit"-Theorie von Koshland[92] dar, welche die Anpassung des aktiven Zentrums während der Annäherung des Substrats an das Enzym beschreibt. Damit lässt sich das Schlüssel-Schloss-Prinzip als dynamischer Vorgang betrachten. Die genauen Wirkmechanismen der Enzymkatalyse werden im Detail heute noch untersucht und sind noch nicht vollständig geklärt. Es lässt sich jedoch feststellen, dass viele Enzymreaktionen nach der von Michaelis und Menten aufgestellten „Enzym-Substrat-Theorie" ablaufen. Diese lässt sich nach einem einfachen Schema beschreiben[93]:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (2\text{-}7)$$

Im ersten Schritt bildet das Enzym **E** mit dem Substrat **S** einen Enzym-Substrat-Komplex **ES** aus. Dieser steht weiterhin im Gleichgewicht mit **E** und **S,** zerfällt aber im zweiten Schritt irreversibel zum Produkt **P** und zum ursprünglichen Enzym **E**, welches dann wieder den Enzym-Substrat-Komplex bildet[94]. Auf dieser Reaktionsgleichung basierend stellten Michaelis und Menten die Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen auf:

$$v = \frac{v_{max} \cdot S}{K_M + S} \qquad (2\text{-}8)$$

Mit [*S*] = Substratkonzentration
V = Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max} = Reaktionsgeschwindigkeit bei Sättigung des Enzyms
K_M = Michaelis-Menten-Konstante $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Trägt man nun die Reaktionsgeschwindigkeit *v* gegen die Substratkonzentration [*S*] auf, erhält man eine Sättigungskurve (siehe Abbildung 2-13).

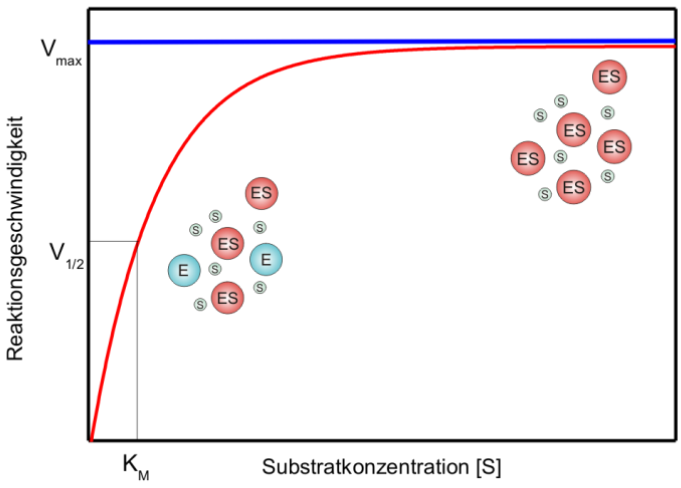


Abbildung 2-13: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration nach Michaelis und Menten.

Aus dem Kurvenverlauf wird ersichtlich, dass zu Beginn der Kurve, d.h. bei niedriger Substratkonzentration, die Geschwindigkeit nahezu proportional zur Konzentration ist. Steigt die Substratkonzentration hingegen an, nähert sich die Geschwindigkeit asymptotisch einem Sättigungswert. Dies ist die theoretische maximale Geschwindigkeit, wenn alle Enzyme im Enzym-Substrat-Komplex gebunden sind. Aus dem Graphen lässt sich zudem die Michaelis-Menten-Konstante graphisch ermitteln. Sie entspricht der Substratkonzentration bei der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit.

Zur Bezeichnung der einzelnen Enzyme wurde von der „Enzyme Commission“ (E.C.) der „International Union of Biochemistry“ (IUB) eine Empfehlung ausgegeben. Zum einen haben die Enzyme einen Trivialnamen, wie z.B. Pepsin, zum anderen einen systematischen Namen und eine vierstellige Schlüsselnummer. Der systematische Name gibt Rückschlüsse auf Substrat und den Reaktionstyp. Die Schlüsselnummern symbolisieren die Klasse, die Unterklassen und die Seriennummer. Ein Beispiel hierfür ist die Lipase (Glycerolesterhydrolase) **[E.C. 3.1.1.3]**. Die erste „**drei“** steht hier für die Hydrolasen **[E.C. 3]**, die „**eins“** nach der drei für Ester als Substrat, also Esterase **[E.C. 3.1]**. Die weiteren Zahlen sind spezifisch auf das Enzym bezogen. Die folgende Übersicht listet die Enzymklassen nach E.C. auf:

1: *Oxidoreduktasen* übertragen Elektronen vom Donor zum Akzeptor;
2: *Transferasen* übertragen Molekülgruppen (Alkyl-, Amino-, Phosphat, …);
3: *Hydrolasen* spalten Verbindungen (Ester, Peptide, Ether) unter Einlagerung von Wasser;
4: *Lyasen* katalysieren den Zerfall eines Substratmoleküls in Bruchstücke;
5: *Isomerasen* verändern das Substrat durch intramolekulare Umlagerung;
6: *Ligasen* spalten Energiespeicher um energetisch anspruchsvolle Schlüsselreaktionen für Biosynthesen zu ermöglichen.

2.4.1. Lipasen und Esterasen

Die Enzymklasse der Hydrolasen spaltet, wie in Punkt *2.1.2* erwähnt, Moleküle, die aus zwei oder mehr anderen Molekülen zusammengesetzt sind, unter Einlagerung von Wasser. Das können Ester, Peptide, Glycoside, Ether usw. sein. Für diese Arbeit interessant sind die Hydrolasen, die sowohl Ester in Säuren und Alkohole spalten, als auch die Rückreaktion, die Veresterung, katalysieren, die Esterasen und Lipasen. Es stellt sich folglich ein Gleichgewicht zwischen Ester sowie Säure und Alkohol ein. Zur Abgrenzung der Esterase von der Lipase wird die Fähigkeit der Lipasen, Triglyceride zu spalten[95], genutzt. Somit sind Lipasen [**E.C. 3.1.1.3**] spezielle Esterasen. Lipasen kommen in nahezu jedem Organismus vor und sind für die Fettverwertung zuständig. Die meisten kommerziell erhältlichen Lipasen sind jedoch mikrobieller Herkunft. Zudem werden immer häufiger gentechnisch veränderte, rekombinante Lipasen angeboten.

Lipasen sind wie andere Hydrolasen nicht auf Coenzyme angewiesen, vielmehr brauchen sie für ihre Aktivität eine Wasser/Öl-Grenzfläche. Auf diese Weise haben sie einen viel engeren Kontakt zum Substrat, und man beobachtet das Phänomen der „Grenzflächenaktivierung“. Dieses konnte erstmals durch Röntgenstrukturanalyse Anfang der neunziger Jahre erklärt werden[95]. Man stellte fest, dass Lipasen eine Art „Deckel“ (lid) aus einer Oligopeptideinheit besitzen, welcher das aktive Zentrum abschirmt. Erst an Fetttröpfchen, d.h. an einer Öl/Wasser-Grenzfläche, öffnet sich dieser durch eine Konformationsänderung und legt das aktive Zentrum frei[96]. Der Großteil der strukturbekannten Lipasen weist die gleiche spezifische Sequenzfolge von α-Helices und β-Faltblättern auf, die „α/β-Hydrolasefaltung“, wodurch eine sehr ähnliche Struktur und Wirkweise bescheinigt werden kann. Die enzymatische Wirkung der Lipasen beruht auf der „katalytischen Triade“ im aktiven Zentrum. Diese besteht aus drei Aminosäuren, dem Serin, Histidin und der Asparaginsäure[97], welche über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind (Abbildung 2-14).

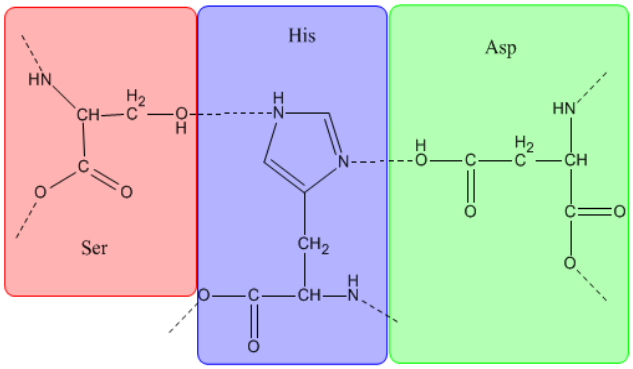


Abbildung 2-14: Katalytische Triade strukturbekannter Lipasen.

Lipasen zeichnen sich durch eine breite Substratakzeptanz aus. Sie hydrolysieren und verestern eine Reihe von Estern und Carbonsäuren unterschiedlichster Struktur. Sie sind die mit am häufigsten verwendeten Enzyme in der organischen Synthese[98]. In jüngster Vergangenheit wurden Systeme etabliert, die eine enzymatische Synthese von Aromaestern in wässriger Umgebung ermöglichen[99]. Dies ist normalerweise aufgrund des hohen Wasseranteils und der Reaktionsmischung sehr schwierig. Bedient man sich jedoch einer Heterophase, trennt man den Reaktionsort lokal von der Wasserphase ab kann die Reaktion in hohen Ausbeuten (bis zu 90%) stattfinden[100]. Damit lässt sich eine Vielzahl unterschiedlicher Ester unter sehr milden und umweltfreundlichen Bedingungen herstellen, anstatt der sonst üblichen hohen Temperaturen von weit über 100 °C reichen bei dieser Art der Estersynthese bereits Temperaturen zwischen 20 und 40 °C aus, um hohe Ausbeuten zu generieren.

3. Messmethoden

3.1. Photonenkreuzkorrelationsspektroskopie (PCCS)

Die Photonenkreuzkorrelationsspektroskopie ermöglicht es, in opaken Systemen die Partikelgrößen und deren Verteilungen zu bestimmen. Sie ist eine Weiterentwicklung der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), welche auch als dynamische Lichtstreuung (DLS) bekannt ist. Um die PCCS zu erklären, wird zunächst als Grundlage für das Verständnis die dynamische Lichtstreuung erörtert.

Die physikalische Grundlage dieser Messungen ist der „Doppler-Effekt“. Die Kolloide in einer Dispersion bewegen sich aufgrund der Brown‘schen Bewegung und werden als Streuzentren verstanden. Trifft Licht von einer bestimmten Frequenz auf den sich bewegenden Partikel, erscheint die Wellenlänge des Lichts der Lichtquelle als verschoben (Doppler-Verschiebung)[58]. Bei unidirektionaler Bewegung, also bei einer Bewegung in lediglich eine Richtung, resultiert entweder eine Rotverschiebung oder eine Blauverschiebung der Frequenz. Da sich die Teilchen in einer Dispersion aber chaotisch in alle Raumrichtungen bewegen, erhält man eine Frequenzverbreiterung, welche aber im Vergleich zur Frequenz des benutzten Lasers extrem gering ist und dadurch nur schwer zu erfassen ist. Deshalb bedient man sich der experimentell genauer bestimmbaren Autokorrelationsfunktion $g(t)$. Anstelle der Frequenzverschiebung werden hier die Photonen gezählt, die zu verschiedenen Zeiten vom Streuzentrum an der Messdiode ankommen. Dabei wird die Intensität des Signals, das zum Zeitpunkt t_1, $I(t_1)$ detektiert wird, zur Intensität des Signals zum Zeitpunkt t_2, der um x Zeiteinheiten verschoben ist, $I(t_1+x)$ korreliert. Die Autokorrelationsfunktion ist der Mittelwert des Produkts aus $I(t_1)$ und $I(t_1+x)$. Über das Wiener-Kinschie-Theorem (3-1) kann aus der Autokorrelationsfunktion der Diffusionskoeffizient D berechnet werden[101]:

$$g(t) = P_{00}(x)e^{-q^2Dt} \quad (3\text{-}1)$$

Mit $P_{00}(X)$ = Formfaktor für Kugelförmige Kolloide
q = Streuvektor
D = Diffusionskoeffizient

Aus dem Diffusionskoeffizienten kann nach der Stokes-Einstein-Beziehung (3-2) der hydrodynamische Radius der Partikel R_h berechnet werden:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3\text{-}2)$$

Mit k_B = Boltzmann Konstante
T = Temperatur
D = Diffusionskoeffizient

Ist die Dispersion zu konzentriert, treten Probleme bei der Messung auf. Je höher die Anzahl an Streuzentren ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mehrfachstreuung auftritt. Deshalb ist eine Bestimmung der Partikelgröße nur in stark verdünnten Dispersionen gültig. Die Nachteile der hohen Verdünnung sind die lange Messdauer und ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit auch eine Fehleranfälligkeit.

Daraus ist der Bedarf an einer Verbesserung der Technik entstanden und ist mit der Photonenkreuzkorrelation entwickelt worden[102]. Der Aufbau einer PCCS-Anlage ist schematisch in Abbildung 3-1 zu sehen.

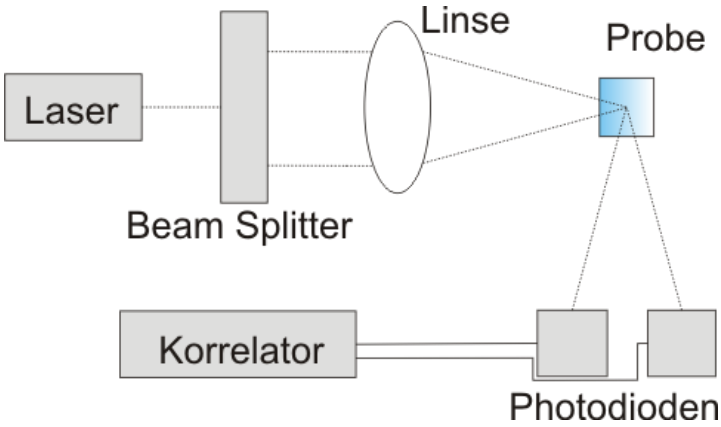


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung eines PCCS-Messaufbaus.

Im Gegensatz zur DLS wird der Laserstrahl geteilt und jeder Strahl über eine Linse gebündelt auf ein definiertes Messvolumen in der Probe gerichtet. Die Streuung wird mit zwei Fotodioden, die in einem Winkel von θ = 90° angebracht sind, erfasst. Es werden damit zwei Streulichtsignale aus dem gleichen Probenvolumen erhalten. Diese ergeben ein identisches Signal bei Photonen, die aus Einfachstreuung stammen, und es lassen sich gleichzeitig die Signale des Rauschens und der Mehrfachstreuung filtern. Dadurch kann das Signal für die Einfachstreuung aus der Masse der Signale identifiziert und gemessen werden[102]. Ist das Signal isoliert, kann die Auswertung wie bei der DLS erfolgen.

3.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird über ein Objekt ein gebündelter Elektronenstrahl geführt, um die Oberfläche zu „rastern“. Der Aufbau eines solchen Mikroskops ist in Abbildung 3-2 gezeigt.

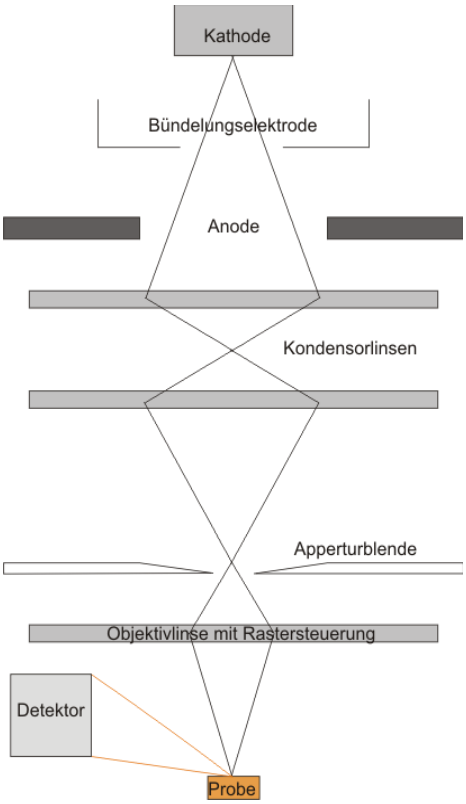


Abbildung 3-2 Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.

Die zumeist aus einer Wolfram-Kathode stammenden Elektronen werden dabei in einer Bündelungselektrode gebündelt und durch die Anode beschleunigt. Der Elektronenstrahl muss ein komplexes elektromagnetisches Linsensystem passieren, um möglichst konvergent zu sein und dadurch eine gleichmäßige Objektbeleuchtung zu gewährleisten. Die zuletzt passierte Objektivlinse fokussiert den Elektronenstrahl auf die Probe, und der integrierte Rastergenerator steuert den Strahl auf der Probenoberfläche. Treffen die Elektronen auf die Probe, wechselwirken diese mit den schwach gebundenen Elektronen im Leitungsband der Probenatome, dabei werden Sekundärelektronen erzeugt. Die Eindringtiefe in die Probe hängt von der Beschleunigungsspannung des Elektronenstrahls und von der Ordnungszahl der Probe ab. Die Sekundärelektronen besitzen eine relativ geringe kinetische Energie und werden sehr schnell von der Probe absorbiert, deshalb können lediglich die Sekundärelektronen aus der Probenoberfläche detektiert werden. Ein schräg zur Probe angebrachter Detektor fängt die ausgetretenen Elektronen ab, und je nach Anzahl der detektierten Elektronen wird der Stelle in der Probe ein Grauwert zugeordnet; dadurch entsteht eine plastische Darstellung der Probenoberfläche. Erhebungen liefern eine höhere Signalausbeute und erscheinen als hellerer Bildpunkt[103]. Weiterhin sind durch die Verwendung geeigneter Detektoren auch Elementbestimmungen, kristallographische Auswertungen, bzw. Auger-Elektronen-spektroskopische Messungen möglich.

3.3. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie wurde 1972 von Magde eingeführt und beruht auf der Technik der Einzelmolekülspektroskopie[104]. Der Aufbau ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

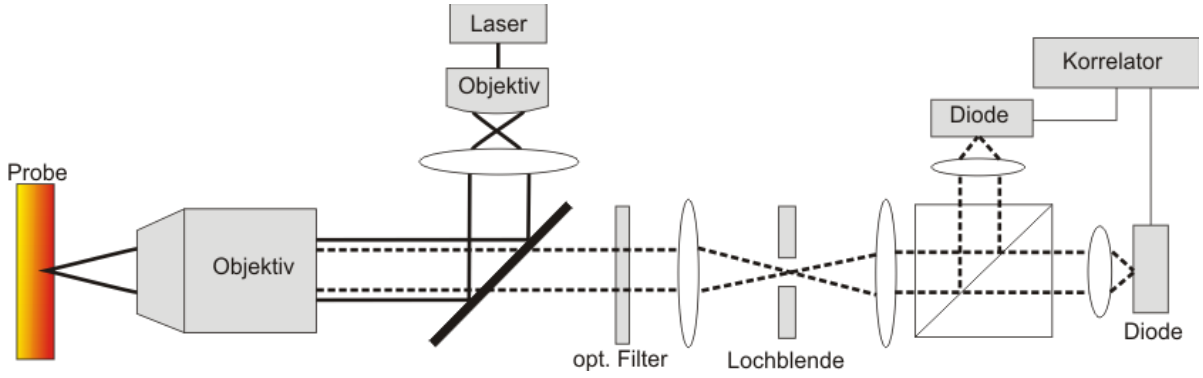


Abbildung 3-3 Schematische Darstellung eines konfokalen Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskops.

Es werden Intensitätsfluktuationen, welche durch diffundierende Farbstoffmoleküle in einem sehr kleinen Anregungsvolumen verursacht werden, gemessen. Quantitative Aussagen können unter Zuhilfenahme einer Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ des fluktuierenden Signals getroffen werden. Die Abklingzeit der Autokorrelationsfunktion wird dazu genutzt, um die Diffusionskoeffizienten von frei beweglichen Fluorophoren zu bestimmen. Aus diesem lässt sich nach der Stokes-Einstein-Beziehung, Gleichung (3-2), der hydrodynamische Teilchenradius der Moleküle oder Partikel errechnen. Als weitere Messgröße kann, aus der Intensität des Signals, die Konzentration des diffundierenden Farbstoffs ermittelt werden[105].

3.4. Messung der Oberflächenspannung nach Du Noüy

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung nach Du Noüy wird ein Ring aus einer Platin-Iridium-Legierung in die Probenlösung getaucht. Der Ring muss dabei frei von Verschmutzungen und vollständig von der Flüssigkeit benetzt sein. Beim Ziehen des Rings aus der Flüssigkeit bildet sich, wie in Abbildung 3-4 gezeigt, eine Flüssigkeitslamelle aus. Die dazu benötigte Kraft F wird mittels eines Kraftaufnehmers, beispielsweise einer Digitalwaage, gemessen.

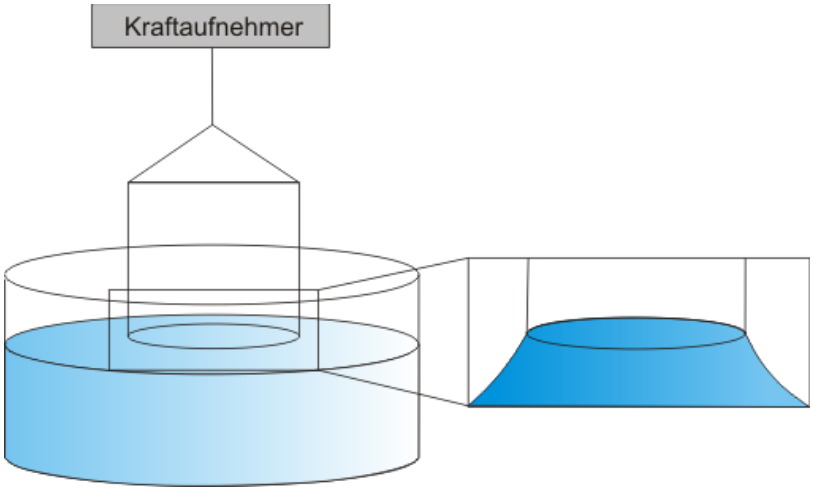


Abbildung 3-4 Ringtensiometer nach Du Noüy mit vergrößerter Darstellung der Flüssigkeitslammelle.

Aus der Ringgeometrie und der gemessenen Kraft berechnet sich die Oberflächenspannung σ wie folgt:

$$\sigma = \frac{F}{2 \cdot 2r} \tag{3-3}$$

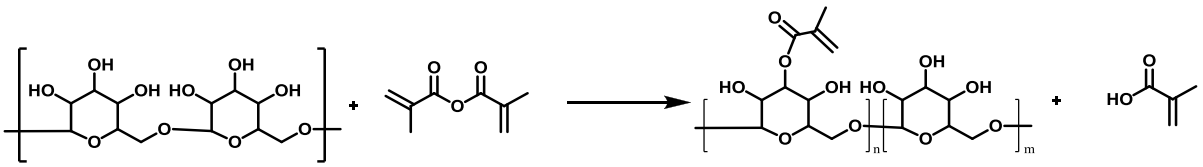
Mit F = Kraft
$2\pi r$ = Ringumfang

Der Ringumfang geht bei der Berechnung doppelt ein, dass die Lamelle sowohl innen als auch außen am Ring hängt. Die typischerweise bestimmbaren Oberflächenspannungen liegen im Bereich von 1-80 mN/m.

4. Experimenteller Teil

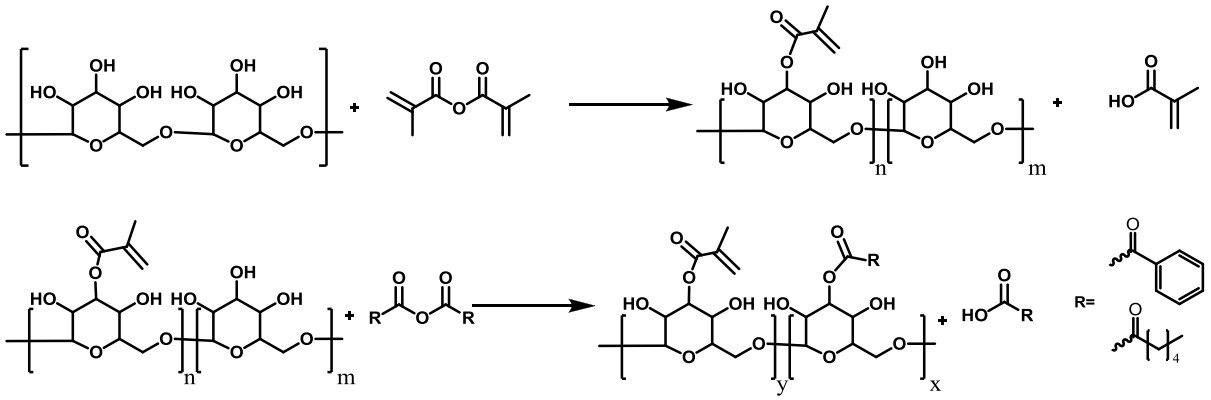
4.1. Synthese von Polysaccharidderivaten

4.1.1. Synthese von Dextryl-Methacrylat (DexMA)



Zur Funktionalisierung von Dextran mit Methacrylsäuregruppen wird das Dextran in Dimethylformamid (DMF) mit einem Zusatz von 10 Gew% LiCl und unter Schutzgas bei 90 °C gelöst. Die Temperatur wird für den weiteren Reaktionsverlauf auf 60 °C abgesenkt, diese wird im gesamten Reaktionsverlauf gehalten. Zunächst erfolgt die Zugabe der Katalysator-Base Triethylamin (im folgenden NEt_3) und des Polymerisationsinhibitors, 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluol (BHT). Nach 15 minütigem Rühren wird das Methacrylsäureanhydrid im gewünschten Verhältnis zu den OH-Gruppen des Dextrans zugegeben. Die Reaktionsmischung wird nach 2 h auf Raumtemperatur heruntergekühlt, um damit die Reaktion zu beenden. Das modifizierte Polymer wird in 2-Propanol ausgefällt und in Falcontubes bei 10000 1/min 5 min zentrifugiert, um es vom Überstand zu trennen. Der Überstand wird verworfen und das abgetrennte Polymer in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wird in einem Dialyseschlauch (regenerierte Cellulose MWCO 3,5 kD) mindestens einen Tag unter mehrfachem Austausch des Dialysewassers von Lösemitteln und Restedukt befreit. Die so gereinigte Dispersion wird gefriergetrocknet und mittels NMR in D_2O auf den Substitutionsgrad und die Reinheit hin überprüft. Dazu werden etwa 20 mg der Substanz in 0,6 ml D_2O gelöst und am Bruker Avance 300 MHz mit 128 Scans vermessen.

4.1.2. Synthese von Dextryl-Benzoat-Methacrylat (DexBMA) und Dextryl-Hexanoat-Methacrylat (DexHMA)

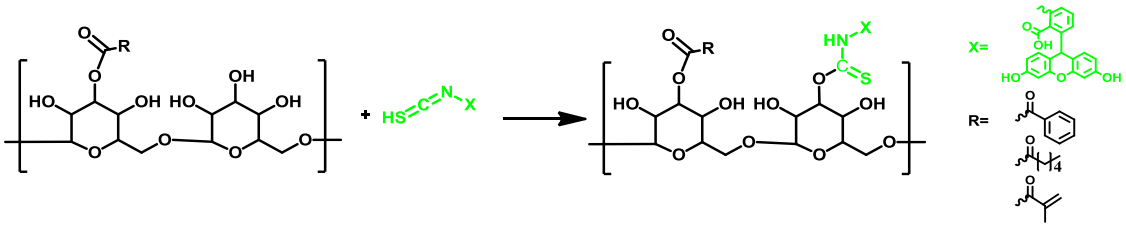


Für die Synthese der Mischester des Dextrans wird eine „Eintopf-Reaktion“ in zwei Stufen verwendet. Die erste Stufe ist die Reaktion zum DexMA, wie bereits oben beschrieben. Dazu wird das Dextran bei 90 °C unter Argon in einer 10%igen LiCl Lösung in DMF gelöst. Die Temperatur wird auf 60 °C abgesenkt und NEt_3 und BHT-Lösung werden zugegeben. Nach 15 minütigem Rühren wird Methacrylsäureanhydrid zugegeben und die Reaktionsmischung bei 60 °C 2 h gerührt. In der zweiten Stufe der Reaktion wird weiteres NEt_3, äquimolar zur jeweiligen Anhydridmenge, zugegeben und das jeweilige Säureanhydrid (Benzoesäure- oder Hexansäureanhydrid) im gewünschten Verhältnis zu den OH-Gruppen des Dextrans. Die Reaktion wird weitere 2 h bei 60 °C gerührt. Zum Beenden der Reaktion wird das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt. Das modifizierte Polysaccharid wird in 2-Propanol gefällt und mithilfe der Zentrifuge (5 min bei 10000 1/min) vom Überstand abgetrennt, der Überstand wird verworfen. Das Präzipitat wird zur weiteren Aufreinigung in Aceton gelöst, wieder in 2-Propanol gefällt und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zur Entfernung von hydrophilen, wasserlöslichen Verunreinigungen wird das Präzipitat erneut in Aceton gelöst und in Wasser gefällt. Durch Zentrifugation (20 min @ 14000 1/min) wird das Polymer vom Wasser/Aceton Gemisch befreit. Um die weitere Prozessierbarkeit des Polymers zu erleichtern, wird es erneut in Aceton gelöst und die Lösung tropfenweise mit ca. 200

ml Wasser gefällt. Das Aceton wird am Rotationsverdampfer abgezogen und die wässrige Dispersion des Polymers gefriergetrocknet. Das trockene Polymer wird mittels ^{1}H-NMR auf den Substitutionsgrad und seine Reinheit überprüft. Hierzu werden ca. 20 mg des Produkts in 0,6 ml DMSO-d_6 gelöst und am Bruker Avance 300 MHz mit 128 Scans vermessen.

Die Syntheseroute ist für sämtliche in der Arbeit verwendeten Polysaccharide (Pullulan, Stärke) gleich.

4.1.3. Synthese von Fluoresceinisothiocynat modifiziertem DexBMA und DexMA



Synthese von FITC-DexMA

Eine weitere Funktionalisierung des Dextran-Derivats 6kDexMA$_{0,49}$ erfolgte durch das Einführen eines Fluoreszenzfarbstoffes, Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Dies erfolgt nach Literaturvorschrift[106]. Hierzu werden 500 mg 6kDexMA$_{0,49}$ bei 95 °C in 5 ml DMSO gelöst, Pyridin und 10 mg Dibutylzinndilaurat als Katalysator zugegeben. Nach der Zugabe von 40 mg FITC wird das Gemisch 2 h bei 95 °C gerührt. Zur Reinigung des Gemisches wurde die Lösung in 2-Propanol gefällt und zentrifugiert (20 min @ 14000 1/min), der Überstand wird verworfen. Das Präzipitat wird in Wasser gelöst und wieder mit 2-Propanol gefällt und zentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wird mehrfach wiederholt, bis kein freies FITC mehr gelöst vorliegt und der Überstand keine Gelbfärbung mehr aufweist.

Synthese von FITC-DexBMA

Für die Funktionalisierung von 40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ (510 mg) wird bis zum Reinigungsschritt gleich verfahren wie bei FITC-6kDex$MA_{0,49}$. Die Aufreinigung des Produkts unterscheidet sich in den verwendeten Lösemitteln. Das FITC-40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ wird in 2-Propanol gefällt und zentrifugiert (20 min @ 14000 1/min). Das Präzipitat wird in Aceton aufgenommen und mit Wasser ausgefällt und zentrifugiert; dieser Schritt wird solange wiederholt, bis keine Färbung des Überstands mehr zu erkennen ist.

Bestimmung der HLB-Werte

Zur Berechnung der HLB-Werte wird die Methode nach Davies[107] angewendet. Dabei werden den funktionellen Gruppen einer Verbindung Inkremente zugeordnet, diese sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Die Anzahl der Gruppen wird mit dem jeweiligen Inkrement multipliziert und daraus nach Gleichung (2-1) der HLB-Wert berechnet.

Tabelle 4-1 Inkremente für die Berechnung der HLB-Werte[107].

Hydrophile Inkremente		Hydrophobe Inkremente	
-O- (Ether)	1,3	=CH-	0,475
-OH	1,9	-CH3	0,475
COOR	2,4	-Phenyl	1,662
		-CH2-	0,475
		-CH-	0,475

4.2. Herstellung der Dispersionen mithilfe des Ouzo-Effekts

4.2.1. Allgemeines Verfahren

Zur Herstellung der Dispersionen mittels des Ouzo-Effekts kann man aus zwei Möglichkeiten wählen: zum einen kann die Polymerlösung in die wässrige Phase eingetropft werden, zum anderen kann das Zutropfen der wässrigen Phase zur Polymerlösung erfolgen. In beiden Fällen wird eine Polymerlösung mit definierter Konzentration hergestellt. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

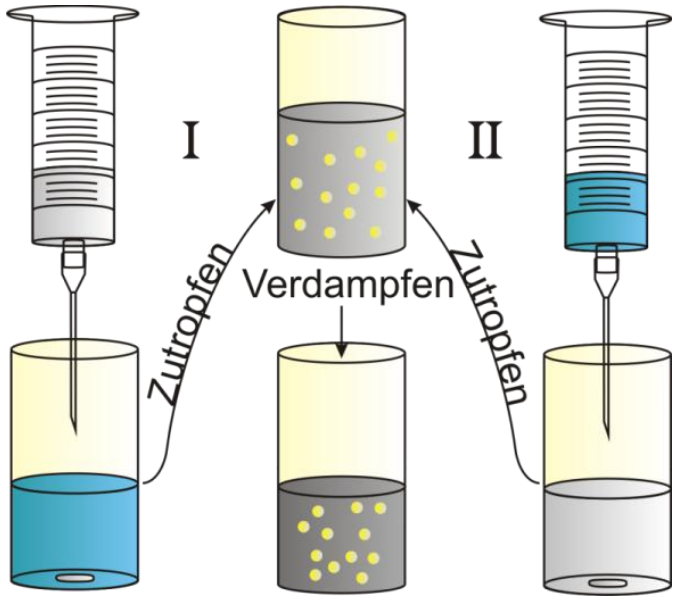


Abbildung 4-1 **Schematische Darstellung der Herstellung einer Dispersion mithilfe des Ouzo-Effekts. Der Weg I beschreibt die Herstellung durch das Zutropfen von acetonischer Lösung ins Wasser. Der Weg II beschreibt den umgekehrten Fall – Wasser in acetonische Lösung. Als letzter Schritt wird das Aceton verdampft.**

Wie Abbildung 4-1 zeigt, wird im ersten Fall die kontinuierliche Phase in einem Septen-Schraubdeckelglas vorgelegt und stark gerührt. Die hergestellte Polymerlösung wird tropfenweise über eine Spritze in die wässrige Phase eingetropft. Im zweiten Fall wird die Polymerlösung in einem Septen-Schraubdeckelglas vorgelegt und die spätere kontinuierliche Phase, das Wasser,

tropfenweise zugegeben. Anschließend erfolgt das Entfernen des Acetons bei 40 °C in einem Thermoschüttler. Die Partikelgröße wird in Wasser mittels PCCS gemessen.

4.2.2. Bestimmung des Ouzo-Bereichs

Für die Eingrenzung des Ouzo Bereichs wird ein Phasendiagramm erstellt. Dazu werden 30 ml unterschiedlich konzentrierter Stammlösungen der Polymere 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$, 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ hergestellt und unterschiedliche Volumina (20, 100, 250, 500 µl, 1, 2, 3, 5, 7 und 10 ml) in je 5 g Wasser eingetropft. Die Konzentrationen sind in Tabelle 4-2 verzeichnet.

Tabelle 4-2 Konzentration der Polymerlösungen für die Bestimmung des Ouzo-Bereichs.

	40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ [gew%]	40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ [gew%]	500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ [gew%]
1	0,003	0,002	0,006
2	0,04	0,02	0,05
3	0,10	0,10	0,10
4	0,27	0,99	1,02
5	0,50	2,02	2,98
6	1,00	2,67	4,05
7	2,53	3,95	
8	4,48		

4.2.3. Variation der Zutropfgeschwindigkeit

Für die Herstellung der Dispersionen wird eine Stammlösung von 40kDexB$_{1,21}$MA$_{0,23}$ (2,01 Gew.-%) in Aceton (20 g) hergestellt. Es werden jeweils 2,5 g dieser Lösung mit unterschiedlichen Zutropfgeschwindigkeiten (0,1, 0,2, 0,5, 2 ml/min) mittels einer Spritzenpumpe und mit etwa 30 ml/min durch manuelles, schnelles Zugeben der Lösung zu jeweils 5 g Wasser zugegeben. Die Partikelgröße wird in Wasser mittels PCCS gemessen.

4.2.4. Quervernetzung der DexBMA-Partikel in Dispersion

Für die Quervernetzung wird eine 0,2 gew.-%ige Lösung des UV-Initiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in Aceton als Lösemittel für das Polymer verwendet. Es werden je 2,5 g Lösung aus 40kDexB$_{1,46}$MA$_{0,14}$ (4,01 Gew.-%), 40kDexB$_{1,44}$MA$_{0,24}$ (3,93 Gew.-%) und 40kDexB$_{1,48}$MA$_{0,51}$ (3,97 Gew.-%) hergestellt. Die Dispersionen werden, wie oben beschrieben, hergestellt, indem die Lösungen in jeweils 5 g MilliQ Wasser zugetropft werden, und werden in ein verschließbares Quarzgefäß überführt. Die Radikalbildung erfolgt durch Bestrahlung der gerührten Dispersion im Quarzgefäß mit einer Hochdruck-Quecksilber-UV-Lampe (100 W) mit einem Primärsignal bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm. Die Reaktion wird nach 2 h gestoppt. Die Partikelgrößen werden in Wasser und Ethanol mittels PCCS vermessen. Aus dem Verhältnis der Partikelgrößen im gequollenen (Ethanol) und im ungequollenen Zustand (Wasser) wird der Quellgrad bestimmt. Weiterhin wird der Sol/Gel-Gehalt bestimmt. Dazu werden die Partikel aus der Dispersion abzentrifugiert und mit Aceton redispergiert, um die noch löslichen Bestandteile herauszulösen. Dieser Schritt wird mehrmals wiederholt, die acetonischen Überstände werden gesammelt und getrocknet gewogen. Das durch die Zentrifugation sedimentierte vernetzte Polymer wird nach den Waschschritten ebenfalls gewogen. Aus dem Verhältnis der beiden Einwaagen kann der Sol/Gel-Gehalt bestimmt werden.

4.2.5. Herstellung von Hydrogelpartikeln mittels polymeren Ouzo-Effekts

Das Dextranderivat, 40kDexMA$_{0,10}$, wird in verschiedenen Konzentrationen (0,04, 0,39, 0,81, 1,98 und 3,96 Gew.-%) in 2,5 ml MiliQ Wasser gelöst. Für die Herstellung der Dispersionen werden 5 g einer 0,2 gew-%igen Lösung des UV-Initiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in Aceton zu den wässrigen Lösungen des Polymers zugetropft. Zur Quervernetzung der Polymere im Partikel füllt man die Dispersion in ein Quarzgefäß, dieses wird anschließend mit einer Hochdruck-

Quecksilberdampf-Lampe (100 W) mit einem Primärsignal bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm mit UV-Strahlung für 30 min behandelt. Das Aceton wird aus dem Gemisch entfernt und die Partikelgrößen in Dispersion mittels PCCS bestimmt. Es werden REM-Bilder aufgenommen, um die Partikel im getrockneten Zustand zu untersuchen.

4.2.6. Einkapselung von Farbstoffen mittels Ouzo-Effekt

Für die Einkapselung des Fluoreszenzfarbstoffes BODIPY B-612 MA in die Partikel wurde der Farbstoff mit in einer Konzentration von 1,9 x10^{-8} mol/g in Aceton gelöst. Weiterhin wird hierfür dem 40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ ein Anteil von 2% des markierten FITC-40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ beigemengt und dieses Gemisch in 1 g Aceton gelöst. Die Anteile der beiden floureszenten Verbindungen werden immer gleich gehalten. Die Einwaagen sind in Tabelle 4-3 dargestellt. Die Konzentrationen der Polymerlösungen sind: 0,42, 1,01, 2,03 und 3,02 Gew-%. Die Lösungen der beiden Komponenten werden, analog zu Kapitel 4.2.1, zu 2 g wässriger Phase zugetropft und damit die Dispersionen hergestellt. Die Partikelgrößen der Dispersionen wurden mittels PCCS vermessen. Die FCS-Messungen wurden an einem handelsüblichen Aufbau von Carl Zeiss bestehend aus dem Modul ConfoCor 2 und einem inversen Mikroskop, Modell Axiovert 200 durchgeführt. Die Fluorophore wurden entweder durch einen Argon-Laser bei 488 nm oder durch einen HeNe-Laser bei 633 nm angeregt. Für jede Dispersion wurden je 10 Messungen mit einer Gesamtdauer von 5 min durchgeführt. Die Diffusionskoeffizienten und damit die hydrodynamischen Radien werden aus den Fits der Autokorrelationskurven nach Gleichung 4-1 bestimmt:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N}\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}\left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_D}\right)^{-1/2} \qquad (4\text{-}1)$$

N mittlere Anzahl Fluorophore in einem Volumen V
τ_D laterale Diffusionszeit
$S=z_0/\omega_0$ Verhältnis axialer zu radialer Dimension von V.

Der Diffusionskoeffizient *D* der Fluorophore wurde nach Gleichung 4-2 bestimmt und aus diesem der hydrodynamische Radius R_h nach der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 3-2):

$$D = \omega_0^2 / 4\tau \qquad (4\text{-}2)$$

Die Kalibrierung des konfokalen Observationsvolumens wurde mit Referenzfarbstoffen mit bekannten Diffusionskoeffizienten (Rh6G and Alexa 647) durchgeführt.

Tabelle 4-3 Einwaagen für die fluoreszenzmarkierten Dispersionen.

	3,02%	2,03%	1,01%	0,42%
2% FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$	30,3 mg	20,3 mg	10,1 mg	4,2 mg
Aceton p.A.		331,7 mg	724,5 mg	885,9 mg
BODIPY-Lsg in Aceton	1015,5 mg	680,0 mg	886,0 mg	135,6 mg
H_2O	2,010g	2,008g	2,035 g	2,022 g

4.3. DexMA als Stabilisator

Es werden je 4 g einer wässrigen Lösung von 6kDexMA$_{0,20}$ in 4 Konzentrationen hergestellt, dazu werden jeweils 0,5 g Styrol, 17 mg Hexadekan und 10 mg V59 zugegeben und eine Stunde unter Rühren bei RT vordispergiert. (Tabelle 4-4). Die Emulsion wird mit einem Branson Sonifier W450 digital ($^1/_4$-Zoll-Spitze) für 2 min unter Eisbadkühlung behandelt und anschließend 12 h bei 80 °C gerührt. Partikelgrößen werden mittels PCCS gemessen und REM-Aufnahmen gemacht.

Tabelle 4-4 Einwaage für die Miniemulsion.

	3,5%	5%	7%	10%
Wasser	4,0047 g	4,0051 g	4,0051 g	4,0151 g
$6kDexMA_{0,20}$	17,7 mg	26,1 mg	35,5 mg	50,8 mg
Styrol	534,0 mg	508,2 mg	511,6 mg	523,7 mg
Hexadekan	17,7 mg	16,3 mg	17,8 mg	17,2 mg
V 59	10,2 mg	10,4 mg	10,5 mg	10,6 mg

4.4. Enzymatische Veresterungen in wässriger Umgebung

Für die Herstellung der Miniemulsionen werden 5 g äquimolarer Mischungen von Nonansäure und 3-Phenylpropanol mit einem Anteil von Hexadekan von 4 Gew.-% in 25 g 2 gew.-%iger Lösung Lutensol AT50 über 1 h voremulgiert. Die Emulsion wird mit einem Branson Sonifier W450 digital ($^1/_4$-Zoll-Spitze) für 2 min Gesamtschallzeit mit der Sequenz 5 s Puls, 5 s Pause unter Eisbadkühlung behandelt. Dieser Schritt entfällt bei der Herstellung der Emulsion, die als Vergleich zur Miniemulsion hergestellt wird.

Für die Herstellung der Miniemulsionen zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit und tensidfreien Stabilisierung wird die Lutensol AT50-Lösung anstelle von reinem Wasser mit einer 0,1 M-NaOH Lösung hergestellt und zum anderen anstatt der Lutensol AT50-Lösung eine 0,1 M NaOH-Lösung verwendet. Zu 20 ml dieser Miniemulsionen werden 20 mg Lipase PS zugesetzt und in einen Thermoschüttler (PLS 4x4 Advanced ChemTech) bei 40 °C und 400 rpm für 24 h geschüttelt.

Für die Untersuchungen des Einflusses von Substratüberschüssen von entweder Nonansäure oder 3-Phenylpropanol werden die Einwaagen aus Tabelle 4-5 verwendet.

Tabelle 4-5 Ansatzgrößen für die Untersuchung des Einflusses der Substratüberschüsse.

	10 x Alkohol	5 x Alkohol	10x Säure	5X Säure
Nonansäure	0,520 g	0,943 g	4,602 g	4,272 g
3-Phenylpropanol	4,428 g	4,071 g	0,394 g	0,794 g
2 gew%ige Lutensol AT50- Lsg.	25,01 g	25,00 g	25,02 g	25,00 g
Hexadekan	202 mg	0,202 g	0,200 g	0,200 g
Lipase PS	20 mg	20 mg	20 mg	20 mg

4.5. Probenvorbereitung

4.5.1. REM-Aufnahmen

Die Aufnahmen sind mit einem Rasterelektronenmikroskop (Leo Gemini 1530, Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 0,2 kV durchgeführt worden. Für die Präparation wurden die Dispersionen im Verhältnis 1:1000 mit Wasser verdünnt, 2 µL der verdünnten Dispersion wurden auf einen Silicon-Wafer gebracht und an Luft getrocknet.

4.5.2. PCCS-Messungen

Ein Tropfen der Dispersion wird mit 2 ml Wasser verdünnt und mit dem Nanophox-Photonkreuzkorrelationssensor (Sympatec GmbH) mit einem HeNe-Laser (λ = 632,8 nm) bei einem Streuwinkel von 90° bei einer Temperatur von 25 °C vermessen. Der x_{50}-Wert, der aus drei gemittelten Messzyklen berechnet wird, ist dabei der später angegebene Partikeldurchmesser d_{PCCS}. Dieser bedeutet, dass 50% der Partikel kleiner sind als der angegebene Wert. Als Auswertealgorithmus wird die Auto-NNLS-Methode des Geräteherstellers verwendet.

4.5.3. Bestimmung der Oberflächenspannung der DexMA-Lösungen

Für die Bestimmung der Oberflächenspannung wird 6kDexMA$_x$ mit vier verschiedenen Substitutionsgraden (x=0,09, 0,16, 0,29 und 0,46) in MilliQ-Wasser über Nacht gelöst. Es werden je vier Konzentrationen eingestellt (1, 2, 3 und 5 Gew.-%) und an einem Ringtensiometer DCAT 21 (dataphysics) bei 20 °C unter Verwendung eines Du Noüy-Rings mit einem Durchmesser von 4,85 mm und einem Drahtdurchmesser von 0,15 mm durchgeführt.

4.5.4. HPLC-Analytik

Für die HPLC-Analytik sind die Probennahmezeitpunkte 20 min, 40 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h und 24 h, dabei werden 10 µL Aliquote der Reaktionsmischung in 1 ml Acetonitril/Wasser-Mischung (90:10) gegeben. Die Eluentenzusammensetzung ist ebenfalls Acetonitril/Wasser (90:10) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die chromatographische Säule ist eine reversed phase C-18 (nucleosil 120-5 C180) von Macherey-Nagel. Der verwendete Detektor ist ein UV-Detektor UVD 170 U von Dionex. Die Umsätze werden aus den Peakflächen im Chromatogramm nach berechnet.

4.6. Verwendete Chemikalien

Dextran aus *leuconostoc mesenteroides* (35-40 kg/mol und 500 kg/mol) und aus *leuconostoc ssp.* (6 kg/mol), DMF p.a., 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon, Aceton p.a., 2-Propanol p.a., 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluol (BHT), Fluorescein-5 (6)-isothiocyanat-Isomerengemisch >90%, Dibutylzinnlaurat 95% (Sigma Aldrich); Benzoesäureanhydrid 98%, Triethylamin 99% (Acros); Kartoffelstärke und Methacrylsäureanhydrid 94% (Fluka), Hexansäureanhydrid 99% (Alfa Aesar) und LiCl (Carl Roth) wurden für die Synthesen verwendet. Pullulan wurde von der Firma Hayashibara Co., Ltd., Japan zur Verfügung gestellt. Der Farbstoff

„BODIPY B-612 MA“ (siehe Abbildung 4-2) wurde von Andrey Turshatov synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

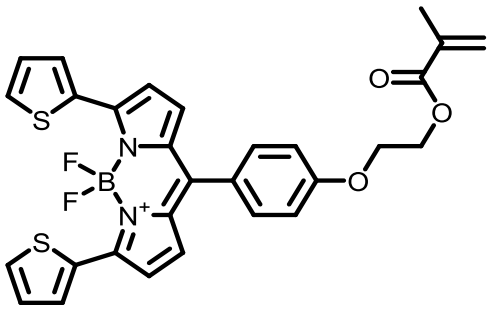


Abbildung 4-2 Strukturformel BODIPY B-612 MA.

Alle Chemikalien wurden ohne weiteren Aufreinigungsschritt verwendet. Zur Herstellung der Nanopartikel wurde MilliQ-Wasser verwendet.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Funktionalisierung von Polysacchariden

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Polysaccharide gewählt, da deren physikalische Eigenschaften, besonders die Hydrophilie, auch bei unterschiedlichen Molekulargewichten ähnlich sind, durch chemische Modifikation aber auch gezielt verändert werden können. Dies bietet eine versatile Plattform für die später in der Arbeit vorgestellten Versuchsreihen. Dazu wurden zwei Möglichkeiten der Modifizierung von Polysacchariden verfolgt: zum einen wird die Einführung von funktionellen Gruppen durchgeführt, im Speziellen werden kurzkettige polymerisierbare Gruppen verwendet, wobei die Hydrophilie des Polymers bei niedrigem Substitutionsgrad nur wenig verändert wird und die Wasserlöslichkeit weiterhin erhalten bleibt. Zum anderen erfolgt eine starke Reduzierung der Hydrophilie mithilfe von hydrophoben Reagenzien. Letztere Route war aufgrund der hohen Löslichkeit der Polysaccharide in Wasser als ein Lösungsansatz gewählt worden, um die Partikelherstellung in wässrigem Milieu überhaupt zu ermöglichen. Bei wasserlöslichen Polymeren würde sich ein unvernetzter Partikel in einer bestimmten Zeit wieder auflösen. In beiden Fällen werden die stark zur Hydrophilie beitragenden OH-Gruppen der Polymere zur Reaktion gebracht. Wie im Theorieteil der Arbeit beschrieben, gibt es mehrere Methoden, dies zu erreichen. Aus der Vielzahl der Methoden wurde bei dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf die Veresterung der funktionellen Gruppen gelegt. Diese Reaktion ist einfach und schnell in der Durchführung, leicht steuerbar und bedarf keiner Aufreinigung oder Trocknung der Edukte. Die Reaktion wurde in DMF, einem hydrophilen aprotischen Lösemittel, durchgeführt. Hierbei wurden die Hydroxylgruppen unter Triethylamin-Aktivierung mit Anhydriden organischer Säuren umgesetzt. Die Anhydride weisen Reste mit unterschiedlichen Funktionalisierungen auf, dadurch ist es möglich, Derivate mit unterschiedlichen Substituenten herzustellen. Es wurden Polysaccharid-Derivate mit

Methacrylsäureanhydrid und als hydrophobes Mischderivat mit zusätzlich Benzoesäureanhydrid bzw. Hexansäureahydrid hergestellt.

5.1.1. Analyse und Charakterisierung

Das erhaltene modifizierte Polysaccharid wird mittels Lösungs-^{1}H-NMR-Spektroskopie analysiert und charakterisiert. Die für die Auswertung verwendeten Signale müssen sowohl charakteristisch für den Substituenten als auch für die Polysaccharid-Hauptkette sein. Hierfür eignen sich die anomeren Protonen der Polysaccharide als Referenz zu den jeweiligen Signalen der Substituenten. Dadurch kann der Substitutionsgrad (im Folgenden auch „Degree of Substitution“ kurz DS genannt) durch das Verhältnis der Integrale der charakteristischen Signale bestimmt werden. Die zur Auswertung verwendeten Protonen sind in Abbildung 5-1 farblich markiert dargestellt.

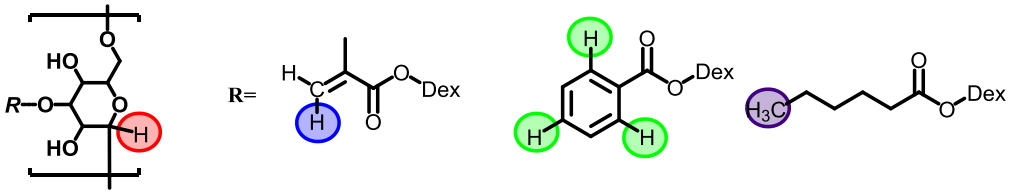


Abbildung 5-1 **Charakteristische Protonen für die Auswertung der ^{1}H-NMR-Spektren zur Bestimmung des Substitutionsgrades (rot unterlegt – anomeres Proton des Dextran; blau unterlegt – olefinisches Proton des Methacrylatrestes; grün unterlegt – aromatische Protonen in ortho und para-Stellung des Benzoatrestes; lila unterlegt – Methylgruppe des Hexanoatrestes).**

Wie in Abbildung 5-1 gezeigt, werden folgende Signale zur Auswertung verwendet: Das anomere Proton des Dextrans, welches bei 4,89 ppm (rot unterlegt) detektiert wird, wird jeweils im Verhältnis zu den Substituenten gesetzt. Die Signale für die Charakterisierung sind im Fall von Dextrylmethacrylat (DexMA) das olefinische Proton bei 6,24 ppm in D_2O (blau unterlegt) und 6,17 ppm in DMSO-d6. Für die heterosubstituierten Polysaccharide, wie Dextrylbenzoatmethacrylat (DexBMA),

werden zusätzlich noch die drei aromatischen Protonen in *para*- und *ortho*-Stellung zur Carboxylgruppe im Bereich von 7,73-7,35 ppm und bei Dextrylhexanoatmethacrylat (DexHMA) die drei Protonen der Methylgruppe des Hexanoats im Bereich von 0,9 ppm verwendet. Die typischen ^{1}H-NMR-Spektren folgender Verbindungen sind dargestellt: DexMA in Abbildung 5-2, DexBMA in Abbildung 5-3, und DexHMA in Abbildung 5-4. Die Signale zur Auswertung und die Auswertemethode gelten ebenso für die Charakterisierung von Stärke und Pullulanderivaten.

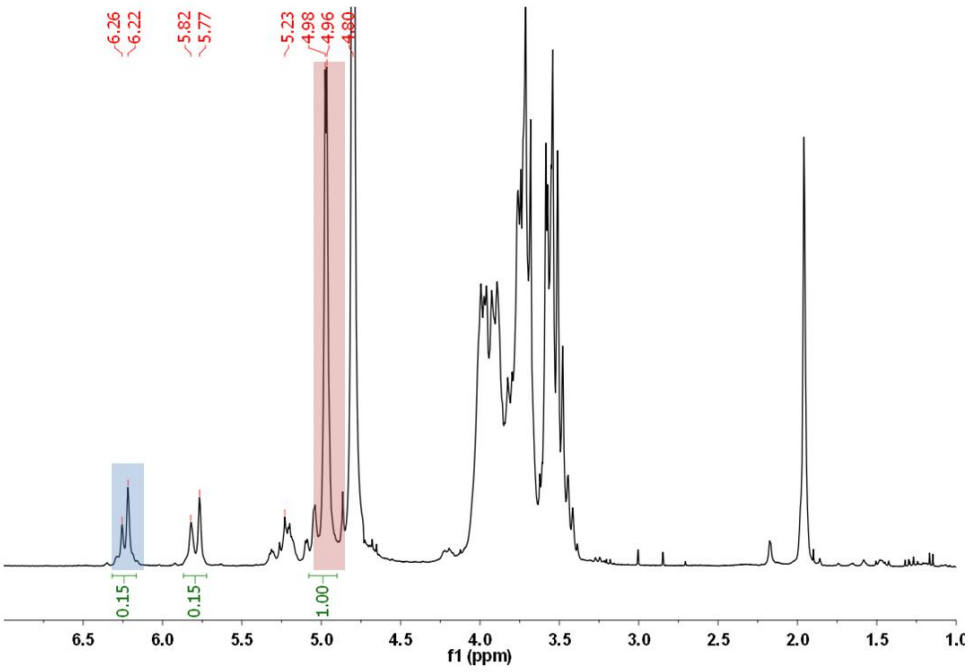


Abbildung 5-2 **^{1}H-NMR-Spektrum von DexMA in D_2O mit dem Substitutionsgrad 0,15 für Methacrylsäurereste (blau unterlegt olefinische Protonen der Methacrylats rot unterlegt anomere Protonen des Dextrans).**

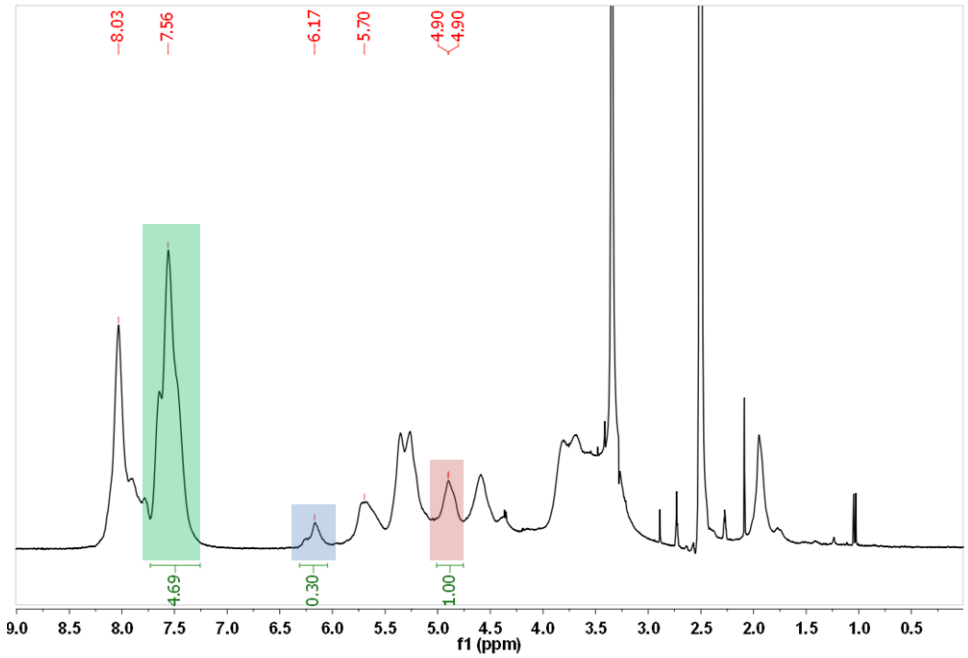


Abbildung 5-3 **^{1}H-NMR-Spektrum von DexBMA in DMSO-d_6 mit dem Substitutionsgrad 0,17 für Methacrylsäure und 1,56 für Benzoesäure (blau unterlegt olefinische Protonen der Methacrylats, grün unterlegt aromatische Protonen in *o*- und *p*-Stellung des Benzoats und rot unterlegt anomere Protonen des Dextrans).**

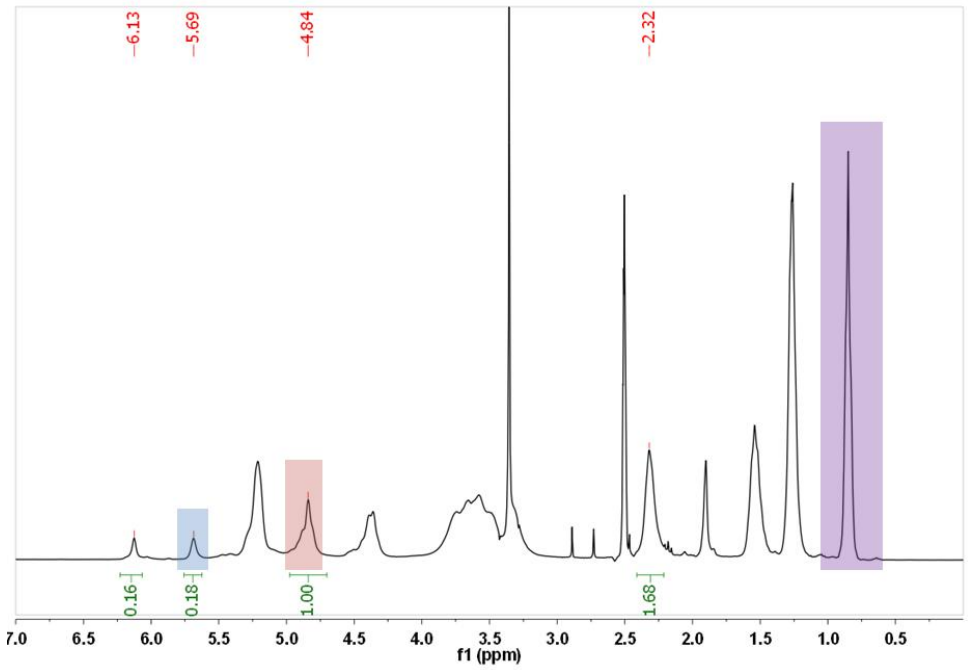


Abbildung 5-4 **^{1}H-NMR-Spektrum von DexHMA in DMSO-d_6 mit dem Substitutionsgrad 0,18 für Methacrylsäure und 0,80 für Hexansäure (blau unterlegt olefinische Protonen der Methacrylats, violett unterlegt Protonen des Methylrests des Hexanoats und rot unterlegt anomere Protonen des Dextrans).**

Zur Berechnung der Substitutionsgrade werden die Integrale (*A*) der charakteristischen Peaks miteinander, wie in den Gleichungen (5-1 bis 5-3) dargestellt, ins Verhältnis gesetzt. Die unten aufgeführten Gleichungen repräsentieren die Berechnungen für die jeweils fett geschriebenen Substituenten (MA - Methacrylat; B – Benzoat; H – Hexanoat). Für die in Abbildung 5-2 dargestellte Verbindung ergibt sich folgende Kalkulation:

$$DS\ Dex\mathbf{MA} = \frac{A\ olefinisch\ @6{,}2ppm}{A\ anomer\ @4{,}9ppm} = \frac{0{,}15}{1{,}00} = 0{,}15 \quad (5\text{-}1)$$

Für die in Abbildung 5-3 dargestellte Verbindung berechnet sich der Substitutionsgrad nach:

$$DS\ DexB\mathbf{MA} = \frac{A\ olefinisch\ @6{,}2ppm}{A\ anomer\ @4{,}9ppm} = \frac{0{,}17}{1{,}00} = 0{,}17$$

$$DS\ Dex\mathbf{B}MA = \frac{A\ aromatisch\ @7{,}6ppm}{3{*}A\ anomer\ @4{,}9ppm} = \frac{4{,}35}{3{*}1{,}00} = 1{,}45 \quad (5\text{-}2)$$

Für die in Abbildung 5-4 dargestellte Verbindung berechnet sich der Substitutionsgrad nach:

$$DS\ DexH\mathbf{MA} = \frac{A\ olefinisch\ @6{,}2ppm}{A\ anomer\ @4{,}9ppm} = \frac{0{,}17}{1{,}00} = 0{,}18$$

$$DS\ Dex\mathbf{H}MA = \frac{A\ CH_3\ @0{,}85ppm}{3{*}A\ anomer\ @4{,}9ppm} = \frac{2{,}40}{3{*}1{,}00} = 0{,}80 \quad (5\text{-}3)$$

Die sich aus den Gleichungen ergebenden Substitutionsgrade (DS) werden als tiefgestellte Zahl in die Nomenklatur der Verbindungen mit eingebunden. In den oben genannten Beispielen wären es damit $DexMA_{0,15}$, $DexB_{1,45}MA_{0,17}$ und $DexH_{0,80}MA_{0,18}$. Bei unterschiedlichen Molekulargewichten wird dieses als Präfix vor dem eigentlichen Namen der Verbindung gesetzt, z.B. für die Derivate von Dextran mit einem M_W von etwa 40 000 g/mol wird 40k und bei 500 000 g/mol wird 500k als Präfix benutzt. Somit ergeben sich dann beispielsweise Namenskonstrukte wie $40kDexB_{1,11}MA_{0,16}$. Die Derivate von Stärke und Pullulan werden ebenfalls nach

dieser Nomenklatur benannt. Anstelle des Kürzels Dex werden Die Kürzel „Sta“ für Stärke und „Pull“ für Pullulan verwendet. Die an der Stelle eingeführte Nomenklatur wird im Weiteren als Standardnomenklatur zur Benennung der Substanzen verwendet.

5.1.2. Einstellung des Substitutionsgrades

Wie in Punkt 5.1 erwähnt, ist die gezielte Modifikation der Polysaccharide ein entscheidender Faktor, um die Eigenschaften des Polymers zu beeinflussen und einzustellen. In diesem Abschnitt werden die Reaktionen, die zu dieser gezielten Manipulation des Polymers führen, systematisch untersucht. Dazu werden Versuchsreihen durchgeführt, um die Abhängigkeit des Substitutionsgrades vom Verhältnis des Anhydrids zum Dextran zu untersuchen. Hierzu werden die Verhältnisse Anhydrid/OH-Dextran variiert und dadurch Derivate unterschiedlichen Substitutionsgrades hergestellt: diese werden mittels ^{1}H-NMR charakterisiert und nach der in Kapitel 5.1.1 vorgestellten Methode ausgewertet. Dabei werden im Speziellen die Veresterung mit Methacrylsäureanhydrid, welches später als Vernetzungspunkt dienen soll, und den beiden Hydrophobisierungsreagenzien Benzoesäureanhydrid und Hexansäureanhydrid untersucht. In Abbildung 5-5 ist die Abhängigkeit des Substitutionsgrades vom eingesetzten molaren Anhydrid/OH-Dextran-Verhältnisses graphisch dargestellt.

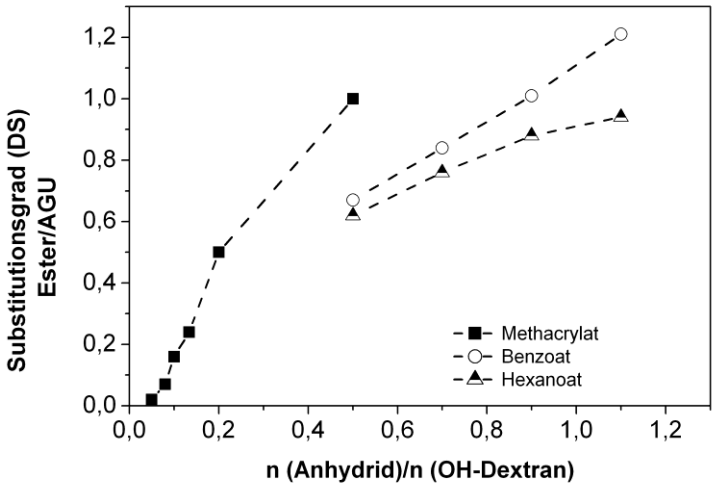


Abbildung 5-5 **Abhängigkeit des Substitutionsgrades (Verhältnis von Ester/Anhydroglucose-Einheiten) vom molaren Verhältnis Anhydrid/OH-Dextran. Gefüllte Vierecke stehen für Methacrylat, offene Kreise für Benzoat und halbvolle Dreiecke für Hexanoat.**

In Abbildung 5-5 wird die Abhängigkeit des Substitutionsgrades vom molaren Verhältnis Anhydrid/OH-Gruppen des Dextran für die drei verwendeten Anhydride ersichtlich. Es wird angenommen, dass jede Anhydroglucopyranose-Einheit (AGU) 3 OH-Gruppen trägt. Aus den Kurvenverläufen wird ersichtlich, dass der Substitutionsgrad, wie erwartet, im untersuchten Bereich linear von diesem Verhältnis abhängt. Allerdings sind für die unterschiedlichen Anhydride auch unterschiedliche Steigungen zu beobachten. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass die Werte für den Substitutionsgrad des Benzoats und des Hexanoats die jeweils zweite Stufe einer zweistufigen Reaktion darstellen. Das bedeutet, die hier erhaltenen Werte beruhen auf der Reaktion von einem 40kDexMA$_{0,20}$-Derivat mit der jeweiligen Menge an Anhydrid, was durchaus die Reaktivität dieser Zwischenstufe beeinflussen kann.

Dies konnte durch eine zusätzlich durchgeführte Versuchsreihe gezeigt werden. Dazu wird DexMA mit einem höheren (0,4) und einem niedrigeren (0,1) Substitutionsgrad hergestellt und weiter mit unterschiedlichen Verhältnissen Benzoesäureanhydrid zu Dextran umgesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-6 dargestellt.

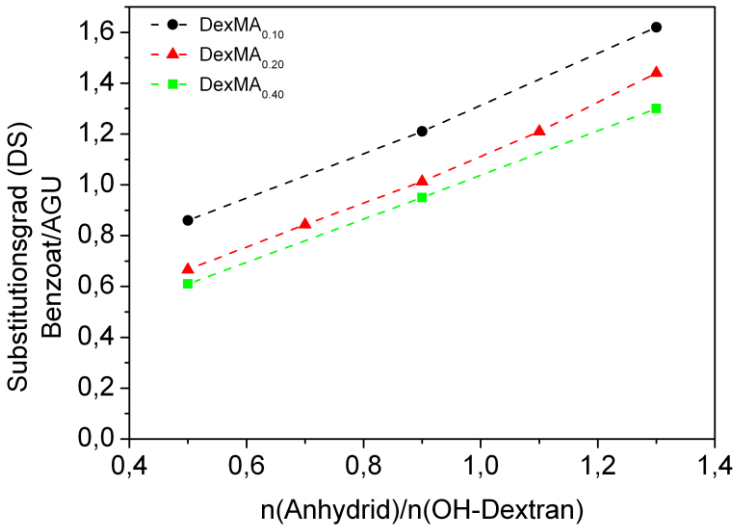


Abbildung 5-6 **Substitutionsgrad der Dextrane mit Benzoat-Resten in Abhängigkeit vom Ausgangs-Substitutionsgrad (schwarze Kreise - 40kDexMA$_{0,10}$ rote Dreiecke - 40kDexMA$_{0,20}$ und grüne Quadrate - 40kDexMA$_{0,40}$) und dem molaren Verhältnis Benzoesäureanhydrid zu Dextran.**

Die in Abbildung 5-6 gezeigten Substitutionsgrade weisen alle wiederrum eine lineare Abhängigkeit vom Verhältnis Anhydrid/Dextran auf. Die Steigungen der drei Kurven sind allerdings unterschiedlich (siehe auch Tabelle 5-1). Daraus lässt sich schließen, dass eine zweite Modifikation des Polymers vom Substitutionsgrad des bereits modifizierten Ausgangspolymers abhängt. Der Substitutionsgrad der Zweitreaktion mit Benzoesäureanhydrid im Fall von 40kDexMA$_{0,10}$ ist beispielsweise bei einem Verhältnis Anhydrid/Dextran von 0,9 mit 1,21 deutlich höher als der für 40kDexMA$_{0,40}$ mit 0,95. Das bedeutet, dass je höher der Substitutionsgrad nach der ersten Modifikation ist, desto weniger der zweite Substituent eingebaut wird.

Weiterhin ist aber auch zu berücksichtigen, dass sowohl das Benzoesäureanhydrid als auch das Hexansäureanhydrid sterisch anspruchsvoller sind als das deutlich kleinere Methacrylsäureanhydrid; dies kann ebenfalls zur Absenkung der Reaktivität durch verminderte Erreichbarkeit des Reaktionsorts führen. Trotzdem lässt sich für alle durchgeführten Substitutionen ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verhältnis Anhydrid/Dextran erkennen, wonach die genaue Einstellung eines Substitutionsgrads möglich ist. Diese Erkenntnis ist wichtig, da nun der gewünschte

Substitutionsgrad allein durch das richtige molare Verhältnis Anhydrid/OH-Gruppen eingestellt werden kann. In Gleichung (5-4) ist die Berechnungsgrundlage für die Einstellung des Substitutionsgrades mithilfe der molaren Verhältnisse abgebildet:

$$\mathrm{DS} = a\frac{n(Anhydrid)}{n(OH-Dextran)} + b \qquad (5\text{-}4)$$

Die Steigung *a* und der Achsabschnitt *b* lassen sich aus Abbildung 5-5 bestimmen und sind für die drei verwendeten Anhydride in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 5-1 Werte für die Berechnung, zur Einstellung des benötigten Substitutionsgrades.

	a	B
Methacrylsäureanhydrid	2,067	0,03
Benzoesäureanhydrid		
bei DS MA 0,1	1,025	0,28
bei DS MA 0,2	0,955	0,17
bei DS MA 0,4	0,875	0,17
Hexansäureanhydrid bei DS MA 0,2	0,354	0,42

Wie oben beschrieben, lassen sich durch das Einsetzen der Werte *a* und *b* die molaren Verhältnisse berechnen, die notwendig sind, um einen bestimmten Substitutionsgrad eines der in Tabelle 1 dargestellten Substituenten zu erhalten. Ein weiterer Einflussfaktor, der bei diesen Reaktionen untersucht wird, ist die Menge Triethylamin, welches als Aktivator-Base fungiert. In der Veröffentlichung von Kim et al.[108] wird davon berichtet, dass die zugesetzte Menge NEt_3 den Substitutionsgrad stark beeinflusst, der Effekt wird jedoch nur bis zu einem Gehalt von 10 mol-%, im Verhältnis zum Methacrylsäureanhydrid, untersucht. Geht man jedoch weit über diesen Wert hinaus bis zur äquimolaren Menge, dann erzielt man deutlich höhere Substitutionsgrade als von Kim et al. publiziert. In Abbildung 5-7 ist der Unterschied graphisch dargestellt.

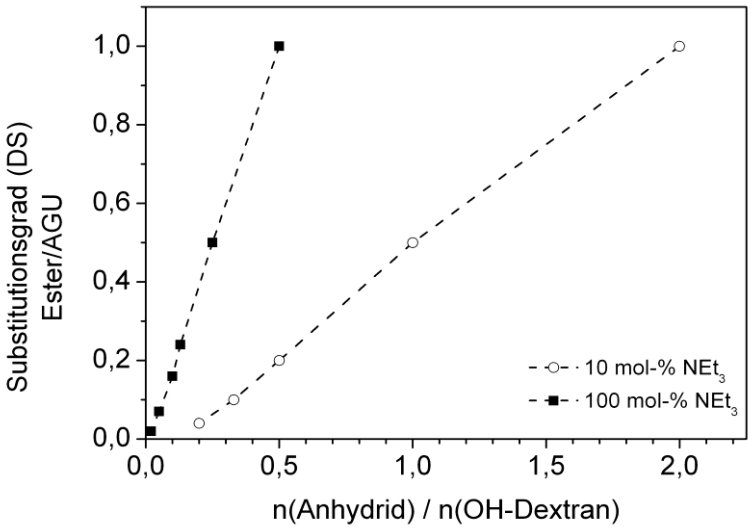


Abbildung 5-7 **Abhängigkeit des Substitutionsgrades, bei der Reaktion Methacrylsäureanhydrid mit Dextran vom Zusatz an NEt_3, leere Kreise beschreiben den Substitutionsgrad bei 10 mol-% Triethylamin und gefüllte Vierecke den bei 100 mol-%.**

Die beiden in Abbildung 5-7 dargestellten Kurven zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen molarem Verhältnis Methacrylsäureanhydrid/OH-Dextran und dem Substitutionsgrad, jedoch wird bei Betrachtung der beiden Steigungen deutlich, dass die Substitutionsgrade für 100 mol-% Triethylamin bei gleichem Verhältnis Anhydrid/OH-Dextran deutlich höher sind. So lässt sich beim äquimolaren Zusatz bei einem Verhältnis von 0,5 bereits ein Substitutionsgrad von 1,0 erreichen, wohingegen bei 10 mol-% lediglich 0,22 erreicht werden. Die Steigungen *a* für die Kurven unterscheiden sich um einen Faktor vier. Das bedeutet, dass die Ausbeute, allein durch die Zugabe von mehr Triethylamin um den Faktor vier erhöht werden kann und somit viel weniger Anhydrid für das Erreichen des gleichen Substitutionsgrades benötigt wird. Zudem lässt sich die Reaktionszeit von 10 h auf etwa 2 h senken. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die höhere Menge an NEt_3, welches als Base fungiert, die OH-Gruppen des Dextrans deprotoniert und somit den nukleophilen Angriff der deprotonierten Hydroxylgruppe häufiger ermöglicht und damit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Die überschüssige Menge NEt_3 wird bei der Aufarbeitung entfernt und stört nicht in der weiteren Verwendung. Daher wurden alle Reaktionen mit einem äquimolaren Zusatz an Triethylamin durchgeführt.

5.2. Polymerer Ouzo-Effekt

5.2.1. Herstellung von Polymerdispersionen mittels polymeren Ouzo Effekts

Der Begriff polymerer Ouzo-Effekt wurde bereits im Theorieteil besprochen. Kurz zusammengefasst lässt er sich als Phasenseparation im nm-Bereich aufgrund der Zugabe eines Nichtlösemittels zu einer Polymerlösung beschreiben. Dies kann mit hydrophoben und amphiphilen Polymeren, die in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösemittel gelöst sind, beobachtet werden. In dieser Arbeit geht es darum, eine flexible Plattform zur Untersuchung dieses Effekts zu etablieren und diesen Effekt für die Herstellung von Nanopartikeln zu nutzen. Dazu werden, wie im Kapitel zuvor beschrieben, hydrophobe Derivate natürlich vorkommender Polysaccharide (Dextran, Pullulan und Stärke) hergestellt. Die Modifizierung muss derart gestaltet sein, dass sich das Polymer in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösemittel lösen lässt und gleichzeitig Wasser als Lösemittel ausschließt. Zusätzlich zur Hydrophobisierung wird noch die Möglichkeit zur Quervernetzung in Form von Methacrylatresten, eingebaut. Der relevante Ouzo-Bereich kann auf zwei Wegen durch das Phasendiagramm erreicht werden: einer ist das Zutropfen der acetonischen Lösung in Wasser, der andere ist das Zutropfen von Wasser in die acetonische Lösung. Die beiden Wege sind in Abbildung 5-8 illustriert.

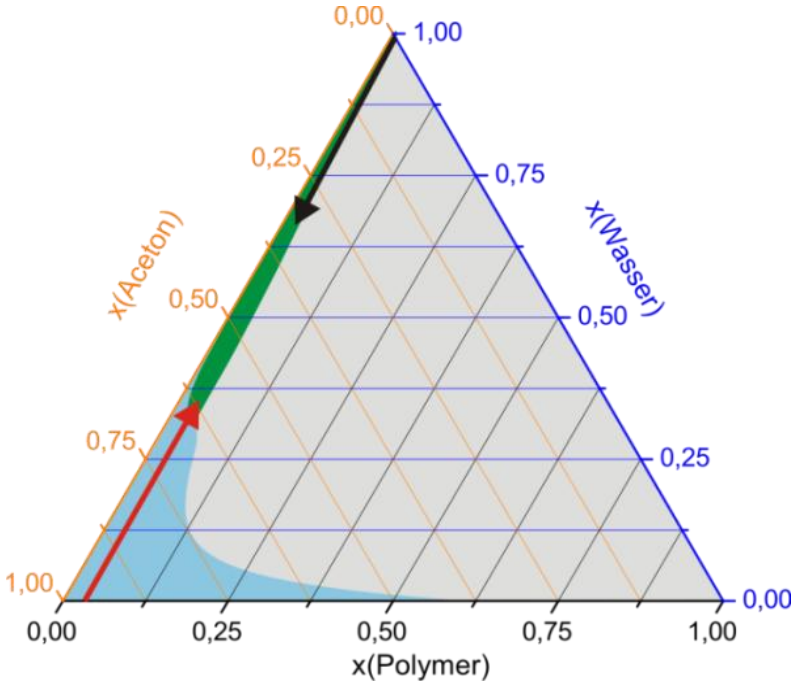


Abbildung 5-8 **Schematisches Phasendiagramm mit eingezeichneten relevanten Bereichen (grün – Ouzo-Bereich, blau – einphasiger Bereich (Lösung), grau – Präzipitation bzw. keine Löslichkeit des Polymers). Die Pfeile stellen die beiden Wege dar wie der Ouzo-Bereich erreicht werden kann (schwarz – acetonische Lösung in Wasser: Weg 1, rot – Wasser zur acetonischen Lösung: Weg 2).**

Abbildung 5-8 stellt ein ternäres Phasendiagramm dar, in welches schematisch 3 Phasen eingezeichnet sind: zum einen der Ouzo-Bereich in grün, zum anderen die Lösung in blau und schließlich der Bereich, in dem das Polymer makroskopisch ungelöst vorliegt, in grau. Die in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Wege durch das Phasendiagramm sind in Form der Pfeile dargestellt. Der schwarze Pfeil steht für die Zugabe von acetonischer Lösung des Polymers ins Wasser und der rote Pfeil zeigt die Zugabe von Wasser in die acetonische Lösung des Polymers. Beide Wege liefern stabile Dispersionen, doch wie man an Abbildung 5-8 sieht, sind die Bedingungen für die Entstehung dieser unterschiedlich. Die Massenbrüche der einzelnen Komponenten beim Erreichen des Ouzo-Bereichs bei gleichen Einwaagen weichen bei den beiden Wegen voneinander ab. Beim roten Pfeil (im Folgenden Weg 2) ist ein sehr hoher Anteil an Aceton im System, wohingegen beim schwarzen Pfeil (Im Folgenden Weg 1) sehr viel mehr Wasser vorhanden ist. Zudem ist der Massenbruch des Polymers unterschiedlich, da es sich bei der Zugabe von Wasser schon vollständig im System befindet und nicht wie bei der Zugabe von acetonischer

Lösung erst nach und nach zugeführt wird. Das könnte eine Diffusion der Polymerketten aufgrund des hohen Lösemittelanteils zur Folge haben. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird dieser Aspekt experimentell untersucht.

Im Allgemeinen ist die Zubereitung der Dispersionen mit dem Ouzo-Effekt mit sehr niedrigem Energieaufwand verbunden, da für die Homogenisierung keine Zufuhr von Energie, wie z.B. Ultraschallbehandlung, nötig ist. Die Dispersionen bilden sich spontan aus. Es werden bereits gebildete Polymere verwendet, somit entfällt der Polymerisationsschritt. Es ist nicht notwendig, zusätzliches Tensid für die in dieser Arbeit verwendeten Polymere zur Stabilisierung der Partikel zugegeben. Die Stabilität der Dispersionen ist ohne Tensid gegeben. Hier wird eine kolloidale Stabilität, aufgrund der hydrophilen Bestandteile des Polymers, die in die wässrige Phase herausragen und somit eine sterische Stabilisierung bewirken, angenommen. Um die wässrige Dispersion der polymeren Nanopartikel zu erhalten, muss lediglich das mit in der Dispersion vorliegende Aceton verdampft werden.

Wie bereits im Theorieteil erwähnt, wird in der Literatur beschrieben, dass diverse Faktoren einen Einfluss auf die Eigenschaften der Partikel in Dispersion haben, im Besonderen auf die Lage des Ouzo-Bereichs, auf die Partikelgröße und auf deren Größenverteilung. Um diese Einflüsse zu untersuchen, werden Dispersionen mittels des Ouzo-Effekts hergestellt, dabei werden mehrere Faktoren variiert, wie die Konzentration des Polymers in der Lösung, der Substitutionsgrad und das Molekulargewicht des gelösten Polymers, die Zutropfgeschwindigkeit der Polymerlösung und das Verhältnis Lösemittel zu Nichtlösemittel (Aceton zu Wasser).

Bestimmung des Ouzo-Arbeitsbereichs

Der Ouzo-Effekt ist nur in einem relativ engen Konzentrationsbereich zu beobachten. Deshalb gilt es, für die Nutzung des Ouzo-Effekts für die Nanopartikelherstellung den potentiellen Konzentrationsbereich zu finden, in dem er auftritt. Dazu werden drei Polymere mit unterschiedlichen Eigenschaften auf diesen Bereich hin untersucht. Zum einen sind es zwei Polymere mit gleichem Molekulargewicht, aber

unterschiedlichem Substitutionsgrad und damit auch unterschiedlicher Hydrophilie (40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$), wodurch der Einfluss der Hydrophilie auf diesen Bereich untersucht wird. Die HLB-Werte sind mit 11,0 für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und für das deutlich höher substituierte 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ mit 10,3 erwartungsgemäß unterschiedlich, haben aber einen relativ geringen Unterschied. Das bedeutet zwar, dass die lipophilen Bestandteile im Gesamtpolymer steigen und mit höherer Substitution das Polymer hydrophober ist, aber nicht in einem sehr großen Ausmaß.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurde ein Polymer mit höherem Molekulargewicht und ähnlichem Substitutionsgrad, damit auch ähnlichem HLB-Wert (500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$), verwendet, um beispielsweise die Viskosität bei gleichem HLB-Wert als eine Einflussgröße zu variieren. Die HLB-Werte sind mit 11,0 für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 11,1 für 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ bei ähnlichem Substitutionsgrad und unterschiedlichen Molekulargewichten nahezu gleich. Aus diesen Polymeren werden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen in Aceton (zwischen 0,005% und 4%) hergestellt und unterschiedliche Mengen (zwischen 20 µL und 10 ml) in eine konstante Menge Wasser (5 g) eingetropft. Das Einsetzen einer Trübung markiert den Beginn des Ouzo-Bereichs, sobald eine makroskopische Präzipitation und damit eine Instabilität der Dispersion zu erkennen ist, verlässt man diesen im Phasendiagramm; somit lässt sich der Bereich für die Nutzung des Ouzo-Effekts eingrenzen. In Abbildung 5-9 ist der Verlauf einer solchen Versuchsreihe fotographisch dargestellt.

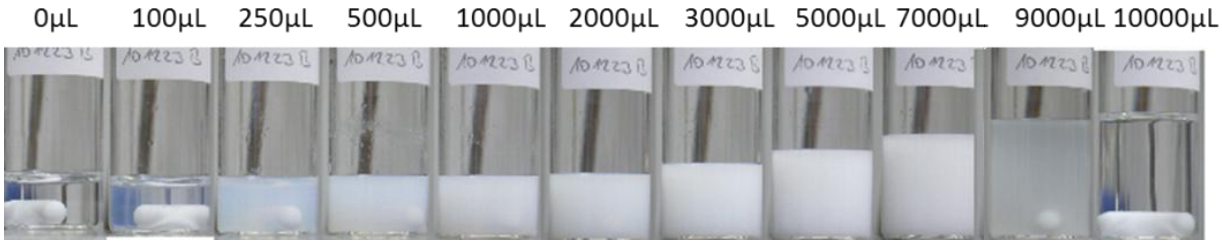


Abbildung 5-9 Dispersionen hergestellt unter Zugabe unterschiedlicher Mengen acetonischer Lösung von 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ mit einer Konzentration von 2,66 Gew.-%.

In Abbildung 5-9 sind die Dispersionen, welche aus einer 2,66 Gewgew.-%igen Lösung von 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ hergestellt wurden, mit steigendem Gehalt an zugegebener Polymerlösung, dargestellt. Man sieht, dass eine Trübung bereits bei sehr geringer Zugabe (100 µL) einsetzt und sich mit weiterer Zugabe stark intensiviert. Dies entspricht dem erwarteten Ergebnis, da 2,66% eine relativ hohe Ausgangskonzentration für den Ouzo-Effekt ist[80]. Weiterhin zu ist beobachten, dass die Trübung ab einer bestimmten Menge an acetonischer Lösung hier 9000 µL abnimmt und vollständig verschwindet (10000 µL). Die Durchführung und der Verlauf dieser Versuchsreihe entspricht dem schwarzen Pfeil im Phasendiagramm aus Abbildung 5-8, es wird der grüne Ouzo-Bereich durchquert und bei entsprechendem Acetongehalt verlässt man durch einen sehr hohen Lösemittelanteil den metastabilen Ouzo-Bereich und erreicht den blau markierten Bereich, in welchem das Polymer gelöst vorliegt. Führt man nun mehrere Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen durch, kann man den Bereich definieren, der für die spätere Herstellung geeignet ist. Der für diese Untersuchungen gewählte Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,005 und 4 Gew.-% (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2 Konzentration der Polymerlösungen für die Bestimmung des Ouzo-Bereichs

	40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ [gew%]	40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ [gew%]	500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ [gew%]
1	0,003	0,002	0,006
2	0,04	0,02	0,05
3	0,10	0,10	0,10
4	0,27	0,99	1,02
5	0,50	2,02	2,98
6	1,00	2,67	4,05
7	2,53	3,95	
8	4,48		

Die Zutropfvolumina für jede dieser Lösungen sind: 20 µL, 100 µL, 200 µL, 500 µL, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 7 ml, 10 ml diese werden zu 5 g Wasser zugetropft. Um die verwendeten Konzentrationen für die Erstellung der Phasendiagramme in Massenbrüche umzurechnen, werden Gleichungen (5-5 bis 5-10) verwendet:

$$m\ Ges\ = m\ Wasser\ + m\ Lösung \quad (5\text{-}5)$$

$$m\ Aceton\ = \rho\ Aceton\ \cdot V\ acetonische\ Lösung\ - m\ Polymer \quad (5\text{-}6)$$

$$m\ Polymer\ = \rho\ Aceton\ \cdot V\ acetonische\ Lösung\ \cdot c(Polymer) \quad (5\text{-}7)$$

$$x\ Aceton\ = \frac{m(Aceton)}{m(Ges)} \quad (5\text{-}8)$$

$$x\ Polymer\ = \frac{m(Polymer)}{m(Ges)} \quad (5\text{-}9)$$

$$x\ Wasser\ = 1 - x\ Aceton\ - x(Polymer) \quad (5\text{-}10)$$

Für die Erstellung der Phasendiagramme wird der Massenbruch der jeweiligen Komponenten aus den Einwaagen berechnet und der Massenbruch Polymer gegen den Massenbruch Aceton aufgetragen. Die entsprechende Dispersion wird auf das Vorhandensein einer Trübung und auf das Auftreten von makroskopischen Präzipitationen und Rückstände am Gefäßboden bzw. am Rührfisch untersucht. Um das Phasendiagramm erstellen zu können, müssen die hergestellten Dispersionen kategorisiert werden. Die Einteilung erfolgte nach in Tabelle 5-3 dargestelltem Muster.

Tabelle 5-3 Einteilung der Dispersionen für die Erstellung der Phasendiagramme.

Kategorie	Beobachtung	Symbol
einphasiges ternäres Gemisch	klare Lösung ohne Trübung	■
Ouzo-Bereich	eindeutige Trübung aber ohne makroskopische Präzipitation	●
Entmischung	Makroskopische Präzipitation am Gefäßboden und oder Rührfisch	▲

Trägt man nun die jeweils berechneten Massenbrüche gegeneinander in einem Diagramm auf und ordnet ihnen die im Experiment gefundenen Kategorien in Form einer Farbe zu, ergeben sich Phasendiagramme für die jeweiligen Polymere. Damit

lässt sich auch der für die Partikelherstellung nutzbare Konzentrationsbereich bestimmen. Diese Beobachtungen für die drei Versuchsreihen sind in Abbildung 5-10 gezeigt.

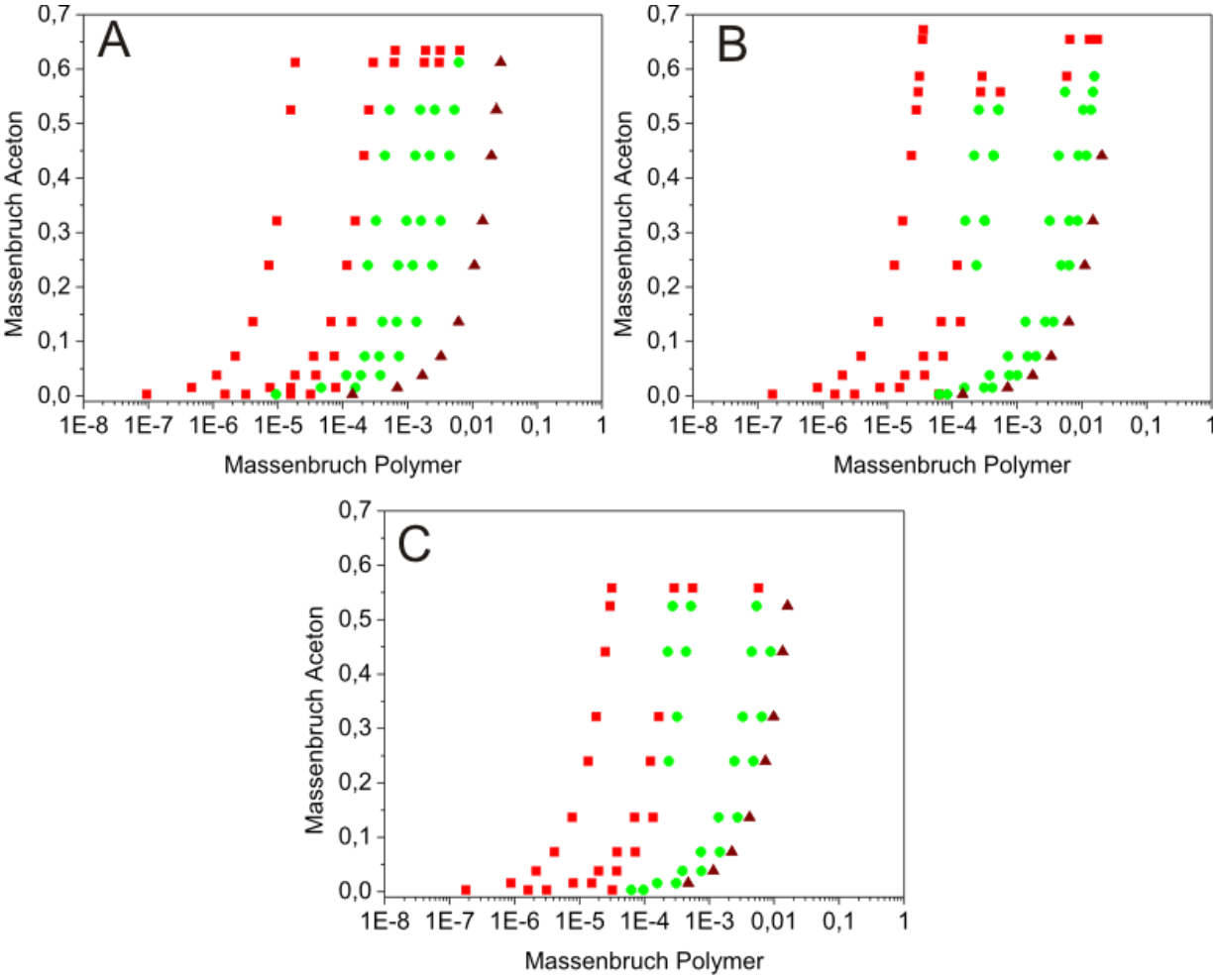


Abbildung 5-10 **Experimentell bestimmte Phasendiagramme für A) 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ B) 40kDexB$_{1.11}$MA$_{0.16}$ und C) 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ (rote Quadrate – Lösung keine Präzipitation oder Trübung, grüne Kreise – Präzipitation ohne Makropräzipitation, braune Dreiecke – Makropräzipitation und Rückstände im Gefäß).**

In Abbildung 5-10 sind die experimentell ermittelten Phasendiagramme für die drei oben beschriebenen Polymere zu sehen. Die roten Quadrate beschreiben den Bereich, bei dem das System makroskopisch in Lösung vorliegt, die grünen Kreise stehen für den Ouzo-Bereich, in dem eine Trübung auftritt, aber keine

makroskopische Präzipitation zu erkennen ist. Der Bereich, in dem makroskopische Präzipitation zu erkennen ist, wird mit braunen Dreiecken abgebildet. Es ist auffällig, dass weder der HLB-Wert noch das Molekulargewicht einen erkennbaren Einfluss auf den Ouzo-Bereich der strukturell ähnlichen Polymere haben. Die Bereiche sind nahezu deckungsgleich. Weiterhin ist zu sehen, dass bereits bei sehr kleinen Massenbrüchen des Polymers von etwa 10^{-5} bis 10^{-4} der Ouzo-Bereich erreicht wird und wie erwartet auch bei niedrigen Massenbrüchen zwischen 10^{-3} bis 10^{-2} makroskopische Präzipitation zu beobachten ist. Der Konzentrationsbereich, in dem der Ouzo-Effekt auftritt, liegt zwischen 0.1 und ca. 4 Gew.-% Polymer in Aceton und ist somit auch wie oben beschrieben relativ eng. Allerdings ist der Konzentrationsbereich für dieses Polymer breiter als für andere Polymere, die in vorherigen Publikationen beschrieben werden. Für PMMA beispielsweise wird ein Bereich bis zu 1 Gew.-% in Lösung für den Ouzo-Bereich angegeben[83]. Dies lässt darauf schließen, dass die Art des Polymers ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Herstellung der Dispersionen und für den Ouzo-Effekt nutzbaren Bereich spielt. Damit erscheint der Einsatz solcher Dextran-Derivate als ergiebiger, da deutlich höher konzentrierte Lösungen für die Herstellung der Dispersionen verwendet und somit auch mehr Polymer in die Dispersion eingebracht werden kann. Jetzt gilt es, als nächsten Schritt die Eigenschaften der Dispersionen zu untersuchen, im Speziellen die Partikelgrößen, deren Verteilungen und die Parameter, welche die Partikelbildung beeinflussen.

Konzentrationsvariation und Variation des Substitutionsgrades

Um den Einfluss der Konzentration auf die Partikelgröße in der wässrigen Dispersion zu untersuchen, wurden unterschiedlich konzentrierte acetonische Lösungen von $40kDexB_{1,01}MA_{0,26}$ (0,1% - 4%) hergestellt und über eine Spritze in Wasser bei gleicher Flussrate (2 ml/min) eingetropft. Wie bereits bei den Versuchsreihen oben festgestellt, setzte im Verlauf des Zutropfens bereits bei geringen Volumina eine Trübung ein, die sich mit der zugetropften Menge intensivierte. Um eine Aussage über den Einfluss der Konzentration treffen zu können und diese mit der

Partikelgröße zu korrelieren, wurden PCCS-Messungen durchgeführt. Die Partikelgrößen und deren Verteilung in wässriger Dispersion in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des Polymers in Lösung sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst.

Tabelle 5-4 **Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Konzentration von 40kDexB$_{1,01}$MA$_{0,26}$ gemessen in Wasser.**

Gew.-% 40kDexB$_{1,01}$MA$_{0,26}$ in Lsg	x_{10} [nm]	x_{50} [nm]	x_{90} [nm]
3,96%	123	142	173
2,97%	100	112	142
1,98%	93	95	139
1,63%	75	82	115
0,78%	57	72	87
0,42%	52	58	80
0,10%	40	46	55

In Abbildung 5-11 ist der graphische Zusammenhang zwischen Partikeldurchmesser und Konzentration für die Reihe mit 40kDexB$_{1,01}$MA$_{0,26}$ dargestellt.

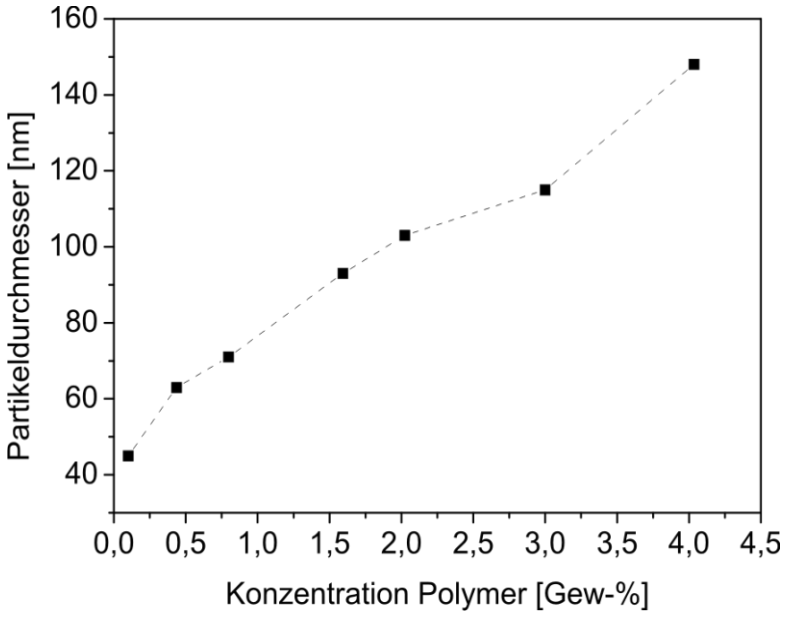


Abbildung 5-11 **Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Konzentration (in Gew.-%) von 40kDexB$_{1,01}$MA$_{0,26}$ in der zugetropften acetonischen Lösung und der mittels PCCS gemessenen mittleren Partikelgröße.**

Aus Abbildung 5-11 geht deutlich hervor, dass mit steigender Konzentration der Partikeldurchmesser zunimmt. Die gemessenen Partikeldurchmesser befinden sich in einem Größenbereich zwischen 40 und 150 nm. Daraus lässt sich schließen, dass die Partikelgröße von der Konzentration des Polymers im organischen Lösemittel abhängt und sich dadurch auch steuern lässt. Bei Betrachtung der REM-Aufnahmen der Partikel aus diesen Dispersionen (Abbildung 5-12) ist eine Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung bei höherer Polymerkonzentration zu erkennen.

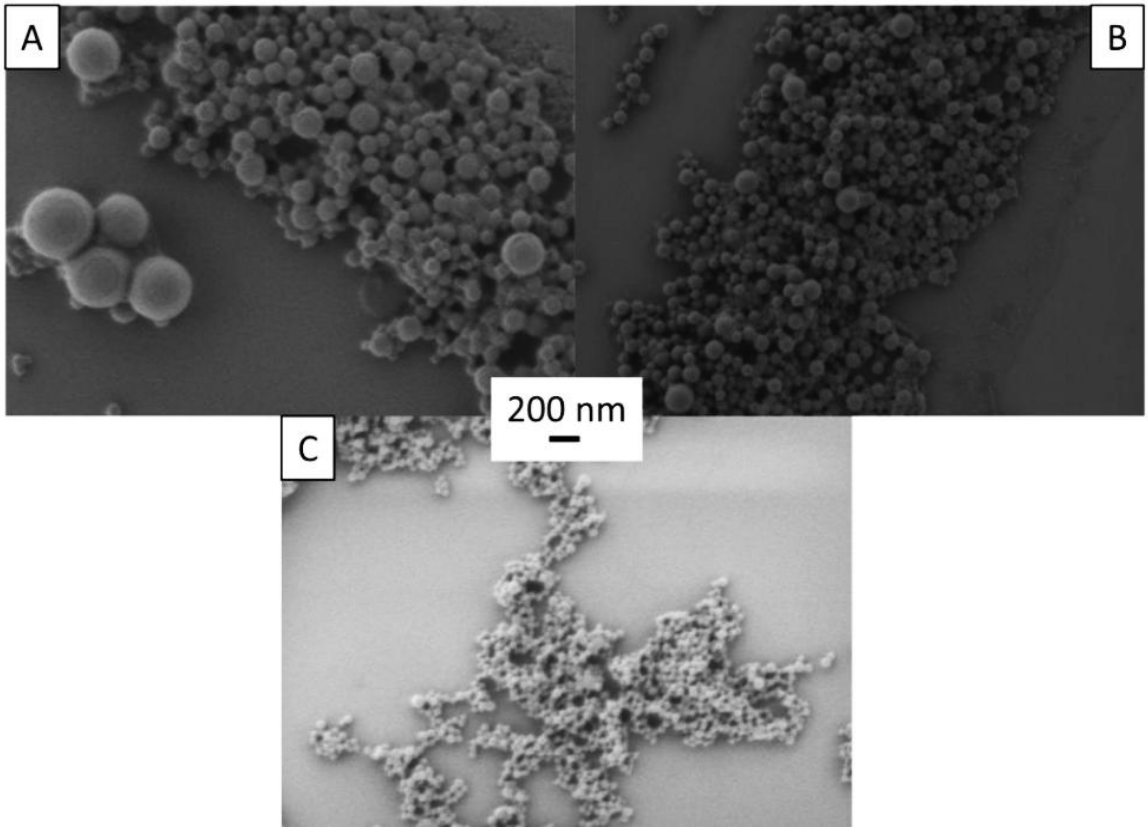


Abbildung 5-12 **REM-Aufnahmen der getrockneten Dispersionen hergestellt aus unterschiedlich konzentrierten acetonischen Lösungen von $DexB_{1,01}MA_{0,26}$ A) 4 Gew.-%, B) 2 Gew.-% und C) 0,01 Gew.-%.**

Die in Abbildung 5-12 gezeigten Aufnahmen stellen den Größenunterschied, der in Abbildung 5-11 bereits graphisch zu sehen ist, dar. Es ist erkennbar, dass die Partikeldurchmesser mit der Konzentration ansteigen, hier von 41 nm bei einer Konzentration von 0,01 Gew.-% bis auf 150 nm bei 4 Gew.-%. Weiterhin ist auffällig, dass die Homogenität der Größenverteilung mit steigender Konzentration abnimmt.

In Abbildung C ist eine sehr homogene Größenverteilung der Partikel sichtbar, wohingegen in Abbildung 5-12A schon sehr große (500 nm) und ebenso auch kleine (60 nm) Partikel zu sehen sind. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartungshaltung, da bereits in vorhergehenden Publikationen berichtet wird, dass die Konzentration bei der Herstellung von Dispersionen von PLA mittels Nanopräzipitation ein sehr wichtiger Parameter für die endgültige Partikelgröße und deren Verteilung in Dispersion ist[31, 70, 109]. Diese Beobachtung ist mit dem Mechanismus der Bildung solcher Nanopartikel zu erklären, dem sogenannten Agglomerationsmechanismus bzw. dem Diffusion-Stranding-Mechnismus. Dabei diffundiert das Lösemittel, hier Aceton, in die wässrige Phase und auch andersrum. Das Polymer reichert sich lokal an, diffundiert aber aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht in die wässrige Phase. Aufgrund des nun fehlenden Lösemittels kommt es in diesem Konzentrationsbereich zur Partikelbildung im Nanomaßstab. Es bilden sich kleine Primärpartikel aus, deren Anzahl mit der Konzentration zunimmt. Um die Reduzierung der Grenzfläche und damit auch der Grenzflächenenergie zu gewährleisten, vereinigen sich die Primärpartikel, die in einem bestimmten Volumen vorliegen, zu einem größeren Partikel. Da die Anzahl der Primärpartikel in diesem Volumen proportional zur Konzentration ist, nimmt auch mit erhöhter Primärpartikelzahl die Größe der letztlich erhaltenen Partikel auch zu. Es ist somit eine logische Folge des postulierten Mechanismus, dass mit steigender Konzentration auch die Partikelgröße und deren Größenverteilung zunehmen.

Einfluss des Substitutionsgrades und der Hydrophilie

Diesen Zusammenhang gilt es nun sowohl für unterschiedliche Substitutionsgrade des Dextrans als auch für unterschiedliche Polymere wie Stärke und Pullulan zu untersuchen. Zunächst wird der Substitutionsgrad an Benzoylgruppen in Dextran verändert. Da durch die Substitution die Hydrophilie der Polymere und damit auch die Löslichkeit beeinflusst wird, muss dieser Faktor bei der Herstellung der Dispersionen überprüft werden. Um diesen Einfluss auf die Partikelgröße zu überprüfen, wurde eine Reihe von Dispersionen hergestellt. Dafür wurden, wie in

Kapitel 5.1.2 beschrieben, fünf unterschiedliche Substitutionsgrade von DexBMA synthetisiert ($DexB_{0,67}MA_{0,23}$ $DexB_{0,84}MA_{0,24}$ $DexB_{1,01}MA_{0,26}$ $DexB_{1,21}MA_{0,26}$ und $DexB_{1.44}MA_{0,23}$). Die HLB-Werte für die hier verwendeten Polymere sind wie bereits oben beschrieben nach Davies berechnet und in Tabelle 5-5 gezeigt.

Tabelle 5-5 **HLB-Werte der Dextranderivate berechnet nach Davies[57].**

Polymer	HLB-Wert
$40kDexB_{0,67}MA_{0,23}$	11,5
$40kDexB_{0,84}MA_{0,24}$	11,3
$40kDexB_{1,01}MA_{0,26}$	11,0
$40kDexB_{1,21}MA_{0,26}$	10,8
$40kDexB_{1,44}MA_{0,23}$	10,6

Diese Derivate wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 4 Gew.-% in Aceton gelöst, und diese Lösungen wurden zur Herstellung der Dispersionen verwendet. Die Herstellung der Dispersionen erfolgte, wie im vorhergehenden Unterkapitel beschrieben. Die Dispersionen wurden mittels PCCS in Wasser auf ihre Partikelgrößen vermessen und auf die Abhängigkeit von der Hydrophobizität hin untersucht. In Abbildung 5-13 ist der Zusammenhang Partikeldurchmesser zu Konzentration graphisch dargestellt.

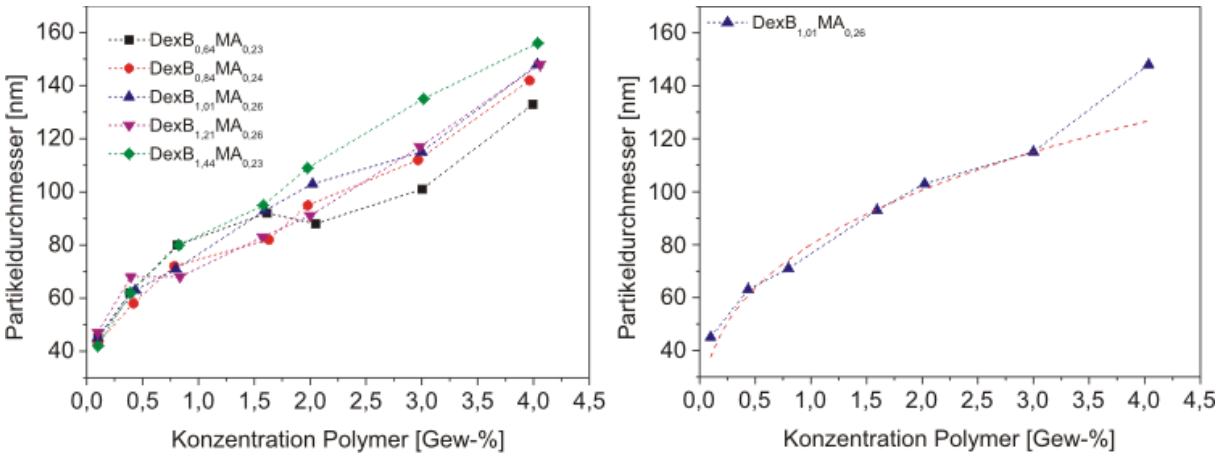


Abbildung 5-13 **Links: Partikelgrößen von Dispersionen hergestellt mittels Nanopräzipitation aus unterschiedlich substituierten DexBMA-derivaten ($40kDexB_{0,67}MA_{0,23}$ (schwarze Quader), $40kDexB_{0,84}MA_{0,24}$ (rote Kreise), $40kDexB_{1,01}MA_{0,26}$ (blaue Dreiecke), $40kDexB_{1,21}MA_{0,26}$ (rosa Dreiecke) und $40kDexB_{1,44}MA_{0,23}$ (grüne Rauten)). Rechts: Fit der Partikelgrößen nach Formel (5-11) für die Partikel aus $40kDexB_{1,01}MA_{0,26}$.**

Man erkennt in Abbildung 5-13 den bereits in Abbildung 5-11 festgestellten Trend, dass mit steigender Konzentration auch die Partikelgrößen ansteigen. Aufgrund des Mechanismus, ist eine mit der Konzentration linear zunehmende Anzahl an gebildeten Primärpartikeln anzunehmen. Weiterhin wird die Annahme gemacht, dass jeder gebildete Primärpartikel die gleiche Größe aufweist. Das bedeutet eine lineare Volumenzunahme der finalen Partikel. Dadurch ist von einer Abhängigkeit des Partikelradius von der dritten Wurzel der Konzentration auszugehen[83]. Somit kann eine Regressionskurve nach Gleichung (5-11) bestimmt werden, bei welcher der präexponentielle Faktor *A* als Maß für die Zunahme der Partikelgröße in Abhängigkeit von der Konzentration dient. Diese Werte für *A* sind in Tabelle 5-6 dargestellt.

$$d\ c(Polymer)\ = A * c(Polymer)^{0,3} \qquad (5\text{-}11)$$

Tabelle 5-6 Präexponetielle Faktoren der Regressionskurven bestimmt aus Abbildung 5-13.

Polymer	*A* [nm/Gew.-%]
40kDexB$_{0,67}$MA$_{0,23}$	81
40kDexB$_{0,84}$MA$_{0,24}$	80
40kDexB$_{1,01}$MA$_{0,26}$	84
40kDexB$_{1,21}$MA$_{0,26}$	83
40kDexB$_{1,44}$MA$_{0,23}$	87

Man sieht aus den Werten aus Tabelle 5, dass die Größenzunahme des Partikeldurchmessers mit hohem Substitutionsgrad 40kDexB$_{1,44}$MA$_{0,23}$ größer ist als die von 40kDexB$_{0,67}$MA$_{0,23}$. Die Werte für die Substitutionsgrade dazwischen schwanken jedoch und lassen so nicht auf einen Effekt der erhöhten Hydrophobizität der stärker substituierten Derivate schließen. Als Aussage lässt sich hier lediglich die Zunahme der Partikelgröße in Abhängigkeit von der Konzentration um einen ähnlichen Wert für alle hier untersuchten Polymere festhalten. Es geht nicht klar hervor, welchen Einfluss der Substitutionsgrad hat, deshalb werden weitere Parameter untersucht.

Einfluss der Viskosität

In einigen Veröffentlichungen wird die Viskosität als einer der wichtigsten Faktoren für die Partikelbildung mittels des Ouzo-Effekts und deren resultierende Größe diskutiert[65, 110-112]. Die Partikelbildung im Ouzo-Regime wurde anhand von Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid) untersucht, z.B. zur Herstellung von mit einem Wirkstoff beladenen Partikeln[87]. Dabei wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass die Viskosität der Polymerlösungen einen starken Einfluss auf die Partikelbildung hätte. Die Bildung der Partikel würde damit durch die viskositätsbedingte Diffusionsgeschwindigkeit des Lösemittels in die Wasserphase als auch andersrum kontrolliert.

Um den Einfluss der Viskosität zu untersuchen und damit die Beobachtung aus Abbildung 5-13 zu deuten, wurden die spezifischen Viskositäten der Polymerlösungen zweier DexBMA unterschiedlicher Substitutionsgrade in Abhängigkeit von deren Konzentrationen bestimmt. Dazu wurden die Durchlaufzeiten der acetonischen Lösungen mittels eines Viskosimeters nach Ubbelohde gemessen. Aus den Durchlaufzeiten lässt sich die spezifische Viskosität nach Gleichung (5-12) berechnen:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{lsg} - \eta_{LM}}{\eta_{LM}} = \frac{t_{lsg} - t_0}{t_0} \qquad (5\text{-}12)$$

Mit:

η_{sp} spezifische Viskosität;

η_{lsg} Viskosität der Lösung;

η_{LM} Viskosität des Lösemittels;

t_0 Durchlaufzeit des Lösemittels

t_{lsg} Durchlaufzeit der Lösung).

Weiterhin lässt sich aus den gewonnenen Daten nach Berechnung der reduzierten Viskosität nach Gleichung (5-13) die Grenzviskosität, der sogenannte

Staudingerindex [η] und der Huggins Parameter k_H nach Gleichung (5-14) bestimmen:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c_{Polymer}} = \frac{t_{lsg} - t_0}{t_0 \cdot c_{Polymer}} \quad (5\text{-}13)$$

$$\eta_{red} = \eta + k_H \eta^2 C \quad (5\text{-}14)$$

Der Staudingerindex stellt anschaulich das Volumen an Knäulen dar, das von einem Gramm Polymer in unendlich verdünnter Lösung eingenommen wird. Der Huggins-Koeffizient ist für jedes Polymer/Lösungsmittel-System charakteristisch und ist eine dimensionslose Konstante, die aus der Potenzreihe, welche die spezifische Viskosität zum Staudingerindex in Beziehung setzt, stammt. Sie beschreibt die Wechselwirkungen zwischen Polymer und dem Lösemittel und ist somit ein Maß für die Güte des letzteren. Je kleiner der Huggins-Koeffizient ist, desto geringer ist die Grenzviskosität, desto kleiner sind die Polymerknäule und desto weniger gequollen liegt das Polymer vor. Die spezifischen Viskositäten für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ in Abhängigkeit von der Konzentration sind in Abbildung 5-14 dargestellt. Die daraus ermittelten Steigungen der Kurven, die Grenzviskosität und der Huggins-Koeffizient sind in Tabelle 5-7 zusammengefasst.

Tabelle 5-7 **Grenzviskosität und Huggins-Koeffizient aus den Viskositätsmessungen für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$.**

Polymer	Steigung	[η] [ml/g]	k_H
40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$	0,133	14,1	1,11
40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$	0,142	13,1	0,70

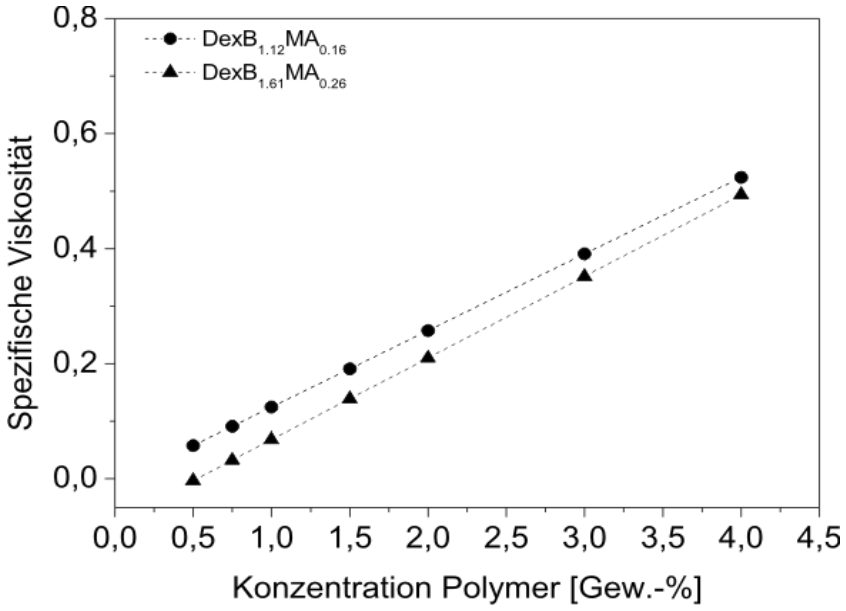


Abbildung 5-14 Spezifische Viskositäten der acetonischen Lösungen von 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ (rote Kurve) und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ (grüne Kurve) in Abhängigkeit von der Konzentration.

Wie man aus Tabelle 5-6 erkennt, sind die Steigungen, die hier als Maß für die Viskositätsänderung in Abhängigkeit von der Konzentration genommen werden, für die Kurven beider Derivate mit 0,133 für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 0,142 für 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ nahezu gleich. Ebenso verhält es sich mit der Grenzviskosität. Der Huggins-Koeffizient ist allerdings für das höher substituierte Dextran kleiner. Das deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung Polymer/Lösemittel mit höherem Substitutionsgrad schwächer ist als bei dem niedriger substituierten Polymer. Welche Auswirkung das auf die Partikelgröße hat, ist in Abbildung 5-15 dargestellt.

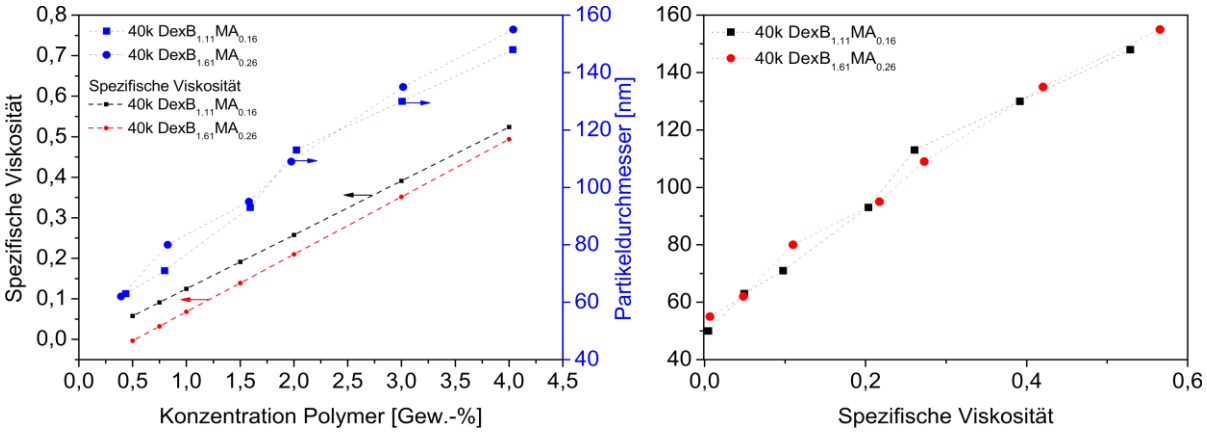


Abbildung 5-15 **A) Partikelgrößen im Vergleich zur Viskosität der Lösungen von 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ (blaue Vierecke – Partikelgröße; schwarze Vierecke – Spezifische Viskosität) und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ (blaue Kreise – Partikelgröße; rote Kreise – Spezifische Viskosität). B) Partikelgrößen der beiden Polymere (40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ – schwarze Vierecke und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ –rote Kreise) in Abhängigkeit von der spezifischen Viskosität.**

Abbildung 5-15 A zeigt, dass die Partikelgrößen in den beiden Dispersionen bei entsprechender Konzentration nahezu identisch sind, ebenso wie deren spezifische Viskositäten. Abbildung B verdeutlicht dies nochmals, indem man die Partikelgröße in Abhängigkeit von der Viskosität betrachtet. Es fällt auf, dass die Größe der Partikel aus beiden Dispersionen fast identisch mit deren spezifischer Viskosität ansteigt. Dies liefert einen sehr guten Hinweis für die von Kissel aufgestellte Vermutung[87], dass die Viskosität der Polymerlösung die Partikelbildung und deren Größe beeinflusst. Um jedoch erkennen zu können, ob tatsächlich die Viskosität einen großen Einfluss hat, muss man das Experiment verändern und die Konzentration an Polymer konstant halten während man die Viskosität ändert. Dies ist mit zwei unterschiedlichen Herangehensweisen näherungsweise möglich. Zum einen kann ein höheres Molekulargewicht bei gleichem HLB-Wert die Viskosität erhöhen, zum anderen kann das gleiche Polymer in einem anderen Lösemittel, z.B. THF, gelöst werden.

Einfluss des Molekulargewichts des Polymers

Das Molekulargewicht des Polymers hat einen Einfluss auf die Viskosität seiner Lösungen, dies wird in der Viskosimetrie zur Bestimmung der Molekulargewichte genutzt. Um den Einfluss des Molekulargewichts auf die Partikelbildung zu untersuchen, wurde ein Dextran-Derivat mit einem vergleichbaren Substitutionsgrad und HLB-Wert aus einem Dextran mit einem Molekulargewicht von 500 000 g/mol nach der oben beschriebenen Syntheseroute hergestellt (500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$). Die spezifische Viskosität und damit auch die anderen Parameter der acetonischen Lösungen dieses Polymers werden gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5-8 und Abbildung 5-16 dargestellt.

Tabelle 5-8 **Grenzviskosität und Huggins-Koeffizient aus den Viskositätsmessungen für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ und 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$.**

Polymer	Steigung	$[\eta]$ [ml/g]	k_H
40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$	0,133	14,1	1,11
500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$	0,627	30,5	4,07

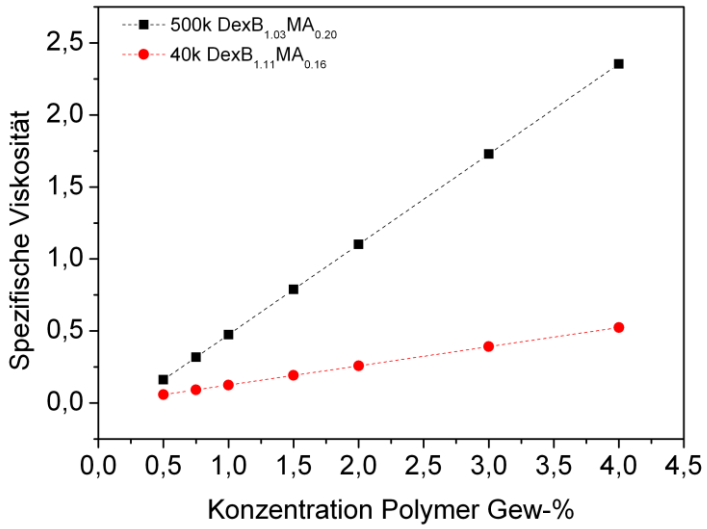


Abbildung 5-16 **Spezifische Viskositäten der DexBMA mit unterschiedlichem Molekulargewicht 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ (schwarz) und 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ (rot) im Vergleich.**

Tabelle 5-7 zeigt, wie unterschiedlich die Grenzviskosität und der Huggins-Koeffizient der beiden Polymere in Aceton sind. Das bedeutet, dass das Verhalten der Polymere in Lösung qualitativ unterschiedlich ist, denn je höher der Huggins-Koeffizient ist, desto schlechter ist das Lösemittel für das Polymer. Abbildung 5-16 zeigt die spezifischen Viskositäten in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 4,0 Gew.-% für DexBMA mit zwei unterschiedlichen Molekulargewichten (40 000 g/mol und 500 000 g/mol) in acetonischer Lösung. Es ist klar ersichtlich, dass die Viskositäten sich stark unterscheiden. Die Steigung für das 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ weist einen Wert von 0,627 auf. Dieser ist um einen Faktor 5 größer als der Wert für das annähernd gleich substituierte, jedoch ein deutlich kleineres Molekulargewicht aufweisende 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ mit 0,133. Um nun auch die Abhängigkeit der Partikelgröße von der erhöhten Viskosität der Lösungen des Polymers mit höherem Molekulargewicht zu untersuchen, werden Dispersionen aus Lösungen mit gleichen Konzentrationen, wie für die Reihe mit 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$, hergestellt. Die Partikelgrößen werden mittels PCCS ermittelt und mit denen für 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 5-17 zu sehen.

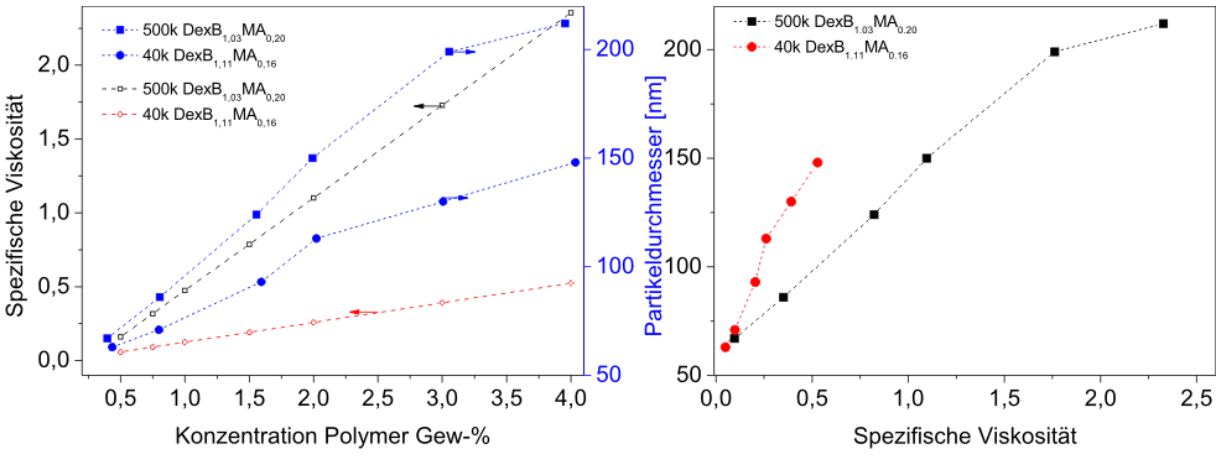


Abbildung 5-17 **A) Partikelgrößen im Vergleich zur Viskosität der Lösungen von 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ (blaue Vierecke – Partikelgröße; schwarze Vierecke – Spezifische Viskosität) und 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ (blaue Kreise – Partikelgröße; rote Vierecke – Spezifische Viskosität) B) Partikelgrößen der beiden Polymere (40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ – rote Kreise und 500kDexB$_{1,03}$MA$_{0,20}$ – schwarze Vierecke) in Abhängigkeit von der spezifischen Viskosität.**

In Abbildung 5-17 A ist zu sehen, dass die Partikelgrößen wie erwartet zu höheren Konzentrationen hin ansteigen. Jedoch sind die Partikel aus dem Polymer mit höherem Molekulargewicht bei gleicher Konzentration deutlich größer als die Partikelgrößen der Partikel aus dem Polymer mit dem niedrigeren Molekulargewicht. Dies könnte wiederrum damit zusammenhängen, dass, wie oben beschrieben, die Viskosität der Lösungen des Polymers mit einem Molekulargewicht von 500 000 g/mol deutlich höher ist. Betrachtet man allerdings die Abhängigkeit der Partikelgrößen von der spezifischen Viskosität, stellt man fest, dass die Partikelgrößen mit steigender Viskosität für 500kDex$B_{1,03}MA_{0,20}$ deutlich weniger ansteigen, als dies für das Polymer mit einem M_w von 40 000 g/mol zu beobachten ist. Hier muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass mit höherer molarer Masse sich auch andere Eigenschaften der Polymerlösung ändern, wie z.B. die Löslichkeit des Polymers bzw. die Art wie das Polymer in Lösung vorliegt. Deshalb ist an dieser Stelle lediglich bedingt eine Aussage über den Einfluss der Viskosität möglich.

Einfluss des Lösemittels

Weiterhin gilt es, die Rolle des Lösemittels und dessen Einfluss zu untersuchen. Da THF bereits eine deutlich höhere Viskosität aufweist als Aceton und zudem auch ein sehr gutes Lösemittel für die hydrophoben Dextran Derivate ist, wird es deshalb als Lösemittel gewählt. Dazu werden die spezifischen Viskositäten der THF-Lösungen von 40kDex$B_{1,11}MA_{0,16}$, bestimmt. Die Grenzviskositäten und die Huggins-Koeffizienten sind in Tabelle 5-9 und die spezifische Viskosität ist in Abhängigkeit von der Konzentration im Vergleich der beiden Lösemittel in Abbildung 5-18 dargestellt.

Tabelle 5-9 **Grenzviskosität und Huggins-Koeffizient aus den Viskositätsmessungen für 40kDex$B_{1,11}MA_{0,16}$ in Aceton und THF.**

Lösemittel	Steigung	$[\eta]$ [ml/g]	k_H
Aceton	0,142	13,1	1,11
THF	0,238	18,6	0,61

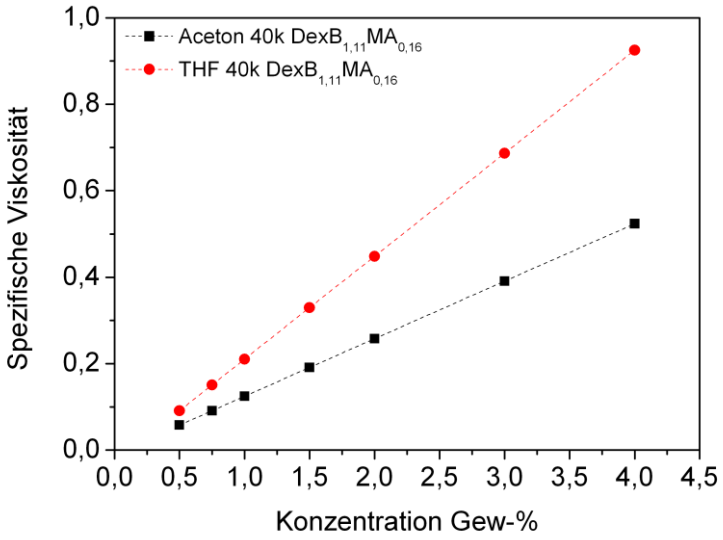


Abbildung 5-18 Spezifische Viskositäten der Lösungen von 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ in Abhängigkeit von der Konzentration in verschiedenen Lösemitteln (Aceton – schwarz und THF - rot).

Abbildung 5-18 zeigt die Unterschiede der Viskositäten der beiden Lösungen. Die Kurven zeigen den erwarteten Verlauf, in welchem die THF-Lösung (Steigung 0,238) die höhere spezifische Viskosität bei gleicher Konzentration aufweist. Die Grenzviskosität ist mit 18,6 ml/g auch höher als bei der Verwendung von Aceton. Die Huggins-Koeffizienten deuten darauf hin, dass THF das bessere Lösemittel ist. Somit erhält man die Lösung desselben Polymers mit veränderter Viskosität, aber mit annähernd ähnlichen Wechselwirkungen Polymer/Lösemittel, so dass eine Untersuchung des Einflusses der Viskosität für das gleiche Polymer möglich ist. Hierzu werden die Lösungen mit gleichen Konzentrationen, die bereits für die Herstellung der Aceton-Dispersionen verwendet wurden, hergestellt. Die Dispersionen wurden ebenfalls nach der gleichen Methode hergestellt, die Partikelgrößen mit PCCS vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-19 dargestellt.

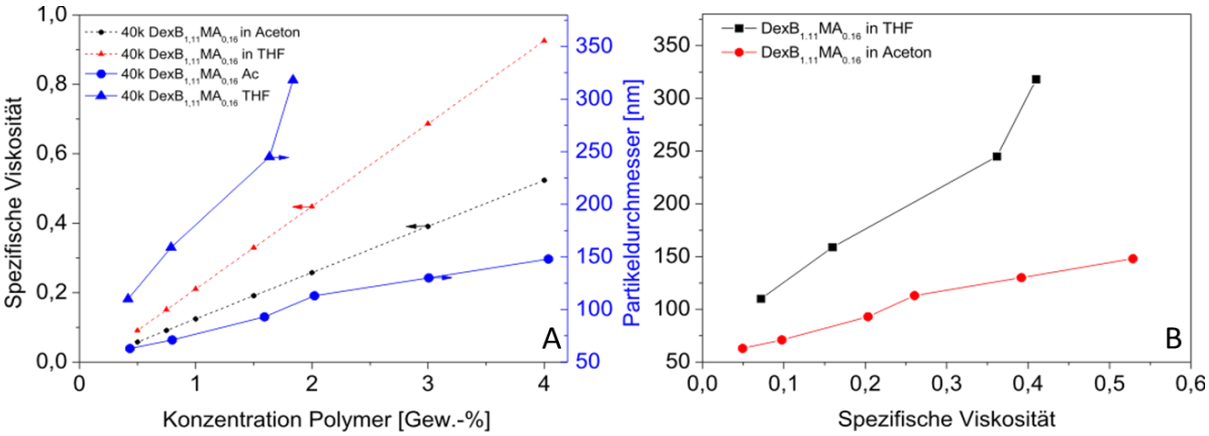


Abbildung 5-19 **A) Partikelgrößen der Dispersionen hergestellt aus 40kDexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ aus THF-Lösung (blaue Dreiecke) und aus acetonischer Lösung (blaue Kreise) in Abhängigkeit von der Konzentration der Polymerlösung mit den jeweiligen spezifischen Viskositäten (THF – rot und Aceton- schwarz). B) Partikelgröße in Abhängigkeit von der spezifischen Viskosität.**

Aus Abbildung 5-19 erschließt sich der Einfluss der Viskosität und des Lösemittels auf die Partikelgrößen. Es ist klar zu erkennen, dass die Partikelgrößen in den Dispersionen, hergestellt aus der THF-Lösung, bei gleicher Konzentration deutlich größer sind als die aus der acetonischen Lösung. In Abbildung 5-19 B ist aber auch eine stärkere Zunahme des Partikeldurchmessers mit der spezifischen Viskosität für die THF-Dispersionen zu sehen. Zum Vergleich sind die Partikeldurchmesser in Tabelle 5-10 gegenübergestellt.

Tabelle 5-10 **Partikelgrößen der Dispersionen hergestellt aus acetonischer und THF-Lösung im Vergleich.**

Gew.-% 40k DexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ in Aceton	Partikeldurchmesser [nm]	Gew.-% DexB$_{1,11}$MA$_{0,16}$ In THF	Partikeldurchmesser [nm]
4,04	148	3,96	instabil
3,01	130	3,05	instabil
2,02	113	1,83	318
1,59	93	1,63	245
0,80	71	0,78	159
0,44	63	0,41	110

Wie man hier erkennt, sind die Partikelgrößen im Fall der THF–Lösung mehr als doppelt so groß wie die aus acetonischer Lösung. Die Dispersionen bei den relativ hohen Ausgangskonzentrationen von 3,96 und 3,05 Gew% in THF bilden im Vergleich zu den Dispersionen in Aceton keine Nanopartikel. Man beobachtet eine Makrophasenseparation, mit einem Niederschlag, der sich nicht wieder dispergieren lässt. Offensichtlich scheint die Viskosität hier für die letztendlich erhaltene Partikelgröße eine Rolle zu spielen. Diese Aussage wird allerdings dadurch limitiert, dass beim Wechsel des Lösemittels auch eine Reihe weiterer Parameter verändert werden. Die wichtigsten sind dabei die Mischbarkeit des Lösemittels mit der wässrigen Phase, die Diffusionsgeschwindigkeit des einen Lösemittels ins andere und die damit verbundene Entmischung des Systems. Die Diffusionskoeffizienten für die beiden Lösemittel in Wasser sind mit $1{,}08 \times 10^{-5}$ cm^2/s für THF und $1{,}28 \times 10^{-5}$ cm^2/s für Aceton unterschiedlich. Nach Jung et al. ist die Diffusionsgeschwindigkeit ein entscheidender Faktor für die Partikelgröße[88]. Je höher die Diffusionsgeschwindigkeit des Lösemittels ist, desto schneller entmischt sich das System und verteilt das Polymer auf einen größeren Raum und dementsprechend kleiner sind die Partikel.

Abbildung 5-20 zeigt die REM-Aufnahme einer Dispersion, hergestellt aus einer 0,5 gew.-%igen Lösung in THF. Man sieht, dass einige Partikel Löcher an der Oberfläche aufweisen, welche so aussehen, als wäre etwas Eingeschlossenes entwichen. Hierbei kann es sich um noch im Partikel verbleibendes THF handeln. Dieser Einschluss führt zur intrapartikulären Phasenseparation. Es bildet sich eine Art Lösemitteldepot, aus welchem durch das Entweichen des Lösemittels, wie in Abbildung 5-21 gezeigt, eine Kavität im Partikel hinterlässt. Dies kann man anhand der TEM-Aufnahme im Bildeinsatz deutlicher erkennen. Die Kavität mit dem Austrittsloch ist darauf klar zu sehen. Das bestärkt die Annahme, dass THF als Lösemittel teilweise in den Partikeln verbleibt. Diese Beobachtung wurde bei der Ausbildung von Nanokapseln durch die „Solvent Displacement“-Technik bereits gemacht[113]. Hier bildeten sich ebenfalls Kavitäten durch das Entweichen von THF in die Kontinuierliche Phase aus.

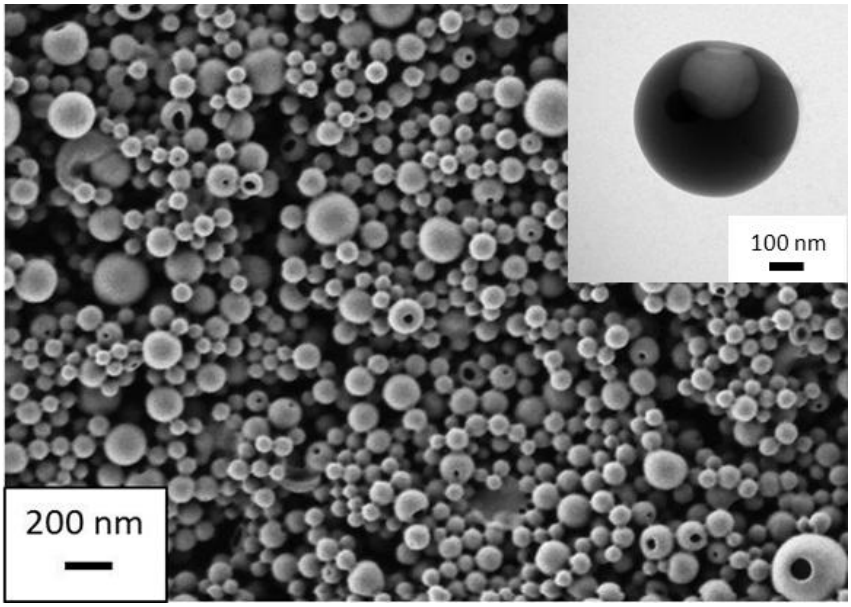


Abbildung 5-20 **REM-Aufnahme einer getrockneten THF-Dipsersion hergestellt aus einer ca. 0,5 Gew.-% igen Lösung, im Bildeinsatz: TEM-Aufnahme eines Partikels mit Kavität.**

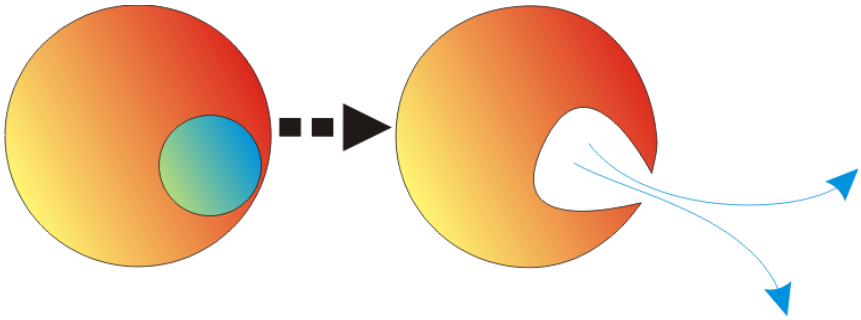


Abbildung 5-21 **Ausbildung der Kavitäten in den Partikeln der Dispersionen hergestellt aus THF-Lösung.**

Diese Beobachtungen sind bei Partikeln, welche aus acetonischer Polymerlösung hergestellt wurden, nie gemacht worden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Affinität des Lösemittels zum Polymer, welche sich unter anderem durch einen niedrigeren Huggins-Koeffizienten der Polymerlösung äußert. Damit ist THF ein sehr gutes Lösemittel, die Wechselwirkung Polymer/Lösemittel ist stärker und eine Restmenge polymerreicher THF-Lösung kann im Partikel verbleiben. Dieser Ansatz macht es möglich, mit dieser Technik komplexere Nanostrukturen als nur sphärische

Partikel zu erzeugen. Es ist leider nicht möglich über diesen Ansatz eine definitive quantitative Beurteilung zu machen wie genau die Viskosität die Partikelbildung beeinflusst. Dies gilt es in der Fortsetzung dieser Arbeit weiter zu verfolgen.

Einfluss des Verhältnisses Polymerlösung zu Wasser

Um den Einfluss des Verhältnisses Polymerlösung zu Wasser zu untersuchen, wurden aus einer Stammlösung ($DexB_{1,21}MA_{0,26}$, 2,02 Gew.-%) Aliquote von 10, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2500 µL zu 5 g Wasser zugegeben. Die Partikelgrößen wurden nach der Entfernung des Lösemittels bestimmt. Die so erhaltenen Werte sind in Abbildung 5-22 gegen die zugegebene Menge aufgetragen.

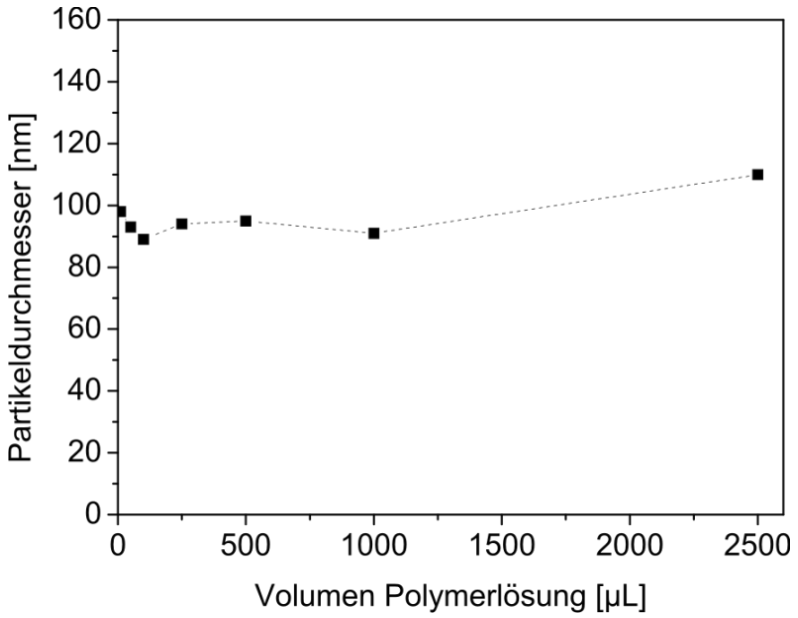


Abbildung 5-22 Partikeldurchmesser in Abhängigkeit vom Volumen der zugegebenen Polymerlösung.

In Abbildung 5-22 ist der Zusammenhang zwischen der Menge an Polymerlösung und den Partikeldurchmessern gezeigt. Wie man klar sieht, erhält man bei jedem untersuchten Volumen Partikelgrößen um 100 ± 10 nm. Das bedeutet, dass für den hier untersuchten Bereich der Partikeldurchmesser nicht davon abhängt, wie viel

Polymerlösung in das System eingebracht wird, solange die Konzentration der Polymerlösung gleich bleibt. Weiterhin bedeutet es, dass die Partikelgrößen im Lauf der Zugabe von weiterem Polymer in Lösung zur wässrigen Phase nicht in ihrer Größe ansteigen. Es ist davon auszugehen, dass zu jeder Zeit ein großer Überschuss an Nichtlösemittel bei der Herstellung dieser Dispersionen vorhanden ist und deshalb annähernd die gleichen Bedingungen für die Partikelbildung vorzufinden sind. Der wahrscheinlichste Mechanismus bei dieser Art der Herstellung erscheint der im Theorieteil diskutierte „Diffusion Stranding“-Mechanismus, da bei gleicher Konzentration immer die gleiche Anzahl an Primärpartikeln gebildet werden, die sich dann zum endgültigen Partikel zusammenschließen. Dieser weist unabhängig von der zugegebenen Menge den gleichen Durchmesser auf. Der im Theorieteil beschriebene „Nucleation and Growth“-Mechanismus ist hierbei als sehr unwahrscheinlich anzusehen. Bei diesem sollte durch Diffusionsprozesse aufgrund eines Lösemittelüberschusses ein Anstieg der Partikelgrößen mit Zugabe von weiterem Polymer zu erwarten sein, was nicht zu beobachten ist.

Einfluss der Zugabereihenfolge

Die Herstellung der Partikel kann über zwei verschiedene Wege realisiert werden. Diese wurden in Punkt 5.2 bereits vorgestellt. Es kann einerseits die Polymerlösung ins Wasser (Weg 1) oder das Wasser in die Polymerlösung (Weg 2) zugetropft werden. Hier soll nun der Einfluss der Konzentration des Polymers ermittelt und die beiden Wege miteinander verglichen werden. Dazu wird die Konzentration der unterschiedlich substituierten Dextranderivate ($DexB_xMA_y$) in Aceton variiert. Wird das Experiment dem in Abbildung 5-8 dargestellten roten Pfeil (Weg 2) entsprechend durchgeführt, tritt die Trübung nicht sofort auf, sondern, wie erwartet, ab einer gewissen Menge an zugegebenem Wasser. Das Auftreten dieser Trübung ist durch das Überschreiten der Ouzo-Grenze und die dadurch gebildeten und dispergierten Nanopartikel bedingt. Die Zusammensetzungen der Systeme während der Partikelentstehung bzw. dem Erreichen des Ouzo-Bereichs, obwohl gleich konzentrierte Lösungen verwendet werden, ist deutlich unterschiedlich. Bei Weg 1 ist

anfänglich ein sehr großer Überschuss an Nichtlösemittel vorhanden, wohingegen bei Weg 2 ein Lösemittelüberschuss im System vorliegt. Die Partikelgrößen wurden mittels PCCS gemessen und REM-Untersuchungen durchgeführt. Das Ergebnis der Messungen im Vergleich zur ersten, oben verwendeten Methode ist in Abbildung 5-23 dargestellt.

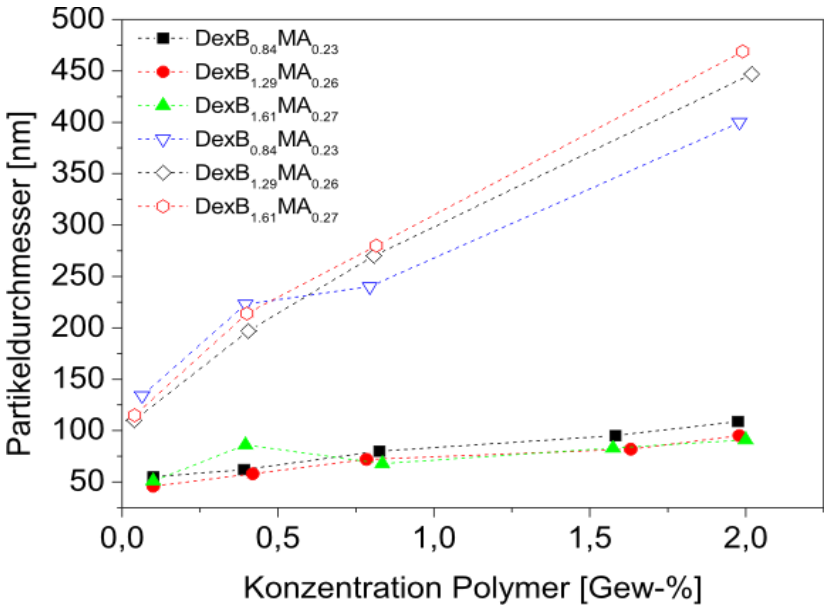


Abbildung 5-23 **Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Präparation und der Polymerkonzentration; gefüllte Symbole entsprechen dem Zutropfen von acetonischer Lösung in Wasser und offene Symbole dem Zutropfen von Wasser in eine acetonische Lösung des Polymers.**

In Abbildung 5-23 sind die Partikeldurchmesser in Abhängigkeit von der Konzentration der acetonischen Lösung und dem Präparationsweg dargestellt, es ist bei beiden Methoden ein Anstieg der Partikeldurchmesser mit der Konzentration zu beobachten. Die Dispersionen, die durch Zutropfen von acetonischer Lösung zu Wasser bereitet werden (schwarzer Pfeil in Abbildung 5-8; Weg 1), weisen deutlich kleinere Partikelgrößen auf als die durch Zutropfen von Wasser in acetonische Polymerlösung entstandenen Dispersionen (roter Pfeil in Abbildung 5-8; Weg 2). Im untersuchten Bereich (0,1 – 2 Gew.%) verändern sich die Partikeldurchmesser bei Weg 1 mit steigender Konzentration lediglich in einem Bereich von 40-100 nm, wohingegen sie sich bei Weg 2, im gleichen Konzentrationsbereich, in einem Bereich von 100 und 450 nm bewegen. Hierbei muss man aber bedenken, dass bei Weg 2

die Zusammensetzung des Systems beim Erreichen des Ouzo-Bereichs anders ist als bei Weg 1. Dies wird bei Betrachtung von Abbildung 5-8 sichtbar.

Bei Weg 1 ist über die gesamte Zeit der Zubereitung ein großer Überschuss an Nichtlösemittel vorhanden. Bei Weg 2 hingegen erreicht man aufgrund eines anfänglichen Überschusses an Lösemittel erst nach Zugabe von einer erheblichen Menge Nichtlösemittel die Grenze des Ouzo-Bereichs und beobachtet dann die plötzliche und spontane Entmischung. Die Unterschiede schlagen sich sehr deutlich in den Partikelgrößen nieder, wie man in den REM-Aufnahmen dieser Dispersionen in Abbildung 5-24 sieht.

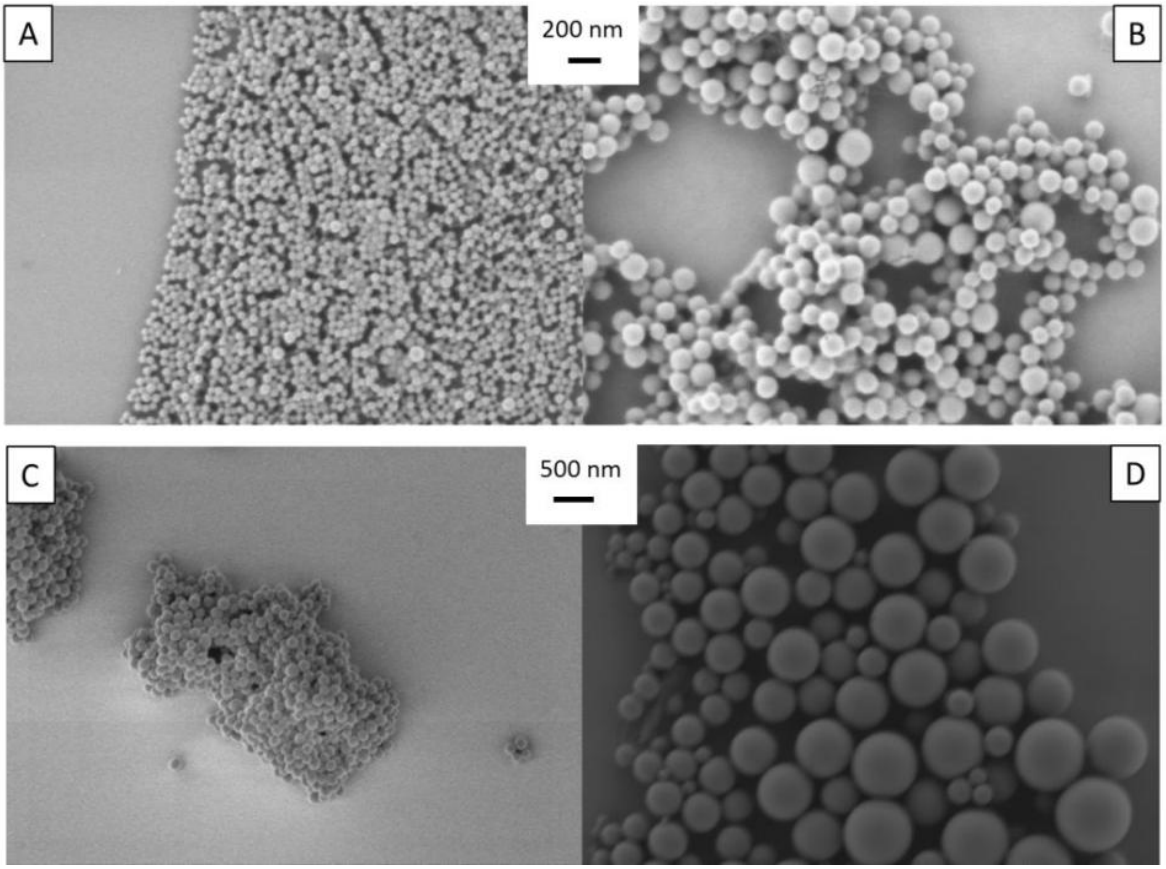


Abbildung 5-24 **REM Aufnahmen von Partikeln hergestellt durch Zugabe einer 0,4 gew.-%igen acetonischen Lösung von 40kDexB$_{1,29}$MA$_{0,26}$ zu Wasser (A) und Zugabe von Wasser zu einer 0,4 gew.-%igen acetonischen Lösung von 40kDexB$_{1,29}$MA$_{0,26}$ (B) einer 2 gew.-%igen acetonischen Lösung von 40kDexB$_{1,29}$MA$_{0,26}$ zu Wasser (C) und Zugabe von Wasser zu einer 2 gew.-%igen acetonischen Lösung von 40kDexB$_{1,29}$MA$_{0,26}$ (D).**

Abbildung 5-24 zeigt REM-Aufnahmen der getrockneten Dispersionen hergestellt auf beiden Wegen aus 0,4 gew-%igen (A und B) und 2 gew.-%igen (C und D) Lösungen von 40kDex$B_{1,29}MA_{0,26}$. Man sieht erhebliche Unterschiede der Größen und deren Verteilungen. Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser mit ihren Standardabweichungen sind in Tabelle 5-11 aufgeführt.

Tabelle 5-11 **Partikeldurchmesser für die Dispersionen hergestellt aus 0,4 und 2 gew.-%iger acetonischer Lösung von Dex$B_{1,29}MA_{0,26}$ über Weg 1 und 2 (Auswertung REM-Aufnahmen mind. 100 Teilchen)**

Konz. Polymer[Gew.-%]	d_{REM} [nm] Weg 1	d_{REM} [nm] Weg 2
0,4	Bild A - 48 ± 9	Bild B - 110 ± 25
2	Bild C - 112 ± 22	Bild D - 452 ± 104

Die Werte aus Tabelle 5-11 zeigen deutlich den Unterschied in der Partikelgröße. Die Partikel in Abbildung 5-24 A weisen mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 48 nm und einer Standardabweichung von 9 nm, eine sehr homogene Größenverteilung auf, wohingegen in Abbildung 5-24 B (Wasser in acetonische Lösung) eine deutliche Inhomogenität der Partikelgrößen zu sehen ist; hier sind Partikelgrößen zwischen 50 und 300 nm sichtbar. Der durchschnittliche Partikeldurchmesser beträgt 110 nm mit einer Standardabweichung von 25 nm. Noch deutlicher wird der Unterschied sichtbar, wenn man die Werte für die Dispersionen aus der 2 gew.-%igen Lösung vergleicht. Die für Weg 1 erhaltenen Werte weisen mit 112 nm ± 22 nm in etwa den Wert auf, den man aus deutlich niedriger konzentrierten Lösungen mittels Weg 2 erhält. Man sieht in Abbildung 5-24, dass die über Weg 2 hergestellten Dispersionen bei der 2 gew.-%igen Lösung eine extrem breite Verteilung der Partikeldurchmesser haben. Mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 452 nm und einer Standardabweichung von 104 nm sind diese deutlich größer als die über Weg 1 erhaltenen Werte. Daraus lässt sich schließen, dass die Prozessführung bei der Zubereitung der Dispersionen ebenfalls ein wichtiger und entscheidender Faktor ist. Es ist offensichtlich ein großer Unterschied aus welcher Richtung man das System in die metastabile Ouzo-Region im Phasendiagramm bringt. Hierbei ist davon auszugehen, dass es Änderungen im Mechanismus der Partikelbildung gibt. Dies könnte auf die Unterschiede in der Zusammensetzung des Systems je nach Weg

zurückgeführt werden. Bei Weg 2 ist der Massenbruch von Aceton beim Eintritt in den Ouzo-Bereich deutlich höher. Dies scheint den zweiten diskutierten und postulierten Mechanismus zu favorisieren. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Diffusion von Polymerketten bei einer bestimmten Lösemittelzusammensetzung (große Menge an wassermischbarem Lösemittel, wie Aceton) möglich ist und dadurch ein „Nucleation and Growth“-Mechanismus ermöglicht wird. Dabei entstehen Partikel, die durch weitere Anlagerung von Polymerketten im Laufe der Zeit weiter wachsen. Dies ist durchaus denkbar, denn die sehr breite Größenverteilung der Partikel ist durch Diffusionsprozesse möglich, die bei hohen Lösemittelanteilen im System vorkommen können. Dabei werden zur Minimierung der Grenzfläche die größeren Partikel, welche einen thermodynamisch günstigeren Zustand des Systems repräsentieren, aufgebaut. Diese Art der Partikelbildung kann auch für die durch den Dialyse-Prozess hergestellten Partikel angenommen werden, welcher, wie im Theorieteil beschrieben, durch langsamen Austausch des Lösemittels in einer Dialysemembran den Ouzo-Bereich erreicht[114]. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, dass sich die Partikelgrößen und die Größenverteilung nicht nur durch die Variation der Konzentration, sondern auch durch die Prozessführung steuern und einstellen lassen.

Einfluss der Zutropfgeschwindigkeit der Polymerlösung auf die Partikelgrößen

Als eine weitere Einflussgröße beschreibt die Gruppe um Klimant in ihrer Veröffentlichung von 2010 die Zutropfgeschwindigkeit der Polymerlösung ins Nichtlösemittel[109]. Dabei berichten sie von Unterschieden der Partikelgrößen bei gleicher Konzentration um 30 nm je nach Zutropfgeschwindigkeit. Je schneller die Zugabe erfolgte, desto kleinere Partikelgrößen wurden in der Dispersion gefunden. Um diesen Aspekt ebenfalls zu beleuchten und den Einfluss der Zutropfgeschwindigkeit zu untersuchen, wird eine acetonische Lösung von $DexB_{1,21}MA_{0,23}$ (2,01 Gew.-%) hergestellt. Davon werden jeweils 0,5 g in 1 g Wasser zugetropft. Um die unterschiedlichen Zutropfgeschwindigkeiten einzustellen, wird eine Spritzenpumpe verwendet. Fünf Zutropfgeschwindigkeiten werden untersucht:

0,1, 0,2, 0,5, 2 ml/min und eine manuelle Zugabe mit einer Spritze mit einer geschätzten Einspritzgeschwindigkeit von 30 ml/min. Die danach mittels PCCS ermittelten Partikelgrößen sind in Abbildung 5-25 dargestellt.

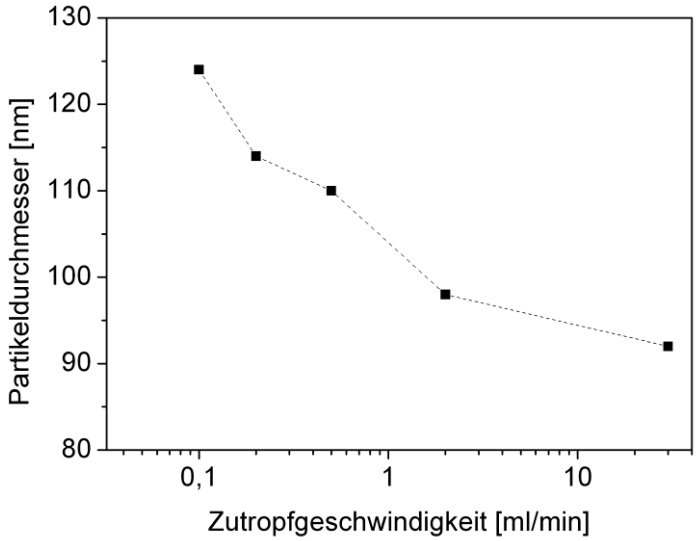


Abbildung 5-25 PCCS-Messungen der Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Zutropfgeschwindigkeit der acetonischen Lösung von $DexB_{1,21}MA_{0,23}$ in Wasser.

Aus Abbildung 5-25 wird ersichtlich, welchen Einfluss die Tropfgeschwindigkeit hat. Es ist ein Abfall der Partikelgröße mit steigender Zutropfgeschwindigkeit zu beobachten. Bei einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/min werden Partikelgrößen um 120 nm gemessen, wohingegen bei 30 ml/min die Größen nur noch 90 nm betragen. Damit ist der Wert für die langsamste Zugabe etwa 30 nm größer als der Wert für die schnellste Zugabe, was einen Größenzuwachs von über 30% bedeutet. Beim langsamen Zutropfen ist jedoch damit zu rechnen, dass, während der Tropfen an der Spritzenkanüle hängt, das flüchtige Lösemittel verdampft und sich damit auch die Konzentration der Lösung erhöht. Um auch die Verteilung der Partikelgrößen etwas genauer betrachten zu können, werden REM-Aufnahmen gemacht und vermessen, die Ergebnisse sind in Abbildung 5-26 und Tabelle 5-11 zu sehen.

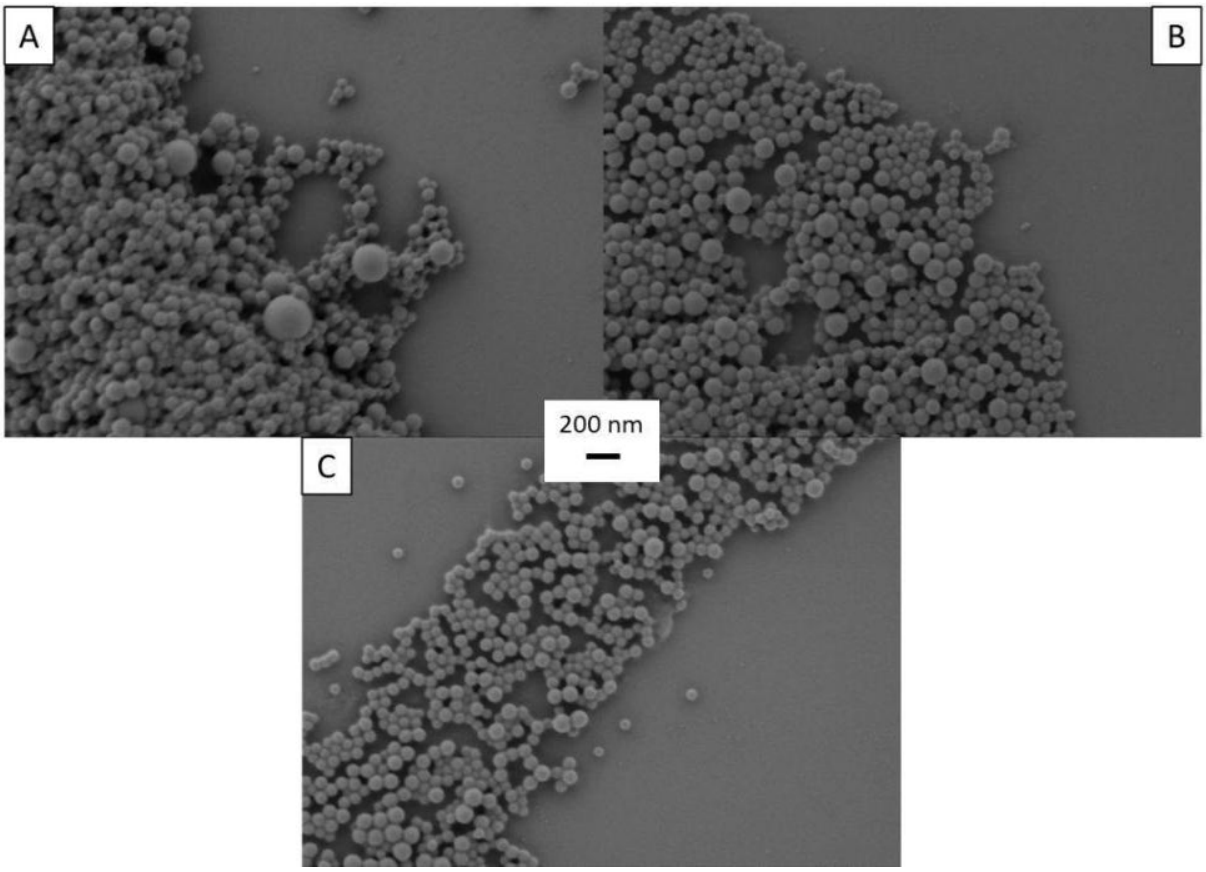


Abbildung 5-26 **REM-Aufnahmen der Versuchsreihe mit unterschiedlichen Zutropfgeschwindigkeiten einer acetonische Lösung von $DexB_{1,21}MA_{0,23}$ (2,01 Gew.-%): A) 0,1 ml/min B) 0,5 ml/min und C) 30 ml/min.**

Bei Betrachtung der REM-Aufnahmen in Abbildung 5-26 sieht man, dass die Homogenität der Partikelgrößen mit der Zutropfgeschwindigkeit zunimmt. In Bild A sind große Partikel zu erkennen die von sehr kleinen umgeben sind, in Bild C jedoch ist eine sehr homogene Verteilung der Partikelgrößen zu beobachten. Dies wird von den Werten aus Tabelle 5-11 nochmals belegt, sowohl der durchschnittliche Partikeldurchmesser wird mit der Zutropfgeschwindigkeit kleiner, als auch die Standardabweichung. So ist diese bei einer Zutropfgeschwindigkeit von 0,1 ml/min mit 46 nm deutlich höher als bei 30 ml/min mit 16 nm.

Tabelle 5-3 Partikeldurchmesser bestimmt aus Abbildung 5-26.

Zutropfgeschwindigkeit [ml/min]	d_{REM} [nm]
A - 0,1	98 ± 46
B - 0,5	92 ± 28
C - 30	84 ± 16

Der Prozess der Partikelbildung wird in der Literatur als sehr schnell beschrieben[109], so entmischt sich das System schneller, als das Polymer durch die Lösung nachgeliefert werden kann. Aus diesem Grund überwiegt der Einfluss der schnellen Diffusion des Lösemittels und der Einfluss der Zutropfgeschwindigkeit ist vermutlich eher marginal. Deshalb ist auch anzunehmen, dass die Veränderung der Partikelgröße der Veränderung der Konzentration zuzuschreiben ist. Darauf deutet auch die Tatsache, dass sich die Größenverteilung der Partikel mit langsamerem Fluss verbreitert, wie man es bei der Versuchsreihe mit der Variation der Konzentrationen für höhere Konzentrationen beobachten konnte.

5.2.2. Quervernetzung und Quellbarkeit der hydrophoben Nanopartikel

Aus der Literatur ist bekannt, dass makroskopische Hydrogele aus Methacrylat-funktionalisierten Dextranen durch UV-Bestrahlung realisierbar sind[115]. Um dieses Konzept auf Nanopartikel anwenden zu können, wird das Dextran bei der Synthese, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, zusätzlich zur Hydrophobisierung mit Methacrylatresten funktionalisiert. Um die Vernetzung jedoch gewährleisten zu können, muss ein UV-Initiator (2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon) hinzugefügt werden. Dieser wird gemeinsam mit dem Polymer in Aceton in einer Konzentration von 0,2 Gew.-% gelöst. Die Polymerlösungen sind mit etwa 4 Gew.-% sehr hoch konzentriert, um einen hohen Polymeranteil in der Dispersion zu erhalten. Des Weiteren wird der Substitutionsgrad der Methacrylatreste variiert. Es werden $40kDexB_{1,46}MA_{0,14}$, $40kDexB_{1,44}MA_{0,24}$ und $40kDexB_{1,48}MA_{0,51}$ verwendet. Die Dispersionen werden hergestellt, und die Polymere durch Bestrahlung mit einer Niederdruck-Quecksilberdampflampe (λ= 254 nm) über 2 h in einem Quarzrohr

vernetzt. In Abhängigkeit vom Substitutionsgrad der Methacrylatreste wird die Quellbarkeit bestimmt. Vom gequollenen Zustand geht man aus, sobald die Partikel in Ethanol dispergiert sind. Ethanol ist als Quellmedium gewählt worden, da es für die eventuelle spätere Beladung mit Wirkstoffen geeignet ist. Der Quellgrad wird durch das Verhältnis der Volumina in gequollenen Zustand in Ethanol zu den Volumina im kollabierten Zustand in Wasser nach Gleichung (5-15) angegeben:

$$Q = \frac{V(gequollen)}{V(kollabiert)} \tag{5-15}$$

Zudem wird der Sol/Gel-Gehalt der Dispersionen bestimmt. Dieser beschreibt, wie viele der Polymerketten in den Partikeln über die Methacrylatreste vernetzt sind und nicht mehr aus dem Verbund gelöst werden können. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tabelle 5-13 und Abbildung 5-27 zusammengefasst.

Tabelle 5-13 **Partikeldurchmesser, Quellgrad und Sol/Gel-Gehalt der vernetzten Partikel aus $DexB_{1,46}MA_{0,14}$, $DexB_{1,44}MA_{0,24}$ und $DexB_{1,48}MA_{0,51}$.**

	d_{PCCS} [nm]				
Polymer	Wasser	Ethanol	Quellgrad	Gel	Sol
$DexB_{1,46}MA_{0,14}$	216	260	1,83	94	6
$DexB_{1,44}MA_{0,24}$	221	248	1,33	96	4
$DexB_{1,48}MA_{0,51}$	203	216	1,20	93	7

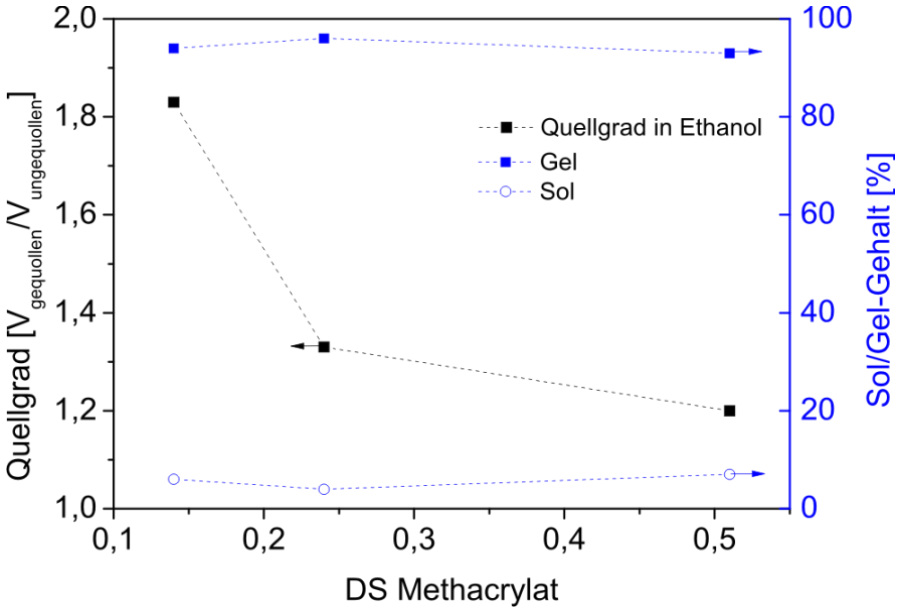


Abbildung 5-27 **Quellgrad der Partikel und Sol/Gel-Gehalt der Dispersionen, hergestellt aus Dex$B_{1,4}MA_x$ mit unterschiedlichem Substitutionsgrad mit Methacrylat.**

Der Quellgrad der Partikel in Ethanol nimmt deutlich mit steigendem Substitutionsgrad ab. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit zunehmender Substitution die Anzahl der Vernetzungspunkte pro Polymerkette zunimmt. Dadurch wird eine viel höhere Vernetzungsdichte der Partikel erreicht und das polymere Netzwerk kann deutlich weniger expandieren. Es ist damit möglich, die Quellbarkeit der Partikel durch den Substitutionsgrad der Methacrylatreste zu variieren. Die Sol/Gel-Gehalte der Dispersionen unterscheiden sich nicht untereinander. Es ist ein sehr hoher Gelanteil von ca. 95% bei allen Dispersionen zu beobachten. Die Vernetzungseffizienz ist demnach sehr hoch. Es werden zudem noch Dispersionen aus einer 2 gew.-%igen Lösung hergestellt und mittels REM auf die Veränderungen nach der Bestrahlung bzw. auf die Stabilität der Partikel in Lösungsmitteln untersucht. Die REM-Aufnahmen sind in Abbildung 5-28 zu sehen.

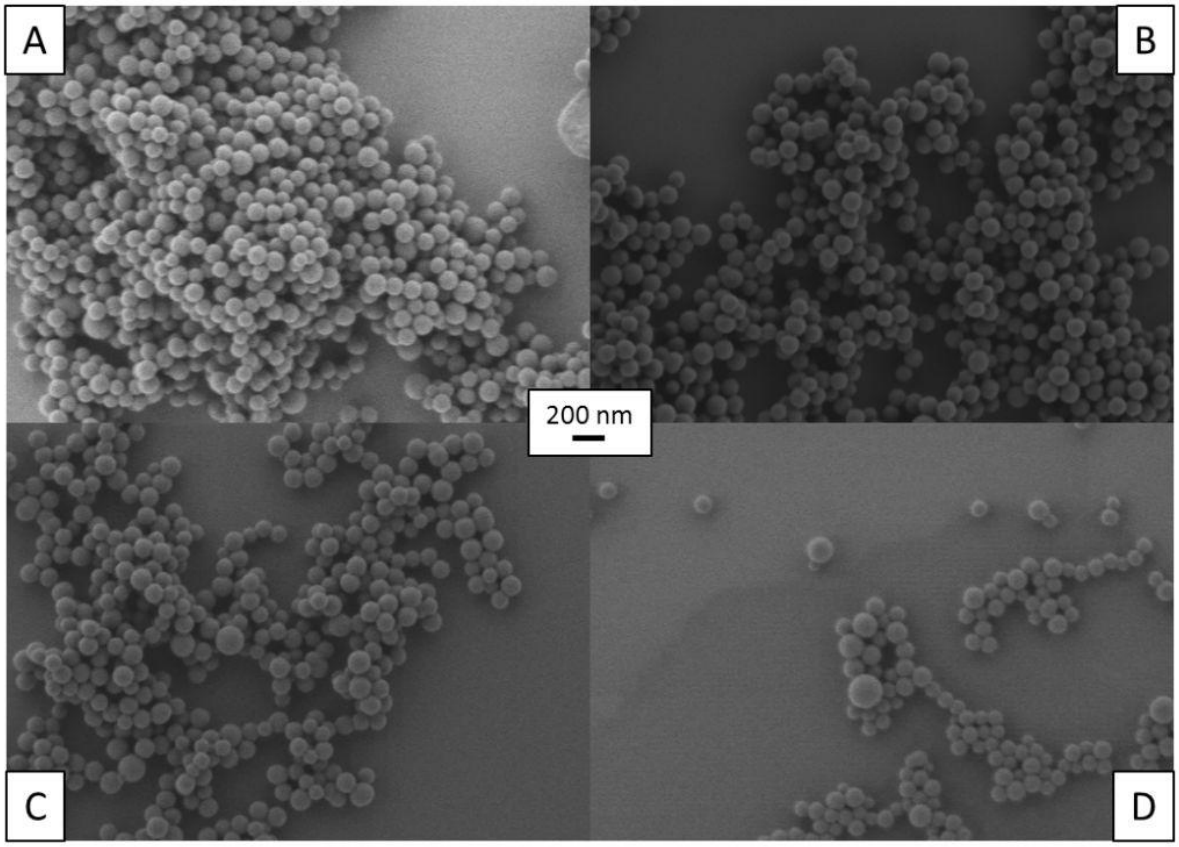


Abbildung 5-28 **Nanopartikel hergestellt aus einer 2 gew.-%igen Lösung. von 40kDex$B_{1,44}MA_{0,24}$; A) vor der UV-Bestrahlung, B) nach der UV-Bestrahlung aus wässrigen Dispersion, C) nach UV-Bestrahlung redispergiert in Ethanol und D) nach UV-Bestrahlung redispergiert in Aceton.**

Wie Abbildung 5-28 zeigt, ergibt sich durch die UV-Bestrahlung keine Änderung der Partikelgrößen. Das bedeutet die Quervernetzung findet auf einer intrapartikulären Ebene statt und führt nicht dazu, dass die Partikel agglomerieren und dadurch präzipitieren. Sie verbleiben dispergiert als nanopartikuläre Systeme.

5.2.3. Hydrogel-Nanopartikel mittels inversem polymeren Ouzo-Effekts

An dieser Stelle geht es um die Herstellung von Polymerpartikeln aus hydrophilen, bzw. Wasserlöslichen, Polymeren. Dazu wird ebenfalls der Ouzo-Effekt genutzt jedoch in einer anderen Zusammensetzung. Hierbei ist das organische Lösemittel

Aceton die kontinuierliche Phase und die wässrige Polymerlösung die disperse Phase. Eine zutreffende Bezeichnung für diese Versuchsreihe ist „Inverser Ouzo-Effekt“. Dieser Begriff leitet sich von der „inversen Emulsion“ ab. Diese besteht aus einer hydrophoben äußere Phase und einer hydrophilen inneren Phase und ist damit eine Wasser-in-Öl Emulsion. Genauso wie für den hier beschriebenen Effekt ist die äußere kontinuierliche Phase das organische Lösemittel Aceton und das Polymer ist wasserlöslich und liegt somit in dem Analogon, der inneren wässrigen Phase, vor. Der Bezug zur Emulsion ist bewusst gewählt, da sich beide Methoden zur Herstellung von nanopartikulären Hydrogelen eignen.

Dextrane als Hydrogel-Nanopartikel

Eine verbreitete Methode zur Herstellung von Hydrogel-Nanopartikeln ist der Prozess der inversen (Mini-)Emulsion[116]. Dabei wird das wasserlösliche Monomer bzw. Polymer in einem hydrophoben Medium dispergiert und unter Zuhilfenahme von Vernetzern entweder polymerisiert oder quervernetzt. Möchte man nun die Hydrogelpartikel als wässrige Dispersion verwenden, muss als nächster Schritt das Redispergieren aus der hydrophoben kontinuierlichen Phase in ein wässriges Milieu folgen. Die Aufreinigung (Entfernung von restlichem Comonomer) bzw. das Redispergieren in der wässrigen Phase ist ein recht langwieriger und aufwendiger Prozess.

Das Konzept des inversen Ouzo-Effekts bietet sich in manchen Fällen als Alternative für die Herstellung solcher Dispersionen an. Das vereinfacht die Prozessführung deutlich, denn die Herstellung der Dispersionen erfolgt durch das Zutropfen von einer wässrigen Lösung von hydrophilem Dextrylmethacrylat $DexMA_x$ in Aceton. Möchte man die Hydrogelpartikel in wässriger Phase haben, muss das Aceton entfernt werden. Diesem Schritt steht jedoch das Problem der Wasserlöslichkeit des Polymers entgegen. Dieses lässt sich durch einen einfachen und recht eleganten Weg lösen. Wie bereits bei den vernetzten DexBMA-Partikeln (Kapitel 5.2.2) verwendet man bei der Zubereitung der Dispersionen eine 0,2 gew.-%ige

acetonische Lösung des Photoinitiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon, dadurch lassen sich die Polymerketten in den Partikeln durch UV-Bestrahlung quervernetzen. Durch die Entfernung des Acetons aus der kontinuierlichen Phase erhält man stabile Dispersionen mit quervernetzten Hydrogel-Partikeln. Die Partikeldurchmesser werden mittels PCCS im gequollenen Zustand in wässriger Dispersion und mittels REM aus wässriger Dispersion im getrockneten Zustand auf den Partikeldurchmesser untersucht. Die REM-Aufnahmen aus Abbildung 5-29 zeigen die Hydrogel-Nanopartikel die mittels inversem Ouzo-Effekt hergestellt wurden.

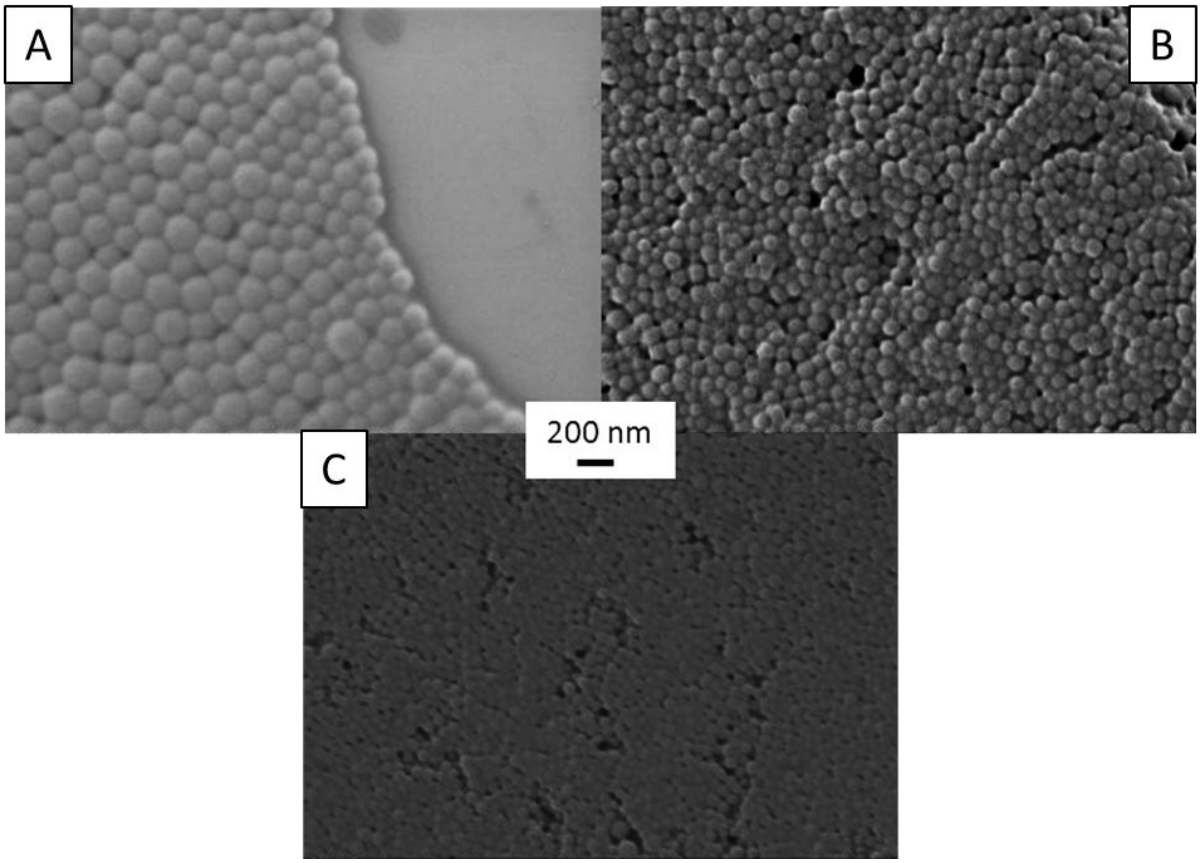


Abbildung 5-29 **REM-Aufnahmen der Hydrogel-Nanopartikel hergestellt mit dem inversen Ouzo-Effekt bei verschiedenen Konzentrationen des Polymers in Wasser: A) 0,81 B) 0,39 C) 0,04 Gew.-%.**

Diese weisen eine sehr hohe Einheitlichkeit der Partikelgrößen auf. Der Quellgrad wird wie in Gleichung (5-15) angegeben berechnet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse für diese Messreihe ist in Tabelle 5-14 dargestellt.

Tabelle 5-14 **Partikeldurchmesser der $DexMA_{0,10}$ Hydrogel-Nanopartikel nach UV-Vernetzung in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des Polymers in Wasser.**

Konzentration [Gew.-%]	d_{PCCS} [nm] x_{50}	d_{REM} [nm]	Quellgrad
0,04	117	64 ± 11	6,1
0,39	159	92 ± 16	5,1
0,81	275	162 ± 29	4,9
1,98	Instabil		
3,96	Instabil		

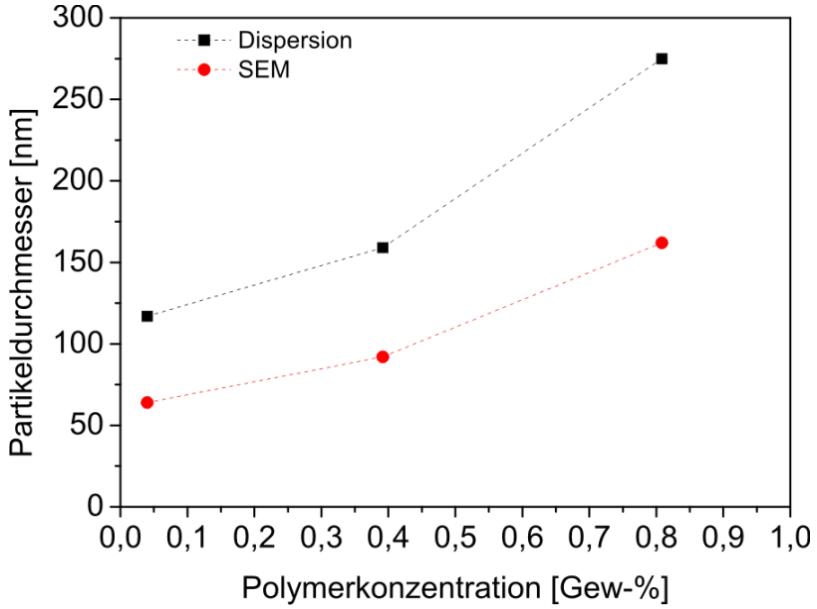


Abbildung 5-30 **Partikeldurchmesser der $DexMA_{0,10}$-Hydrogel-Nanopartikel nach UV-Vernetzung in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des Polymers in Wasser.**

Aus Abbildung 5-30 geht hervor, dass, wie schon bei der Herstellung der hydrophoben Nanopartikel (Kapitel 5.2.1) gezeigt, der Partikeldurchmesser mit der Ausgangskonzentration des Polymers in Lösung zunimmt. Die Erklärung hierfür ist die gleiche, die bereits oben diskutiert wurde. Der Ouzo-Bereich ist jedoch ein anderer, denn bereits bei ca. 2 Gew.-% des Polymers in Lösung ist die Dispersion nicht mehr stabil und die Partikel koagulieren. Für die Instabilität bei höheren Konzentrationen und für die Verschiebung des Ouzo-Bereichs sind die deutlich veränderten Eigenschaften des Polymers, aber auch eine andere Zusammensetzung des Systems verantwortlich. In dieser Versuchsreihe ist Aceton das Nichtlösemittel, deshalb können die hydrophoben Dextran-Derivate nur schwer damit verglichen

werden. Es ist weiterhin auch klar zu erkennen, dass der Wert für die Partikeldurchmesser aus den PCCS-Messungen in Dispersion deutlich höher liegt als der Wert, der aus den REM-Bildern ermittelt wurde. So sind beispielsweise bei der niedrigsten Konzentration (0,04 Gew.-%) die Partikel in Dispersion fast doppelt so groß (117 nm zu 64 nm), damit ist das durchschnittliche Volumen über das sechsfache höher als im kollabierten, trockenen Zustand. Das ist darauf zurückzuführen, dass das Hydrogel in wässriger Umgebung quillt und damit der hydrodynamische Radius bzw. der Durchmesser der Partikel zunimmt.

Stärke als Hydrogel-Nanopartikel

Das Konzept des inversen Ouzo-Effekts wird auch auf andere Polysaccharide übertragen. Es wird die Versuchsreihe mit modifizierter Stärke durchgeführt. Diese Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Nadya Pesce da Silveira von der Universidade Federal do Rio Grande do Sul in Porto Alegre, Brasilien durchgeführt. Für diese Untersuchung fiel die Wahl auf Stärke, da diese ubiquitär vorkommt und wirtschaftlich betrachtet eine deutliche Ausweitung der Einsatzmöglichkeiten bietet. Die hierfür benötigten Stärkederivate $StaMA_x$ werden analog zu den Dextranderivaten synthetisiert und aufgereinigt. Die so hergestellte Methacrylat-funktionalisierte Stärke $StaMA_{0,32}$ wurde in 4 Konzentrationen (0,1, 1, 2, und 5 Gew.-%) in Wasser gelöst und in Aceton mit 0,2 Gew.-%er 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon zugetropft. Wie bei den Versuchsreihen mit DexMA wurde hier ebenfalls eine Trübung beobachtet. Diese Dispersionen werden mittels UV-Strahlung vernetzt und mittels REM vermessen. Die REM-Aufnahmen sind in Abbildung 5-31 dargestellt.

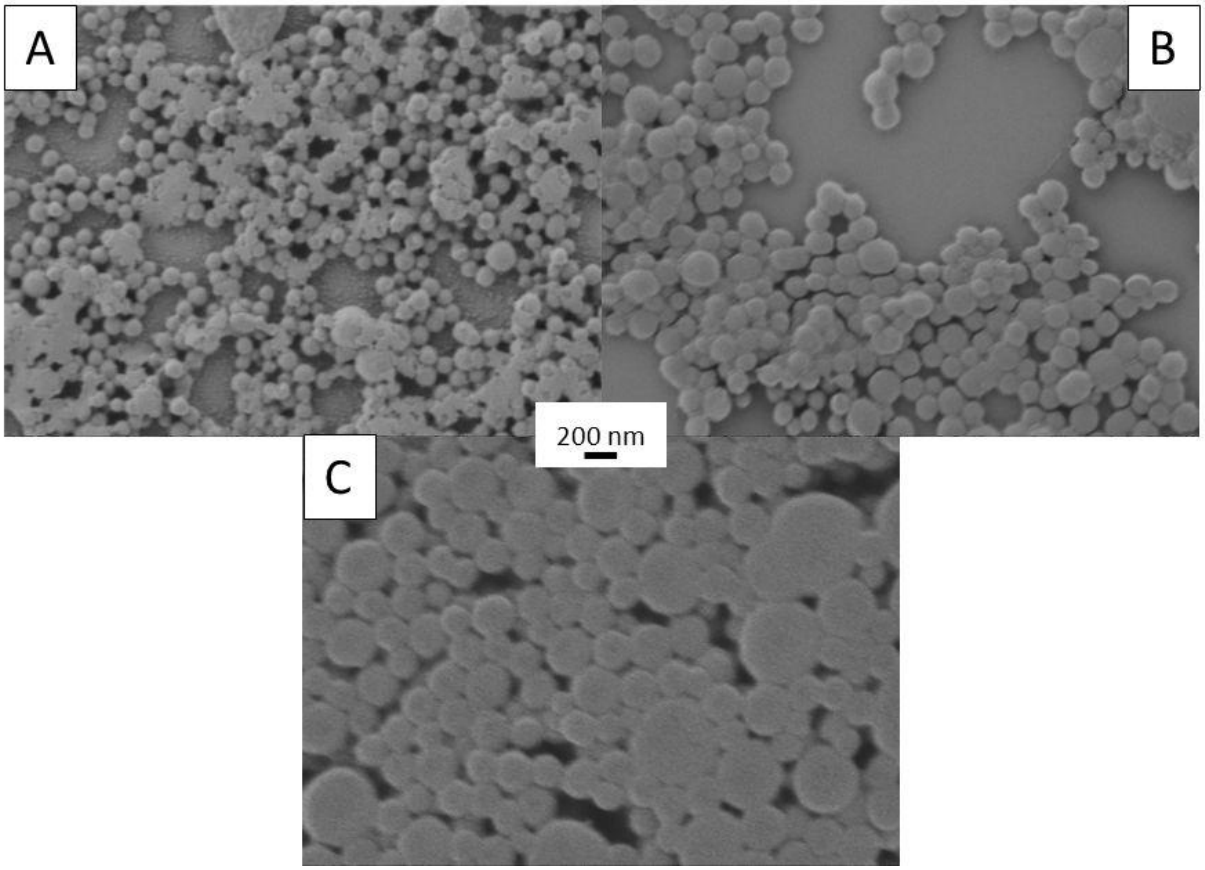


Abbildung 5-31 **Hydrogel-Nanopartikel aus $StaMA_{0,32}$, hergestellt über den inversen Ouzo-Effekt aus unterschiedlich konzentrierten Lösungen; A) 1 Gew.-%, B) 2 Gew.-% und C) 5 Gew.-%.**

Wie an den Aufnahmen in Abbildung 5-31 zu sehen ist, bilden sich nanopartikuläre Strukturen. Diese zeigen den bereits für die Dextranhydrogele festgestellten Trend der steigenden Partikeldurchmesser bei höher konzentrierten Ausgangslösungen (Tabelle 5-15). Der Bereich in dem mittels Ouzo-Effekt Nanopartikel erhalten werden können ist mit bis zu 5 Gew.-% aber deutlich größer als der für die Dextran-Hydrogel-Nanopartikel.

Tabelle 5-15 **Partikelgrößen im Zusammenhang mit der Konzentration der $StaMA_{0,32}$ Lösung (bestimmt aus REM-Aufnahmen).**

Konzentration [Gew.-%]	d_{REM} [nm]
1	95 ±17
2	143 ±34
5	230 ±78

5.2.4. Verkapselung von Farbstoffen in einer Polysaccharidmatrix

In einigen Publikationen wird von der Einkapselung von hydrophoben pharmazeutischen Wirkstoffen mithilfe des polymeren Ouzo-Effekts in eine Polymermatrix berichtet[87, 117, 118]. Die dafür verwendeten Polymere sind aufgrund ihrer Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit häufig PLA oder PLGA[87]. Diese sind als reine Trägersysteme durchaus geeignet, jedoch chemisch nicht mehr weiter modifizierbar und somit in ihrer Flexibilität eingeschränkt. Deshalb könnte ein auf modifizierbarem Polysaccharid basierendes System für spezielle Anwendungen vom Vorteil sein. Hierfür werden Modellsysteme aus einem mittels Fluoresceinisothiocyanat markierten Dextran-Derivat (FITC-40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$) und/oder der rot-fluoreszierenden Modellverbindung für einen beliebigen hydrophoben Wirkstoff, dem „BODIPY – B612-MA“ (Abbildung 5-32), hergestellt. Diese Systeme wurden mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) untersucht.

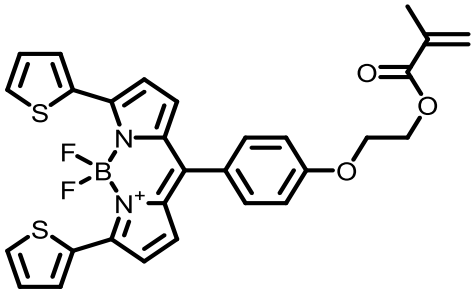


Abbildung 5-32 BODIPY- B612-MA - Dipyrromethen BF_2, fotostabiler Farbstoff[119].

Je nach Modifizierung des Polymers und des Einsatzes von BODIPY-Farbstoff können drei Ansätze verfolgt werden. Zum einen ist die Herstellung einer Dispersion aus dem FITC-40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ allein oder aus FITC-40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ und dem BODIPY-Farbstoff oder die Herstellung aus 40kDex$B_{1,12}MA_{0,22}$ und dem Farbstoff möglich. Diese drei hergestellten Dispersionen sind in Abbildung 5-33 zu sehen.

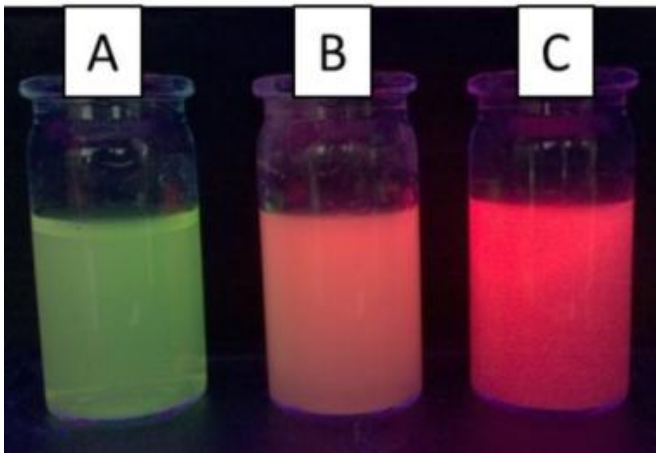


Abbildung 5-33 Fluoreszierende Dispersionen hergestellt mittels polymeren Ouzo-Effekts mit unterschiedlichen Zusammensetzungen von Farbstoffen unter UV-Licht (λ=365 nm). A) FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$, B) FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ und BODIPY-Farbstoff und C) 40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ und BODIPY-Farbstoff.

Die drei in Abbildung 5-33 dargestellten Dispersionen zeigen unter UV-Licht (λ = 365 nm) unterschiedliche Fluoreszenz. Dispersion A ist aus FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ hergestellt und zeigt dadurch eine grüne Fluoreszenz, Dispersion C besteht aus dem nicht fluoreszierenden 40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ und dem BODIPY-Farbstoff weist dadurch rote Fluoreszenz auf. Dispersion B besteht sowohl aus FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ als auch aus dem BODIPY-Farbstoff und hat eine Mischfarbe der Dispersionen A und C. Die Fluoreszenzemissionsspektren der drei Dispersionen sind in Abbildung 5-34 zu sehen.

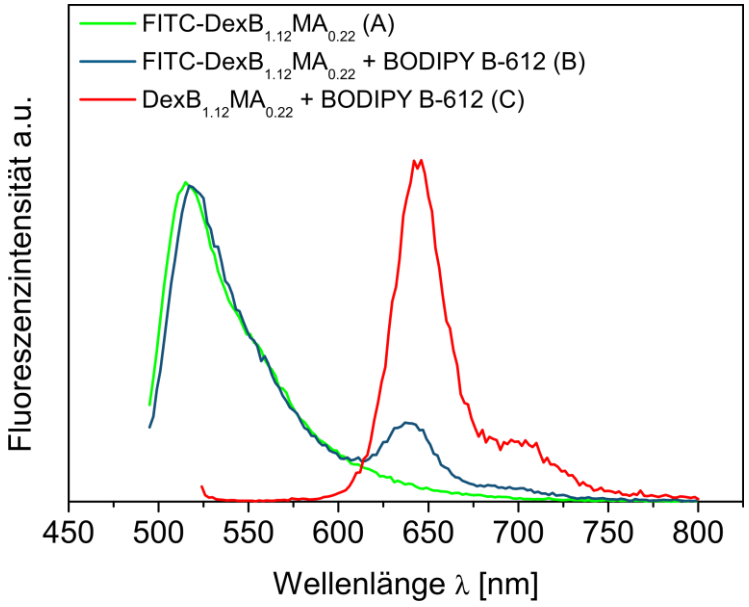


Abbildung 5-34 **Fluoreszenzemissionsspektren der in Abbildung 5-33 gezeigten Dispersionen A) FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ (Anregung bei λ = 495 nm, grün), B) FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ und BODIPY-Farbstoff (Anregung bei λ = 495 nm blau) und C) 40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ und BODIPY-Farbstoff (Anregung bei λ = 612 nm rot).**

Die Emissionsspektren A und C zeigen nur die Emissionsmaxima der jeweiligen Farbstoffe; zum einen FITC mit 515 nm und zum anderen BODIPY B-612 MA mit 630 nm. Bei der Mischdispersion B sind beide Peaks zu erkennen. Das bedeutet, dass beide Farbstoffe in Dispersion sind, da der BODIPY-Farbstoff sich nicht in Wasser löst. Dieser muss demnach entweder selbst partikulär vorliegen, mit den Polymerpartikeln assoziiert vorliegen oder in den Polymerpartikeln eingebettet sein. Deshalb gilt es diesen Sachverhalt zu untersuchen. Da man hier zwei Farbstoffe mit unterschiedlichem Fluoreszenzspektrum verwendet hat, ist es nun möglich, mithilfe der FCS die Diffusionskoeffizienten beider Farbstoffe zu messen und miteinander zu vergleichen, um dadurch eine Aussage treffen zu können, ob die Farbstoffe miteinander assoziiert sind. Da der BODIPY-Farbstoff eine extrem geringe Wasserlöslichkeit aufweist, muss die Diffusion eines Farbstoffmoleküls in Lösung durch ein Modellsystem bestimmt werden. Da die Diffusion vom Molekulargewicht abhängt, wird ein wasserlöslicher Farbstoff mit ähnlichem Molekulargewicht und Emissionsmaximum wie BODIPY B-612 MA in wässriger Lösung vermessen. Diese Voraussetzungen erfüllt der Farbstoff Alexa Fluor 647. Aus denselben Gründen wie

für den BODIPY-Farbstoff muss die Kalibrierung für den freien FITC-Farbstoff über Rhodamin 6G erfolgen. Anschließend wird Dispersion B aus Abbildung 5-33 bei den beiden für die Kalibrierung verwendeten Wellenlängen (FITC: λ_{ex} 488 nm, BODIPY: λ_{ex} 633 nm) vermessen. Es wird einerseits der Diffusionskoeffizient des Partikels anhand der Diffusion von FITC, das an die Polymerhauptkette gebunden ist, bestimmt. Weiterhin wird der Diffusionskoeffizient des BODIPY B-612 MA bestimmt. Aus den bestimmten Diffusionskoeffizienten lassen sich über die Diffusionsgeschwindigkeiten die hydrodynamischen Radien der gemessenen Farbstoffe bzw. Partikel ermitteln. Darüber lässt sich eine Aussage treffen, ob der Farbstoff mit dem Partikel assoziiert ist. Stimmt die Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Farbstoffe überein, so kann man davon ausgehen, dass die beiden Farbstoffe innerhalb eine Partikels vorliegen bzw. miteinander assoziiert sein müssen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5-35 dargestellt.

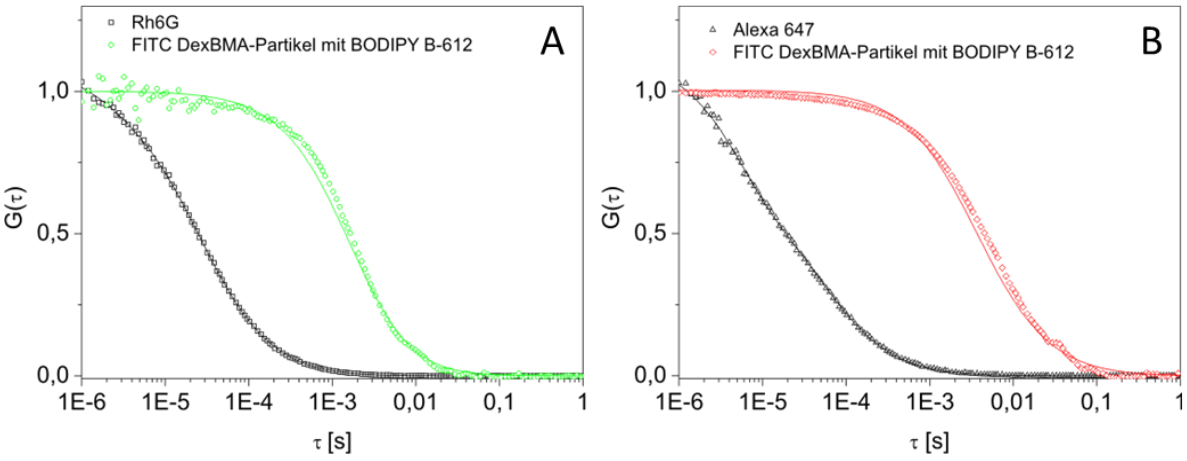


Abbildung 5-35 **A) Diffusionszeiten des freien Farbstoffs Rhodamin 6G (schwarz) und der FITC-40kDexBMA-Partikel in Dispersion (grün) B) Diffusionszeiten des freien Farbstoffs Alexa Fuor 647 (schwarz) und vom BODIPY B-612 MA in den FITC-40kDexBMA-Partikeln in Dispersion (rot).**

Aus den Auftragungen in Abbildung 5-35 ist ersichtlich, dass die Diffusionkoeffizienten der freien Farbstoffe, die als Referenz vermessen wurden, deutlich geringer sind als die für die Dispersion bestimmten Werte. Daraus lässt sich bei Kenntnis der hydrodynamischen Radien (bzw. Durchmesser) der freien

Farbstoffe (d_h(Alexa 647) = 1,36 nm, d_h(Rhodamin 6G) = 1,10 nm) auf die hydrodynamischen Radien der in der Dispersion befindlichen Partikel schließen. Die dabei erhaltenen Werte stimmen mit d_h(FITC-40kDexBMA-Partikel) = 100 nm und d_h(BODIPY B-612 MA in Dispersion) = 104 nm relativ gut mit dem mittels PCCS ermittelten Wert von d_{PCCS} = 129 nm überein. Diese Messung zeigt, dass der BODIPY-Farbstoff im FITC-markierten Partikel in Dispersion vorliegt. So lässt sich eine hydrophobe Verbindung mittels Ouzo-Effekt mit einem Partikel assoziieren und somit in wässriger Umgebung dispergieren.

Die Dispersionen mit eingebettetem BODIPY B-612 MA werden auf die Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Konzentration des Polymers untersucht. Bei der Herstellung der fluoreszierenden Dispersionen wird ebenso wie in den Kapiteln zuvor verfahren. Es wird eine Lösung des BODIPY-Farbstoffs (1,9 x10^{-8} mol/g) in Aceton hergestellt und anstelle des reinen Acetons als Lösemittel für das Polymer verwendet. Es werden 4 Konzentrationen von FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ (0,4, 1, 2 und 3 Gew.-%) untersucht. Die Partikelgrößen sind in Abbildung 5-36 dargestellt.

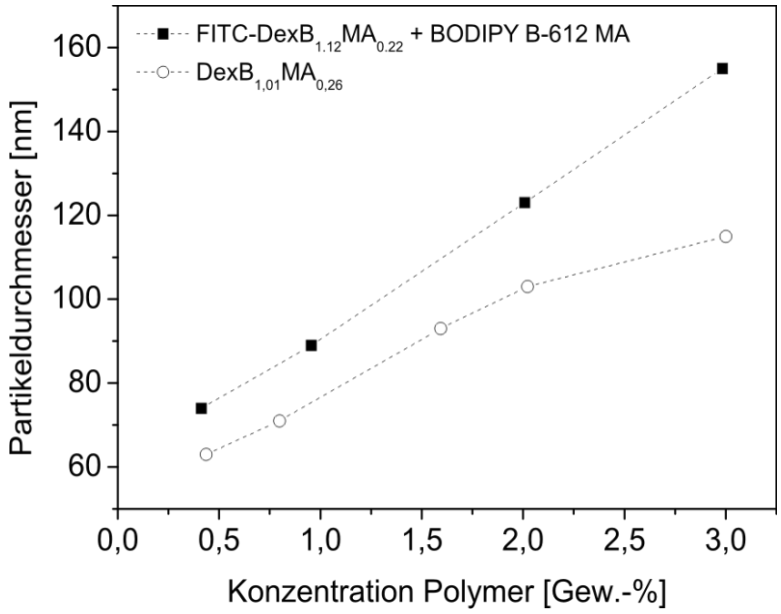


Abbildung 5-36 Zusammenhang zwischen Konzentration von FITC-40kDexB$_{1,12}$MA$_{0,22}$ in der zugetropften acetonischen Lösung mit BODIPY-Farbstoff und der mittels PCCS gemessenen Partikeldurchmesser.

Die Partikeldurchmesser sind nach Abbildung 5-36, wie bereits für die nicht fluoreszierenden Dextran-Derivate diskutiert, abhängig von der Konzentration der Polymerlösung. Es ist ein Anstieg der Durchmesser mit der Konzentration zu beobachten. Damit kann man die Größe von fluoreszierenden mit einem Farbstoff beladenen Nanopartikeln über den Ouzo-Effekt einstellen. Jedoch liegen die Partikeldurchmesser bei gleichen Konzentrationen der Polymere mit etwa 10-20 nm höher als bei den Partikeln ohne den Zusatz von Farbstoff.

5.2.5. Untersuchung des Zeta-Potentials der Dispersionen

Bei den mittels Ouzo Effekt hergestellten Dispersionen wird für die Herstellung kein zusätzliches Tensid gebraucht, deshalb wird eine sterische Stabilisierung durch die Polymere selbst angenommen. Dies wird dadurch unterstützt, dass sowohl modifizierte als auch unmodifizierte und somit hydrophile Bestandteile des Polymers vorhanden sind. Die hydrophilen Bestandteile können in die Wasserphase ragen und dadurch für die sterische Stabilisierung verantwortlich sein. Um aber die ionische Stabilisierung der Partikel auszuschließen, wird das Zeta-Potential der Dispersion bestimmt. Hierfür werden aus $DexB_xMA_y$ mit unterschiedlichem Substitutionsgrad Dispersionen hergestellt und am Malvern Zeta-Sizer wird deren Zeta-Potential bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 5-15 dargestellt.

Tabelle 5-4 Zeta-Potential der Partikel aus $40kDexB_xMA_y$ mit unterschiedlichem Substitutionsgrad.

Polymer	Zeta-Potential [mV]	d_{PCCS} [nm]
$40kDexB_{0,61}MA_{0,20}$	0,196	98
$40kDexB_{0,84}MA_{0,23}$	0,049	98
$40kDexB_{1,13}MA_{0,22}$	-0,232	99
$40kDexB_{1,29}MA_{0,26}$	-0,214	100
$40kDexB_{1,62}MA_{0,28}$	0,514	104

Wie man an den Werten aus Tabelle 5-15 erkennen kann, sind die Zeta-Potentiale nahezu 0 mV. Bei einer Standard-Miniemulsion mit SDS als Tensid, also bei einer ionisch stabilisierten Dispersion, lassen sich typischerweise Werte niedriger

als - 30 mV messen[120]. Bei Werten um 0 mV kann man eine ionische Stabilisierung ausschließen.

5.2.6. Enzymatischer Abbau der Dextranderivate

Wie im Theorieteil bereits beschrieben, ist das native Dextran ein durch das Enzym Dextranase abbaubares Polymer. Das Polysaccharid wird durch diese 6-α-D-Glucan-6-glucanohydrolase [EC 3.2.1.11] an der α-1,6-glycosidischen Bindung (Abbildung 5-37) gespalten.

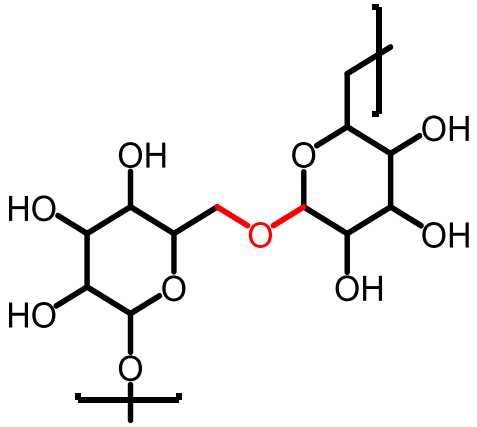


Abbildung 5-37 Dextran-Wiederholungseinheit mit der enzymspaltbaren α-1,6-glycosidischen Bindung in rot.

Als Abbauprodukte entstehen bei nativem Dextran Isomaltotriose, Isomaltose und Glucose. Hier gilt es, die generelle Abbaubarkeit der hydrophobisierten Derivate zu untersuchen. Dextranasen sind normalerweise in wässriger Umgebung aktiv. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der hydrophobisierten Dextran-Derivate in Wasser, muss das Reaktionsmedium zu DMF geändert werden. Erst dann kann die Abbaubarkeit der hydrophoben Derivate $DexB_xMA_y$ gemessen werden. Dazu wird zunächst die Aktivität der Dextranase in DMF anhand nativen Dextrans untersucht. Aus Gel-Permeationschromatogrammen, aufgenommen in DMF, wird das Molekulargewicht des Dextrans im Verlauf der Zeit bestimmt. Bereits nach einer Stunde fällt das anfänglich gemessene Molekulargewicht von unmodifiziertem

Dextran von 35000 g/mol auf 780 g/mol. Damit ist klar, dass eine Aktivität dieses Enzyms in DMF vorhanden ist. Für die Untersuchung des enzymatischen Abbaus der hydrophoben Derivate werden zwei unterschiedliche Substitutionsgrade (40kDexB$_{0,97}$MA$_{0,23}$ und 40kDexB$_{1,24}$MA$_{0,21}$) gewählt und dem Abbau unterzogen. Es wird dabei genauso wie für das native Dextran verfahren, es werden 10 ml Lösungen dieser Polymere mit einer Konzentration von 1 Gew.-% in DMF hergestellt. Diese Lösungen werden mit 1 µL Dextranase aus *chaetomium erraticum* versetzt und bei 40 °C in einem Thermoschüttler geschüttelt. Nach bestimmten Zeiten (2,5 h, 14 h, 120 h und 550 h) werden Proben für eine GPC-Messung entnommen und das Molekulargewicht in Abhängigkeit von der Reaktionszeit untersucht. Die Ergebnisse der Messreihen sind in Abbildung 5-38 dargestellt.

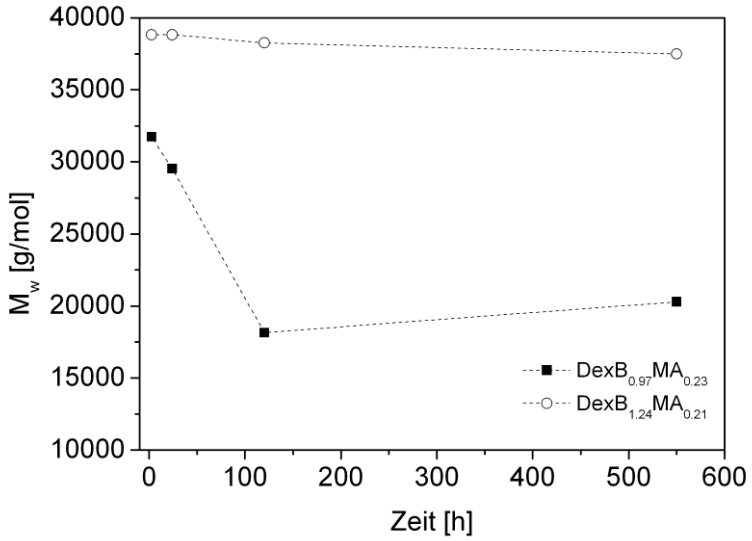


Abbildung 5-38 Molekulargewicht der hydrophoben Derivate 40kDexB$_{0,97}$MA$_{0,23}$ (volle Quadrate) und 40kDexB$_{1,24}$MA$_{0,21}$ (hohle Kreise) im Zeitverlauf nach Zugabe des Enzyms Dextranase aus *chaetomium erraticum.*

Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Reaktion in Abbildung 5-38 zeigt den Abfall des Molekulargewichtes von 40kDexB$_{0,97}$MA$_{0,23}$. Das 40kDexB$_{0,97}$MA$_{0,23}$ wird nach etwa 100 h bis zu einem Molekulargewichtsmittel von etwa 18 000 g/mol degradiert. Das ist zum einen um ein Vielfaches langsamer als beim nativen Dextran, welches bei gleichen Bedingungen bereits nach einer Stunde vollständig abgebaut war. Zum

anderen scheinen die hydrophoben Funktionalisierungen auch einen Einfluss auf das finale Abbauprodukt zu haben. Das Molekulargewicht fällt letztlich nicht auf einen Wert, wie er beim nativen Dextran gemessen wurde. Es bleibt ein Polymer mit 18 000 g/mol nach dem enzymatischen Abbau zurück. Keine Veränderung des Molekulargewichts zeigt hingegen das 40kDex$B_{1,24}MA_{0,21}$. Hier ist offensichtlich der Substitutionsgrad zu hoch, so dass das Enzym die Struktur des Polymers nicht mehr erkennen kann.

5.2.7. Ausblick

Diese Arbeit legt einen soliden Grundstein für die Fortführung der Untersuchung des Ouzo-Effekts und der dafür verwendeten Materialien. Deshalb werden in diesem Abschnitt noch laufendende Untersuchungen kurz aufgeführt, um damit einen Ausblick auf die Fortsetzung dieser Arbeit zu geben.

Es ist bereits gezeigt, dass die Herstellung der Nanopartikel mittels polymeren Ouzo-Effekts mit modifizierten Dextranen funktioniert. Dies ist aber nur eines der untersuchten Polymere, in der Weiterführung dieser Arbeit geht es darum, weitere natürliche Polysaccharide zu untersuchen. Beispielsweise ist eine Kooperation mit Prof. Dr. Nadya Pesce da Silveira von der Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasilien begonnen worden, bei der es darum geht, die in Brasilien in sehr hohen Mengen hergestellte Stärke als Material für die Nanopartikelherstellung zu untersuchen. Erste Ergebnisse für die Herstellung der Hydrogel-Nanopartikel zeigen das Potential dieser Zusammenarbeit bereits. Es wird weiter versucht auch Nanopartikeln aus hydrophober Stärke mittels Ouzo-Effekt zu erhalten. Erste Ergebnisse sind in Abbildung 5-39 gezeigt.

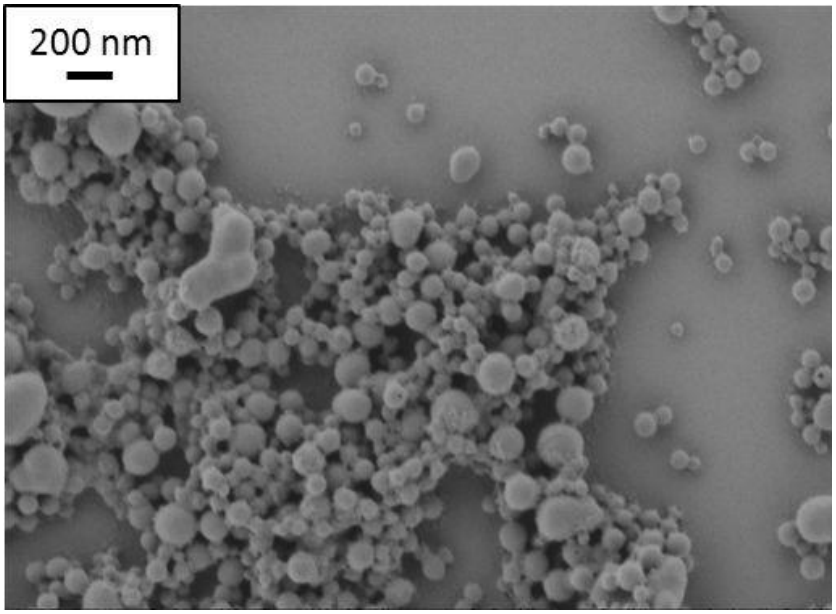


Abbildung 5-39 Nanopartikel hergestellt aus einer 2 gew.-% igen StaBMA Lösung in Aceton.

Abbildung 5-39 zeigt eine breite Partikelgrößenverteilung und auch teilweise größere nicht sphärische Aggregate. Die Stärke, die hier verwendet wurde, ist jedoch noch nicht gänzlich charakterisiert und kann Verunreinigungen enthalten. Dies gilt es weiter und genauer zu charakterisieren und zu analysieren.

Ein weiteres Polymer, das von Interesse ist, ist das Pullulan, welches ebenfalls zur Herstellung von Hydrogel- und hydrophoben Nanopartikeln genutzt werden kann. Beispiele dazu sind in Abbildung 5-40 zu sehen.

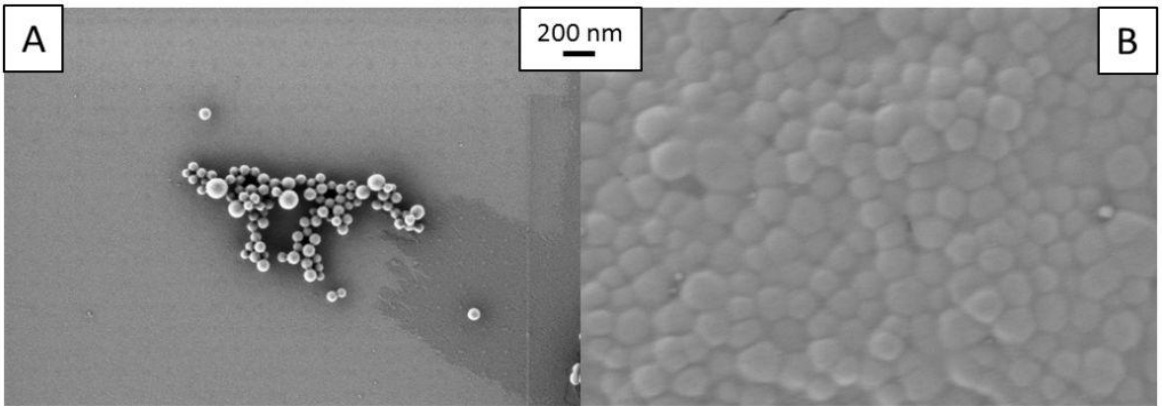


Abbildung 5-40 Nanopartikel hergestellt aus A) PullBMA und B) PullMA.

Dies sind lediglich erste Ergebnisse, und es gilt, das System der Pullulanpartikel weiter systematisch zu untersuchen und zu charakterisieren.

Weiterhin sind rasterkraftmikroskopische-Untersuchungen der Nanopartikel in Kooperation mit Marcin Makowski (AK Butt – MPIP) im Gange. Hier ist bei ersten Tests festgestellt worden, dass mit höherem Substitutionsgrad an Benzoesäure ein weicheres Material als bei niedrigerem Substitutionsgrad vorliegt. Die Kraft-Abstands-Kurven sind in Abbildung 5-41 zu sehen.

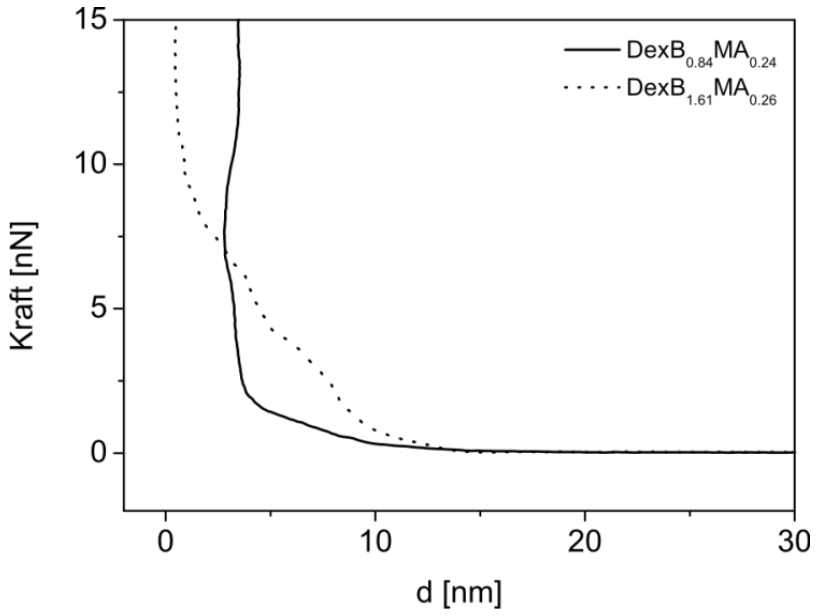


Abbildung 5-41 Kraft-Abstands-Kurven von Partikeln hergestellt aus 40kDexB$_{0,84}$MA$_{0,24}$ und 40kDexB$_{1,61}$MA$_{0,26}$ im Annäherungsmodus.

Das Ergebnis dieser Messung kann damit erklärt werden, dass durch Substitution der Hydroxylgruppen des Dextrans weniger Wasserstoffbrückenbindungen aufgebaut werden können, dadurch die Kettenbeweglichkeit steigt und die Ketten dadurch mit weniger Energieaufwand gegeneinander verschoben werden können. Dies gilt es in weiteren Experimenten zu untersuchen und zu belegen.

Eine weitere Versuchsreihe, die einen Einblick in den Mechanismus der Partikelbildung geben könnte, ist die Herstellung der Partikel aus zwei

unterschiedlich fluoreszenzmarkierten DexBMA-Derivaten. Die Herstellung von Partikeln mit FITC-DexBMA ist bereits gezeigt worden. Als weitere Untersuchung ist denkbar, das gleiche Ausgangspolymer mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, der sein Emissionsmaximum bei einer anderen Wellenlänge hat, beispielsweise Rhodamin-B (RITC-DexBMA). Dadurch kann bei Zugabe von RITC-DexBMA-Lösung zu einer aus FITC-DexBMA hergestellten Dispersion mittels FCS untersucht werden, ob sich das RITC-DexBMA an die bereits vorhandenen Partikel anlagert oder selbst Partikel ausbildet.

5.3. Stabilisierung von Emulsionen mittels modifizierten Dextranen

Der Nachweis, dass teilmodifizierte Dextrane als oberflächenaktive Substanzen zu fungieren können, ist bereits der Arbeitsgruppe von Edith Dellacherie gelungen. Diese beschreiben den Einsatz niedrig-substituierter Dextranether des Benzylalkohols, um Styrol-Emulsionen[31] während der Polymerisation zu stabilisieren. Diese Entdeckung kann durch die Verwendung von Methacrylsäure-funktionalisierten Dextranen erweitert werden. Diese zeigen ebenfalls eine Oberflächenaktivität und besitzen zudem polymerisierbare Gruppen. Das eröffnet nicht nur die Möglichkeit, Emulsionen zu stabilisieren, sondern auch das Dextran an die Partikeloberfläche kovalent anzubinden.

5.3.1. Oberflächenspannung der Lösungen der polymeren Stabilisatoren

Da die Stabilisierung mit Benzylethern des Dextrans untersucht wurde, gilt es nun, die Oberflächenaktivität von DexMA zu untersuchen. Hierzu werden die modifizierten Dextrane in Wasser gelöst und diese Lösungen mittels eines Ringtensiometers nach Du Noüy vermessen. Hierbei wird sowohl der Konzentrationseinfluss als auch der Einfluss des Substitutionsgrades beleuchtet. Die hierfür verwendeten Polymere sind nur mit Methacrylatresten in unterschiedlichen Substitutionsgraden modifiziert. Es wurden DexMA mit einem Molekulargewicht von ca. 6 000 g/mol synthetisiert, da diese bei Vorversuchen die beste Stabilisierung der Styrol-Emulsion zeigten. Versuche, die Emulsionen mit 40kDexMA zu stabilisieren, scheiterten. Die verwendeten Konzentrationen und die gemessenen Werte für die Oberflächenspannungen sind in Tabelle 5-16 und Abbildung 5-42 dargestellt.

Tabelle 5-5 **Oberflächenspannungen der jeweiligen Dextranderivate bei unterschiedlichen Konzentrationen.**

6kDexMA$_{0,09}$ HLB 12,4		6kDexMA$_{0,14}$ HLB 12,3	
Konz. [Gew.-%]	σ [mN/m]	Konz. [Gew.-%]	σ [mN/m]
1,01	65,89	1,02	64,42
1,98	59,97	1,97	58,13
2,95	58,98	2,96	56,89
4,98	59,79	4,94	57,4
6kDexMA$_{0,29}$ HLB 12,2		6kDexMA$_{0,46}$ HLB 12,0	
Konz. [Gew.-%]	σ [mN/m]	Konz. [Gew.-%]	σ [mN/m]
1,02	58,79	1,00	56,91
1,99	56,93	1,99	54,49
2,98	54,86	3,00	53,48
5,00	52,64	4,98	51,16

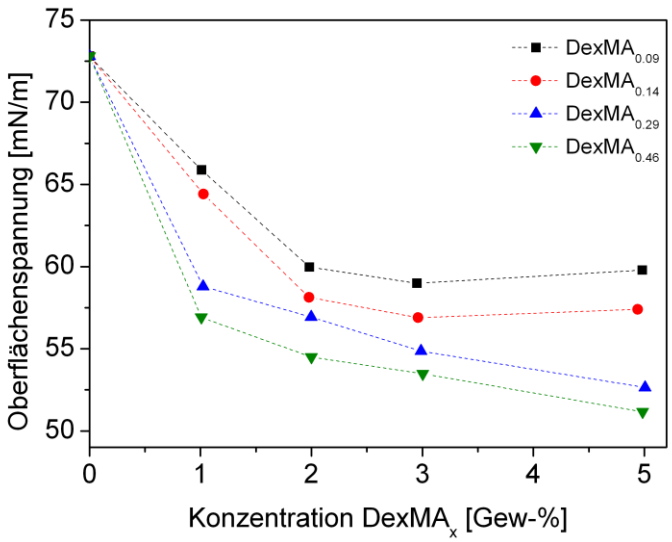


Abbildung 5-42 **Oberflächenspannungen der wässrigen Lösungen von unterschiedlich stark substituierten 6kDexMA (6kDexMA$_{0,09}$ – schwarz, 6kDexMA$_{0,16}$ – rot, 6kDexMA$_{0,29}$ – blau, 6kDexMA$_{0,46}$ – grün) bei unterschiedlichen Konzentrationen.**

In Abbildung 5-42 wird deutlich, dass mit steigender Konzentration die Werte für die Oberflächenspannung sinken. Dieser Sachverhalt findet sich ebenfalls bei Messungen von Tensid-Lösungen. Es ist auch anzumerken, dass mit steigendem Substitutionsgrad der Wert für die Oberflächenspannung stärker sinkt. Der für 6kDexMA$_{0,09}$ bei 5% gemessene Wert von 59,79 mN/m ist lediglich 13 mN/m geringer als der Wert für Wasser. Jedoch sinkt der Wert mit steigenden

Substitutionsgrad bis auf 51,16 mN/m für 6kDexMA$_{0,49}$. Verglichen mit dem Wert für reines Wasser ist das eine Absenkung um 22 mN/m, also etwa 30%, und damit wird fast doppelt so viel wie für 6kDexMA$_{0,09}$ gemessen. Die Oberflächenaktivität erhöht sich mit steigenden hydrophoben Anteilen im Polymer. Das erscheint sinnvoll, da man für eine Amphiphilie sowohl hydrophile als auch hydrophobe Segmente benötigt. Die HLB-Werte für diese vier Polymere liegen bei 12. Dies wird in der Literatur als geeigneter Bereich für Tenside beschrieben, um eine Öl-in-Wasser-Emulsion zu stabilisieren[57]. Näherungsweise kann man sagen, je mehr hydrophobe Bestandteile ein hydrophiles Polymer aufweist, desto eher wird es sich an der Grenzfläche Wasser/Luft orientieren und dadurch die Oberflächenspannung dieser Lösung absenken. Es ist also auch möglich, dass es sich an einer flüssig/flüssig Grenzfläche anordnet. Dies gilt es mit weiteren Versuchen zu belegen. Dazu eignen sich heterogene Systeme wie z.B. Emulsionen, in welchen die generierte flüssig/flüssig Grenzfläche durch Tenside oder polymere Stabilisatoren aufrechterhalten werden muss.

5.3.2. Herstellung von Polystyrol-Nanopartikeln mit DexMA als polymerem Stabilisator

Die Tatsache, dass die modifizierten Dextrane eine Oberflächenaktivität aufweisen, kann man sich zunutze machen und diese als Stabilisatoren für die radikalische Polymerisation in einer (Mini)-Emulsion verwenden. Dazu werden nach dem Rezept für eine Styrol-Miniemulsion die Emulsionen hergestellt und das 6kDexMA$_{0,20}$ als Stabilisator verwendet. Die Konzentration des polymeren Stabilisators in der wässrigen Phase wird dabei variiert und der Einfluss auf die Partikelgröße untersucht. In Abbildung 5-43 und Abbildung 5-44 sind die Ergebnisse und elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Versuchsreihe gezeigt.

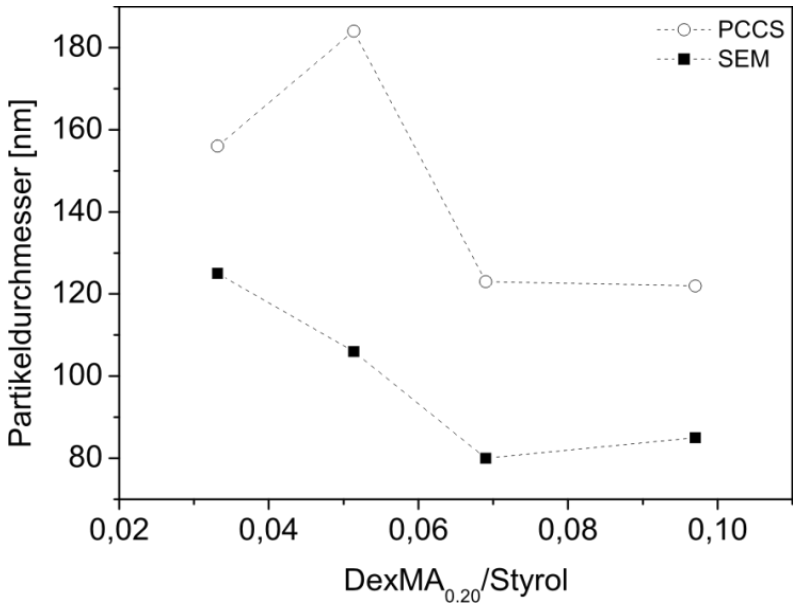


Abbildung 5-43 Partikelgrößen der Dispersionen hergestellt durch den Miniemulsionsprozess, in Abhängigkeit vom DexMA-Gehalt im Verhältnis zum Styrol, mit 6kDexMA$_{0,20}$ als polymerem Stabilisator der Partikel.

Wie man Abbildung 5-43 entnehmen kann, liegen die für dieses System mittels PCCS gemessenen Partikelgrößen zwischen 186 und 120 nm. Die im getrockneten Zustand gemessenen Partikel haben eine Größe zwischen 130 und 80 nm, wobei mit steigendem DexMA-Gehalt die Partikelgrößen sinken. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Durand et al.[34], welche, bei einer Miniemulsionspolymerisation ebenfalls eine Abnahme der Partikelgrößen mit steigender Konzentration an hydrophobisiertem Dextran beschreiben. Der in wässriger Dispersion gemessene Größenunterschied zu den Werten für die REM-Auszählung kann durch den hydrophilen Charakter der DexMA-Stabilisatoren erklärt werden. Diese bilden in wässriger Umgebung eine Schicht aus gequollenem Polymer um die Partikel, welche den gemessenen Durchmesser vergrößert. Diese Schicht kollabiert beim Trocknen und lässt den Partikel dadurch in den REM-Aufnahmen in Abbildung 5-44 kleiner erscheinen als durch PCCS bestimmt.

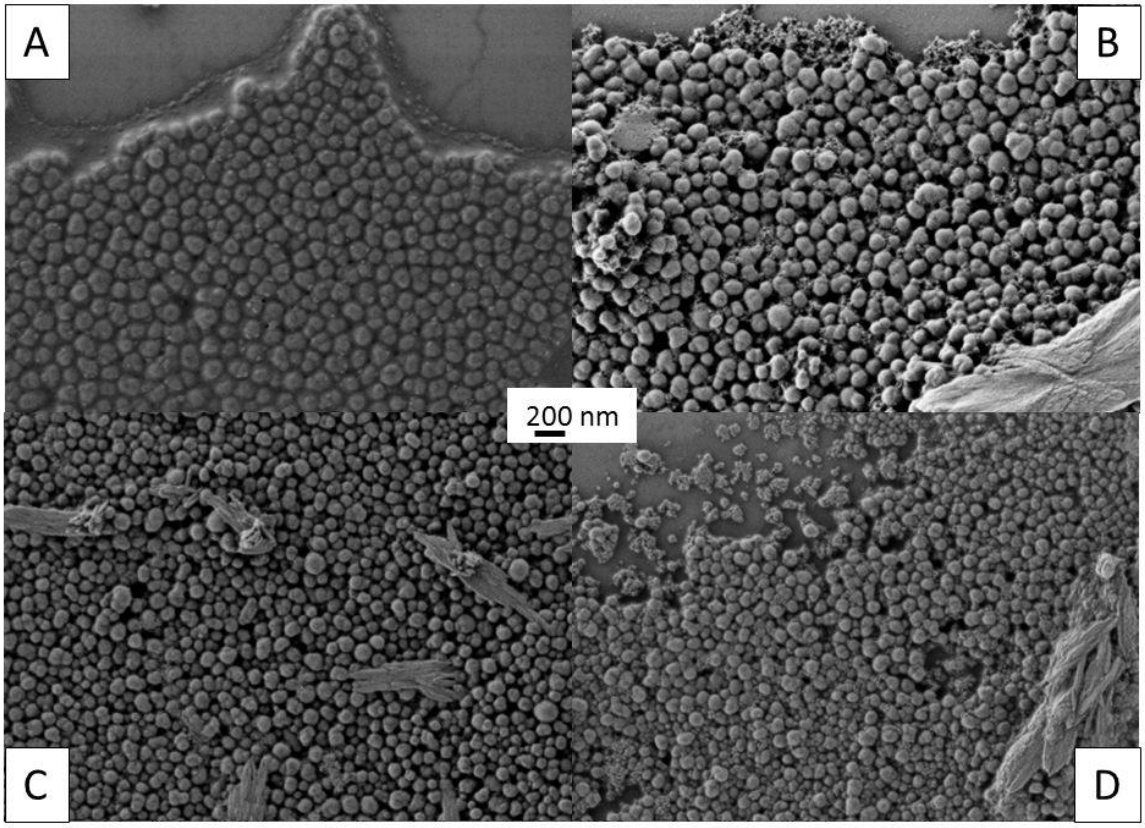


Abbildung 5-44 REM-Aufnahmen der Partikel aus der Emulsionspolymerisation mit unterschiedlichem Tensid-Gehalt A) 3,5% B) 5% C) 7% und D) 10%.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 5-44 zeigen Polystyrol-Nanopartikel, die mit unterschiedlichen DexMA-Gehalten hergestellt wurden. Es sind annähernd sphärische Partikel mit Unregelmäßigkeiten zu erkennen. Die Unregelmäßigkeiten deuten an, dass mehrere Partikel aneinander gebunden vorliegen. Eine Erklärung für diese Erscheinung ist, dass die DexMA-Stabilisatoren selber polymerisierbar sind. Es können durch interpartikuläre Polymerisation von bereits an Partikel gebundenem DexMA Agglomerate von Partikeln entstehen, die eine solche Struktur erklären können.

Es wurden neben Styrol noch weitere Monomere verwendet, um Nanopartikel mittels einer Emulsionspolymerisation zu erhalten. Allerdings konnten Methylmethacrylat, Butylmethacrylat und Laurylmethacrylat nicht stabilisiert werden und bildeten makroskopische Aggregate am Gefäßboden.

5.4. Enzymatische Reaktionen in wässriger Miniemulsion

5.4.1. Enzymatische Veresterung

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde bereits die Veresterung mit Lipasen in der Heterophase, im Speziellen der Miniemulsion, gezeigt[121]. Die Enzymkatalyse hat sich als sehr effiziente Methode zur Veresterung von Carbonsäuren (C6-C12) mit sowohl kurzkettigen aliphatischen (C2 und C6) als auch mit aromatischen (C1-C5) Alkoholen (Abbildung 5-45) erwiesen. Es sind nach sehr kurzer Reaktionszeit (20 min) bereits Esterausbeuten von über 80% erreicht worden. Dabei kann die Reaktion bei Raumtemperatur ablaufen. Die Reaktionszeit kann über die Enzymmenge gesteuert werden. Weiterhin kann eine Substratspezifität festgestellt werden. Die Nonansäure hat sich dabei, als das Substrat mit der höchsten Reaktionsrate, herausgestellt.

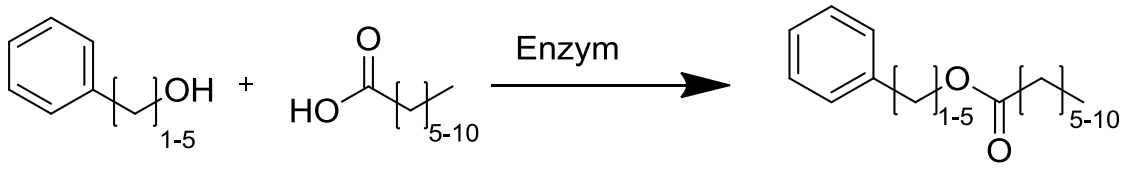


Abbildung 5-45 Reaktionsgleichung der Veresterung von aliphatischen Carbonsäuren mit aromatischen Alkoholen.

Es ist bekannt und im Theorieteil beschrieben, dass die Lipasen an Öl/Wasser-Grenzflächen aktiviert werden[122]. Daher gilt es festzustellen, ob aufgrund der kleineren Tröpfchen und der zusätzlich geschaffenen Grenzfläche Öl/Wasser in der Miniemulsion im Vergleich zur Emulsion ein Effekt zu beobachten ist. Dazu wird Nonansäure mit 3-Phenylporpanol zum einen in Miniemulsion zum anderen in Emulsion verestert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-46 dargestellt.

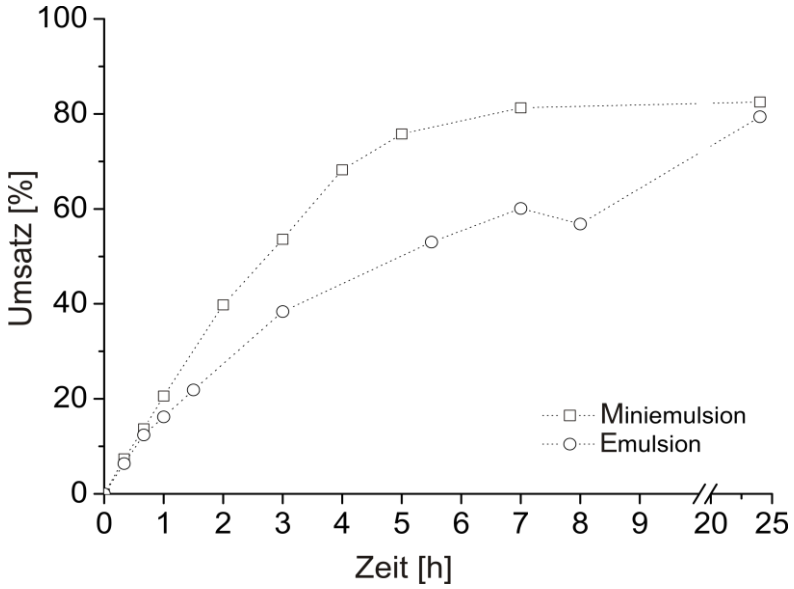


Abbildung 5-46 Vergleich der Reaktionen in Emulsion (Kreise) und Miniemulsion (Vierecke).

Wie in Abbildung 5-46 zu sehen ist, zeigt die zusätzliche Grenzfläche im Miniemulsionsansatz einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Ansätze sind mit 0,32%/min für die Miniemulsion und 0,18%/min für die Emulsion deutlich unterschiedlich. Die zusätzliche Grenzfläche erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit auf das doppelte. Die Ausbeuten nach 24 h bleiben mit ca. 80% sehr ähnlich.

Am System Nonansäure/3-Phenylpropanol wurde zusätzlich der Einfluss eines Substrats im Überschuss auf die Inhibierung des Enzyms untersucht. Dazu wurden jeweils die Säure und der Alkohol in 5- bzw. 10-fachem Überschuss zur anderen Komponente eingewogen und der Umsatz der Reaktion wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-47 gezeigt.

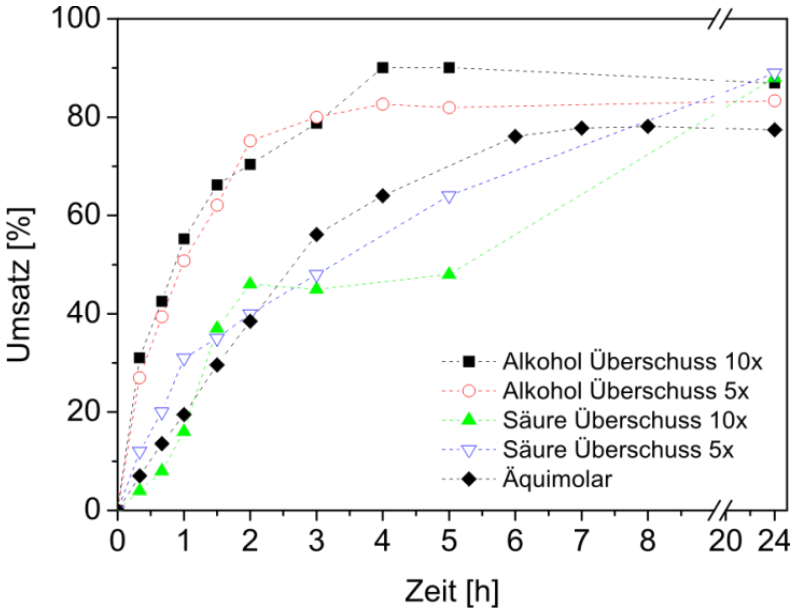


Abbildung 5-47 **Reaktionsprofile der Reaktion von Nonansäure mit 3-Phenylpropanol bei Alkohol Überschuss (10-fach schwarze gefüllte Vierecke, 5-fach rote leere Kreise), bei Säureüberschuss (10-fach grüne gefüllte Dreiecke, 5-fach blaue leere Dreiecke) und bei äquimolarer Zusammensetzung (schwarze gefüllte Rauten).**

Die Reaktionsprofile, die in Abbildung 5-47 zu sehen sind, zeigen, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten bei einem Überschuss an Alkohol (10-fach 0,70%/min und 5-fach 0,66%/min) doppelt so hoch sind wie beim Ansatz mit äquimolaren Einwaagen (0,32%/min). Bei Säureüberschuss ist jedoch eine leichte Absenkung der Reaktionsgeschwindigkeit (10-fach 0,22%/min und 5-fach 0,25%/min) gegenüber dem äquimolaren Ansatz zu beobachten. Diese Inhibierung durch einen Säureüberschuss ist in einer Veröffentlichung von Daneshfar et al.[123] diskutiert. Die Autoren beschrieben die Absenkung der Reaktionsgeschwindigkeit durch einen Überschuss an 2-Ethylhexansäure bei der Reaktion mit 2-Ethylhexanoat in n-Heptan. Die Ausbeuten bei Überschüssen beider Substrate liegen mit etwa 90% über der Ausbeute von 80% bei äquimolarer Einwaage. Die pH-Werte bei allen Reaktionen sind mit 3,8 gleich geblieben und haben dadurch keinen Einfluss auf die Reaktion.

Es ist bekannt, dass Enzyme am besten in einem bestimmten pH-Bereich funktionieren. Deshalb wird an dieser Stelle der Einfluss des pH-Wertes der kontinuierlichen Phase untersucht. Dazu wird dieser mittels 0,1 M NaOH-Lösung auf einen Wert von 6,8 eingestellt. Es muss hierbei beachtet werden, dass bei diesen

pH-Werten die Nonansäure deprotoniert wird, somit selbst als Tensid fungieren kann und damit kein weiteres Tensid zur Stabilisierung der Tröpfchen nötig ist. Es ist daher möglich, stabile Miniemulsionen ohne den Zusatz von Lutensol AT50 herzustellen. Die Reaktionsprofile der enzymatischen Veresterung von Nonansäure mit 3-Phenylpropanol sind in Abbildung 5-48 gezeigt.

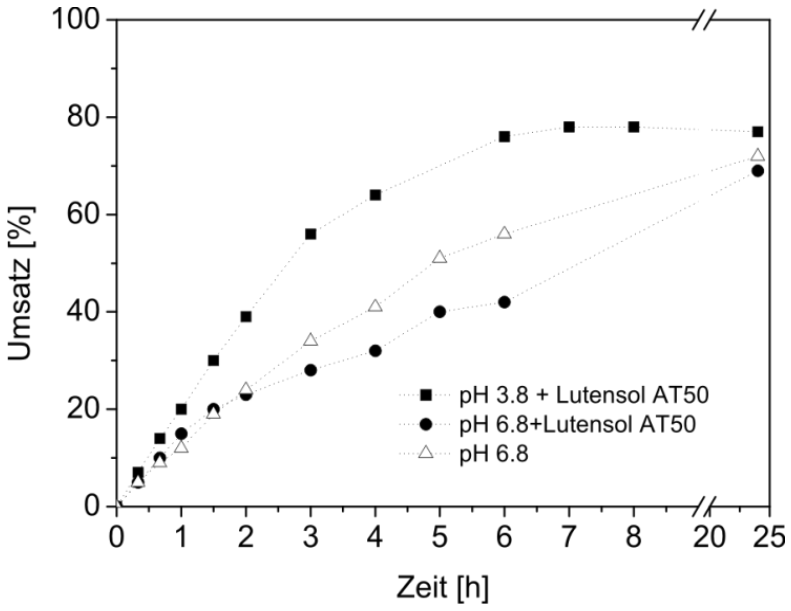


Abbildung 5-48 Reaktionsprofile der Reaktion von Nonansäure mit 3-Phenylpropanol bei unterschiedlichen pH-Werten (volle Vierecke – pH 3,8 mit Zusatz von Lutensol AT 50, volle Kreise – pH 6,8 mit Zusatz von Lutensol AT 50 und leere Dreiecke – pH 6,8 ohne Zusatz von Lutensol AT50).

In Abbildung 5-48 ist zu sehen, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten der Reaktionen bei pH-Wert 6,8 mit und ohne Lutensol AT50 deutlich geringer sind als für die Reaktion bei pH 3,8. Der Endumsatz nach 24 h bei höherem pH-Wert ist mit etwa 70% ebenfalls etwas geringer als bei niedrigem pH Wert. Hier kann die Anwesenheit von ionischen Tensiden, in Form von Natriumnonanoat, ein Grund für den Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit sein. Die Reaktion ohne Zusatz von Lutensol AT50 läuft schneller ab als mit Zugabe von Lutensol AT50. Dies kann damit erklärt werden, dass Lutensol AT50 ebenso wie das Enzym an der Grenzfläche zu finden ist und

damit in Konkurrenz mit dem Enzym um die begrenzte Grenzfläche steht und dies verdrängen kann.

Die oben beschriebene Methode findet in einem weiterführenden Projekt Anwendung, bei dem die enzymatische Verseifung von Pflanzenölen zur Nutzung als nachwachsenden Rohstoff behandelt wird. Dabei wird neben einem Modellsystem, welches aus einem Triglycerid mit drei gleichen Fettsäuren (Oktansäure) besteht, auch die Verseifung von beispielsweise Rapsöl untersucht. Dies ist Bestandteil aktueller Forschung und einer Kooperation im Rahmen des „PROBRAL“-Projektes des DAAD basierend auf den Erkenntnissen, die aus den oben beschriebenen Experimenten stammen.

6. Zusammenfassung

Der in dieser Arbeit genutzte „polymere Ouzo-Effekt“ beschreibt eine Nano-Phasenseparation, die durch die Zugabe von einem Nichtlösemittel zu einer Polymerlösung stattfindet. Diese tritt nur auf, wenn man in einem bestimmten, systemspezifischen Konzentrationsbereich arbeitet. Hier wird anstatt der Makrophasenseparation, die bei Zugabe von Nichtlösemitteln üblicherweise auftritt, die Bildung von Nanopartikeln beobachtet. Da der Vorgang spontan eintritt und keine weitere Energiezufuhr nötig ist, hat man damit die Möglichkeit, Dispersionen von Nanopartikeln mit geringem Aufwand herzustellen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, anhand eines Modellsystems Untersuchungen zum polymeren Ouzo-Effekt durchzuführen und durch Veränderung von relevanten Parametern die physikochemischen Grundlagen dieses Effekts zu untersuchen. Ein ebenso wichtiger Aspekt war die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen für Anwendungen in der Nanotechnologie. Diese spielen bislang eine untergeordnete Rolle in diesem Feld. Als nachwachsender Ausgangsrohstoff wird ein Polysaccharid, das Dextran, verwendet. Dextran ist ein hydrophiles Biopolymer, das aber aufgrund der vorhandenen freien OH-Gruppen sehr vielseitig modifizierbar ist. Auf der Basis dieses Polysaccharids lassen sich durch Modifikation an dessen freien OH-Gruppen einfach unterschiedliche Substituenten einführen und damit auch die Eigenschaften, wie z.B. die Hydrophilie, dieses Polymers steuern. Durch das Einführen von hydrophoben Substituenten wie dem Benzoatrest wurde das ursprünglich wasserlösliche Polymer hydrophobisiert, bis es sich schließlich nicht mehr in Wasser löste. Dies ist eine wichtige Prämisse, um in wässrigem Medium den Ouzo Effekt zu nutzen und damit Nanopartikel herzustellen. Weiterhin wurden Methacrylatreste in die Polymerstruktur eingeführt, welche als polymerisierbare Gruppen dienen. Dadurch können die Polymerketten in den Nanopartikeln durch UV-Polymerisation vernetzt werden. Diese quervernetzten Partikel könnten anschließend in einem organischen Lösemittel gequollen werden. Das könnte eine mögliche Beladung mit Wirkstoffen ermöglichen. Aus den

hydrophob modifizierten Polysacchariden wurde mithilfe des Ouzo-Effekts polymere Nanopartikel hergestellt. Dazu wurde das Polymer in einem mit Wasser mischbaren Lösemittel, z.B. Aceton, gelöst und zu dem Nichtlösemittel Wasser gegeben. Es bildeten sich spontan und ohne weitere Energiezufuhr Nanopartikel aus, welche über einen sehr langen Zeitraum stabil dispergiert vorlagen. Mit Dextranen mit unterschiedlichen Substitutionsgraden an Benzoat wurde der Phasenbereich bestimmt, in welchem stabile Dispersion mit dem Ouzo-Effekt erhalten werden konnten. Interessanterweise hatte der Substitutionsgrad nur einen minimalen Einfluss auf die Lage des Bereiches in dem der Ouzo-Effekt auftrat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl die Konzentration als auch die Viskosität der Polymerlösungen eine Rolle für die erhaltene Partikelgröße spielt. Je höher konzentriert die Polymerlösung war, desto größer waren die erhaltenen Partikel. Die hier gefundenen, experimentell bestimmten Partikelgrößen für Polymere verschiedener Substitutionsgrade sind zur dritten Wurzel der Konzentration proportional. Das deutet auf den Diffusion-Stranding-Mechanismus hin, bei dem davon ausgegangen wird, dass sich Primärpartikel ausbilden und diese sich in einem bestimmten Volumen zusammenlagern. Jedoch ist dies nicht die einzige Variable, die Einfluss nimmt. Das verwendete Lösemittel ist ebenso ein wichtiger Faktor, was sich im Fall von THF gezeigt hat. Man erhält mit diesem Lösemittel bei gleicher Konzentration größere Partikel, die auch teilweise Kavitäten aufweisen. Die Zutropfgeschwindigkeit scheint de facto einen Einfluss zu haben. Bei langsamen Zutropfgeschwindigkeiten ist jedoch davon auszugehen, dass die lange Verweildauer der Polymerlösung in Form des Tropfens an der Kanüle durch Verdampfung des Lösemittels eine höhere Konzentration des Polymers verursacht. Dies ist der wahrscheinliche Grund für die Größenzunahme beim langsamen Zutropfen. Keinen Einfluss auf die Partikelgröße hat, bei gleicher Konzentration der Polymerlösung, die Menge der eingetropften Lösung. Dagegen hat die Art der Formulierung einen großen Einfluss auf die Teilchengröße. Zwei Möglichkeiten wurden untersucht: zum einen das Zutropfen der Polymerlösung ins Wasser, zum anderen das Zutropfen von Wasser in Polymerlösung. Es ist ein entscheidender Faktor, in welcher Richtung man sich im Phasendiagramm bewegt. Wurde die Polymerlösung ins Nichtlösemittel zugetropft, erhielt man bei gleicher Polymerkonzentration kleine Partikelgrößen von

40-200 nm; tropft man dagegen Wasser in die Polymerlösung, resultiert das in deutlich größeren Partikeln von 200-400 nm. Offensichtlich spielt die Zusammensetzung des Systems auf dem Weg in den Ouzo-Bereich eine große Rolle. Hier ist es für die Partikelbildung und deren Größe entscheidend, in welcher Zusammensetzung des Systems man die Grenze des Ouzo-Bereichs überschreitet. Beim Eintropfen der Polymerlösung ins Wasser ist ständig ein Überschuss an Nichtlösemittel im System, das ist beim langsamen Erhöhen des Nichtlösemittelanteils in der Polymerlösung nicht so. Hier ist eine Diffusion der Polymerketten im Lösemittelgemisch durchaus wahrscheinlich, deshalb kann auch der „Nucleation and Growth“-Mechanismus zur Partikelbildung beitragen.

Es konnte zudem mittels FCS die Einlagerung von einem BODIPY-Fluoreszenzfarbstoff in die Polymermatrix durch den Ouzo-Effekt gezeigt werden.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass der Ouzo-Effekt eine interessante Alternative zu den weit verbreiteten Methoden, wie z.B. der Emulsionspolymerisation, zur Herstellung von Nanopartikeln ist. Insbesondere gilt dies bei der Verwendung von polymeren Ausgangsmaterialien anstelle von polymerisierbaren Monomeren.

Wasserlösliche Dextrane, welche mit Methacrylsäuregruppen modifiziert wurden, eignen sich darüber hinaus auch für die Herstellung von Hydrogel-Nanopartikeln. Dazu wurde der inverse Ouzo-Effekt entwickelt. Hierbei handelt es sich um die Herstellung von Nanopartikeln aus wasserlöslichem Polymer durch Zutropfen in ein organisches, wassermischbares Lösemittel, hier Aceton. Wie beim konventionellen Ouzo-Effekt konnte die Teilchengröße über die Konzentration der Polymerlösung eingestellt werden. Hydrogel-Nanopartikel wurden schließlich durch die Bestrahlung mit UV-Strahlen und die damit induzierte Vernetzung des Polymers im Partikel erhalten. Weiterhin besitzen die modifizierten hydrophilen DexMA oberflächenaktive Eigenschaften und eigenen sich so als Stabilisator zur Herstellung von Styrol-Miniemulsionen und Polystyrol-Nanopartikeln.

Hier konnte erfolgreich die Synthese von hydrophilen und hydrophoben Derivaten der Polysaccharide und die Herstellung von Nanopartikeln aus diesen modifizierten nachwachsenden Rohstoffen gezeigt werden. Die Mechanismen des Ouzo-Effekts

sind jedoch noch nicht ganz geklärt, und es gilt weiterhin nach Möglichkeiten zu suchen diese zu erforschen und die, sehr interessante Methode, für breitere Anwendungsmöglichkeiten nutzbar zu machen.

Summary

The “polymeric ouzo-effect”, which was used in this work, describes a nano-phase separation by adding a non-solvent to a polymer solution. Nano-phase separation only occurs in a certain polymer concentration range. Instead of finding a macro-phase separation, which would be the expected observation when adding non-solvent to a solution, nanoparticles were found in the dispersion. No additional energy is needed to create the dispersions, this method offers an alternative to create dispersions of nanoparticles in a convenient way.

The aim of this work was to develop a model system for the investigation of the polymeric ouzo-effect. By varying relevant parameters, the physicochemical foundation of this effect were studied. Another aim was the use of renewable resources for nanotechnology, which are only playing a minor role so far in this field. The renewable polymer dextran was chosen. Dextran is a hydrophilic polysaccharide, which can be modified easily due to its numerous OH-groups. Based on the reactions of the OH-groups of this polysaccharide it is possible to vary the properties of this material, e.g. the solubility or hydrophobicity. Introducing the benzoate residue into the polymer structure by esterification, the hydrophilicity of the polymer was changed to an extent, that the polymer was soluble in organic solvents, like acetone or THF. Water solubility of the modified polymers decreases simultaneously, which is a precondition for preparing aqueous dispersions of nanoparticles from this material. Furthermore polymerizable groups like methacrylates were introduced to the polysaccharide backbone. This allows the crosslinking of the polymers in the formed nanoparticles. These crosslinked particles can be swollen in an organic solvent which might be used to load a cargo into the particles.

For exploiting the polymeric ouzo-effect for particle formation the polymer was dissolved in a water miscible organic solvent, e.g. acetone, and added to the non-solvent, water. Spontaneous formation of nanoparticles was observed without the addition of any energy to the system. The stability of the received dispersions is

maintained without additional surfactants. No precipitation was observed during several months. The ouzo-regime was determined for dextran derivatives with different degrees of substitution of benzoic residues. It was shown that the concentration, as well as the viscosity of the polymer solution played a crucial role for the observed particle sizes. The higher the concentration of the polymer is, the larger is the particle sizes in the dispersion. The particle sizes can be described as a cubic root function of the concentration. This strongly supports the diffusion-stranding-mechanism, where it is assumed that primary particles are formed, as an initial step, and subsequently aggregate in a defined volume. Concentration is not the only factor influencing the particle sizes. The solvent was found to be another key issue, which was observed using THF instead of acetone for the preparation of the polymer solutions. Using THF the particle sizes increased dramatically even though the concentrations of the solution were the same as in acetone. Moreover, cavities in the particles prepared from THF-solution were detected by SEM/TEM. The dropping speed of the polymer solution was also influencing the particle sizes. The faster the solution is added to the non-solvent, the smaller particle sizes were observed. At very low dropping speeds evaporation of the solvent may occur while the droplet of the solution is pending on the syringe. This is causing a higher concentration of the polymer in the solution and therefore larger particles. No influence of the particle size, however, was observed introducing different volumes of a polymer solution to the aqueous phase. The way of preparation was a major parameter, either dropping the polymer solution into water or dropping water to the polymer solution. It is important from which side the ouzo-regime is reached in the phase diagram. By dropping water to the polymer solution the composition of the system is different than by dropping the solution to the water. This results in much larger particles (200-400 nm) when dropping water to the solution instead of dropping the polymer solution to the water (40-200 nm) even though the solutions have the same polymer concentration.

By means of FCS-measurements it was possible to prove the incorporation of a BODIPY fluorescent dye into the particles using the ouzo-effect.

The ouzo-effect seems to be a good alternative to the common methods of preparing nanoscaled dispersions of polymeric particles, like emulsion polymerization. This is particularly helpful when using preformed polymers instead of polymerizable monomers.

The hydrophilic, water soluble derivative dextrylmethacrylate (DexMA) can also be used to prepare hydrophilic nanoparticles. Therefore the inverse polymeric ouzo-effect was introduced. The particle formation was achieved by dissolving the polymer in water and adding the solution to a water miscible organic solvent, like acetone. To obtain hydrogel nano particles the DexMA in the particles had to be crosslinked by UV-polymerization of the methacrylic residues on the dextran backbone. The crosslinking is necessary to prevent the polymer from dissolving in water when acetone is removed. This yielded in stable hydrophilic hydrogel-nanoparticles in an aqueous environment with particle sizes of 100-300 nm. In addition, it was shown that low molecular weight DexMA showed a surfactant like behavior. The DexMA was used to prepare styrene miniemulsions that were polymerized to yield in polystyrene nanoparticles.

This work shows the successful synthesis of the derivatives of the polysaccharides and the preparation of nanoparticles using these hydrophobic and hydrophilic modified renewable materials. The mechanism of the ouzo-effect is still not resolved completely. Investigations have to be continued in order to find the way to clearly determine the mechanism and to make this convenient method usable for a wide field of applications.

7. Literatur

[1] DECHEMA, GDCh, VCI, DGMK, Positionspapier Einsatz nachwachsender Rohstoffe in der chemischen Industrie, **2008**

[2] B. Pötter, Klimakiller ersten Ranges, *Die Zeit,* **18.01.2007**

[3] Y. Yucel, Y. Tekeli, *Energy Education Science and Technology Part a-Energy Science and Research* **2011**, *27*, 337.

[4] C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 327.

[5] K. Mequanint, A. Patel, D. Bezuidenhout, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 883.

[6] S. C. Tam, J. Blumenstein, J. Tzefeiwong, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1976**, *73*, 2128.

[7] T. Heinze, T. Liebert, A. Koschella, *Esterification of Polysaccharides, Vol. 1*, 1 ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2006**.

[8] L. u. V. Bundesminesterium für Ernährung, **2009**.

[9] L. Pasteur, *Bull. Soc. Chim. Paris* **1861**, 30.

[10] C. Scheibler, *Dtsch. Zucker-Ind. (Zeitschrift des Vereins für die Rübenzuckerindustrie des Deutschen Reichs)* **1874**, *24*, 309.

[11] C. Taylor, N. W. H. Cheetham, G. J. Walker, *Carbohydrate Research* **1985**, *137*, 1.

[12] A. Jeanes, W. C. Haynes, C. A. Wilham, J. C. Rankin, E. H. Melvin, M. J. Austin, J. E. Cluskey, B. E. Fisher, H. M. Tsuchiya, C. E. Rist, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 5041.

[13] T. D. Leathers, *Polysaccharides I, Vol. 5*, Wiley VCH, Weinheim, **2002**.

[14] E. Flaschel, *Positionspapier der DECHEMA* **2004**.

[15] L. P. T. M. Zevenhuizen, *Carbohydrate Research* **1968**, *6*, 310.

[16] D. Klemm, T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, S. Hornig, in *Polysaccharides II, Vol. 205*, Springer Berlin / Heidelberg, **2006**, pp. 199.

[17] K. M. Weerasinghe, M. F. Scully, V. V. Kakkar, *Thrombosis Research* **1984**, *33*, 625.

[18] M. Suzuki, T. Mikami, T. Matsumoto, S. Suzuki, *Carbohydrate Research* **1977**, *53*, 223.

[19] A. N. De Belder, *Amersham Biosciences* **2003**.

[20] S. Malherbe, M. Crepin, C. Legrand, M. X. Wei, *Anti-Cancer Drugs* **2004**, *15*, 975.

[21] K. Yoshida, K. Sato, J.-i. Anzai, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 1546.

[22] S. Hornig, T. Heinze, S. Hesse, T. Liebert, *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 1908.

[23] S. Hornig, T. Heinze, *Carbohydrate Polymers* **2007**, *68*, 280.

[24] M. A. Casadei, G. Pitarresi, R. Calabrese, P. Paolicelli, G. Giammona, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 43.

[25] F. Chaubet, R. Huynh, J. Champion, J. Jozefonvicz, D. Letourneur, *Polymer International* **1999**, *48*, 313.

[26] K. Takahashi, M. Hattori, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1994**, *58*, 178.

[27] H. Wondraczek, A. Pfeifer, T. Heinze, *European Polymer Journal* **2010**, *46*, 1688.

[28] A. Vollmer, K. Voiges, C. Bork, K. Fiege, K. Cuber, P. Mischnick, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *395*, 1749.

[29] R. Huynh, F. Chaubet, J. Jozefonvicz, *Angewandte Makromolekulare Chemie* **1998**, *254*, 61.

[30] S. Hornig, H. Bunjes, T. Heinze, *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, *338*, 56.

[31] A. Aumelas, A. Serrero, A. Durand, E. Dellacherie, M. Leonard, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *59*, 74.

[32] H.-z. Zhang, X.-m. Li, F.-p. Gao, L.-r. Liu, Z.-m. Zhou, Q.-q. Zhang*, Vol. 17*, pp. 48.

[33] W. Deng, J. Li, P. Yao, F. He, C. Huang, *Macromolecular Bioscience* **2010**, *10*, 1224.

[34] A. Durand, E. Marie, E. Rotureau, M. Leonard, E. Dellacherie, *Langmuir* **2004**, *20*, 6956.

[35] E. Rotureau, J. Raynaud, B. Choquenet, E. Marie, C. Nouvel, J. L. Six, E. Dellacherie, A. Durand, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *331*, 84.

[36] E. Rotureau, E. Marie, E. Dellacherie, A. Durand, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, *301*, 229.

[37] A. Durand, E. Rotureau, M. Leonard, E. Marie, E. Dellacherie, T. A. Camesano, *Colloids and Surfaces A (Physicochemical and Engineering Aspects)* **2006**, *288*, 131.

[38] C. Ladaviere, M. C. Averlant-Petit, O. Fabre, A. Durand, E. Dellacherie, E. Marie, *Colloid and Polymer Science* **2007**, *285*, 621.

[39] E. Osterberg, K. Bergstrom, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Vanalstine, J. M. Harris, *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29*, 741.

[40] E. Monchaux, P. Vermette, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, *85A*, 1052.

[41] S. G. Levesque, M. S. Shoichet*, Vol. 18*, **2007**, pp. 874.

[42] S. G. Lévesque, R. M. Lim, M. S. Shoichet, *Biomaterials* **2005**, *26*, 7436.

[43] B. G. De Geest, W. Van Camp, F. E. Du Prez, S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 1111.

[44] Fachverband der Stärke-Industrie e.V., **2009**.

[45] BASF, *BASF Infomaterial* **2010**.

[46] W. GSE Gesellschaft für Spezialfolien-Entwicklung mbH, DE, Deutsches Patent, DE19813229C2, **1998**

[47] G. Baier, A. Musyanovych, M. Dass, S. Theisinger, K. Landfester, *Biomacromolecules*, *11*, 960.

[48] A. V. Reis, M. R. Guilherme, T. A. Moia, L. H. C. Mattoso, E. C. Muniz, E. B. Tambourgi, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 2567.

[49] R. S. Singh, G. K. Saini, J. F. Kennedy, *Carbohydrate Polymers* **2008**, *73*, 515.

[50] M. Yoneyama, K. Okada, T. Mandai, H. Aga, S. Sakai, T. Ichikawa, *Denpun Kagagu* **1990**, *37*, 123.

[51] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecci, F. Alhaique, *Journal of Controlled Release* **2007**, *119*, 5.

[52] K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, *Macromolecules* **1993**, *26*, 3062.

[53] W. C. Griffin, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1949**, 311.

[54] R. von Bergen, E. Rogel, *Fluid Phase Equilibria* **1998**, *153*, 63.

[55] Z. E. Proverbio, S. M. Bardavid, E. L. Arancibia, P. C. Schulz, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *214*, 167.

[56] J. T. Davies, E. K. Rideal, *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New-York, **1961**.

[57] H. Mollet, A. Grubenmann, *Formulierungstechnik - Emulsionen, Suspensionen, Feste Formen*, Wiley VCH, **2000**.

[58] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme. Physik und Chemie, Vol. 1*, Springer, Berlin, **2002**.

[59] E. Aschenbrenner, C. Weiss, K. Landfester, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 2434.

[60] T. Cosgrove, *Polymers and Polymer Solutions*, Blackwell Publishing Ltd., **2009**.

[61] E. Ruckenstein, I. V. Rao, *Colloids and Surfaces* **1986**, *17*, 185.

[62] C. K. Weiss, K. Landfester, *Advances in Polymer Science* **2010**, *DOI: 10.1007/12_2010_61*.

[63] N. Bechthold, F. Tiarks, M. Willert, K. Landfester, M. Antonietti, *Macromolecular Symposia* **2000**, *151*, 549.

[64] C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, 1025.

[65] S. Galindo-Rodriguez, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, *Pharmaceutical Research* **2004**, *21*, 1428.

[66] M. Urban, A. Musyanovych, K. Landfester, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2009**, *210*, 961.

[67] F. Ganachaud, J. L. Katz, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 209.

[68] S. A. Vitale, J. L. Katz, *Langmuir* **2003**, *19*, 4105.

[69] M. Gallardo, G. Couarraze, B. Denizot, L. Treupel, P. Couvreur, F. Puisieux, *International Journal of Pharmaceutics* **1993**, *100*, 55.

[70] P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, C. Vauthier, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *344*, 33.

[71] A. Bozkir, O. M. Saka, *Il Farmaco* **2005**, *60*, 840.

[72] J. A. Radley, US Patent, 2,506,892, **1950**

[73] P. O. Kinell, *Acta Chemica Scandinavica* **1947**, *1*, 832.

[74] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, *55*, R1.

[75] H. C. Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, K. Thies, US Patent, 5,118,528, **1992**

[76] M. Leroueil-Le Verger, L. Fluckiger, Y.-I. Kim, M. Hoffman, P. Maincent, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1998**, *46*, 137.

[77] V. Lassalle, M. L. Ferreira, *Macromol Biosci* **2007**, *7*, 767.

[78] Y. Dong, S.-S. Feng, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2843.

[79] R. Bodmeier, H. Chen, P. Tyle, P. Jarosz, *Journal of Microencapsulation* **1991**, *8*, 161

[80] S. Hornig, T. Heinze, C. R. Becer, U. S. Schubert, *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19*, 3838.

[81] S. Schubert, J. J. T. Delaney, U. S. Schubert, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1581.

[82] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72*, 4847.

[83] J. Aubry, F. Ganachaud, J.-P. Cohen Addad, B. Cabane, *Langmuir* **2009**, *25*, 1970.

[84] Z. Chai, X. Zheng, X. Sun, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2003**, *41*, 159.
[85] S. Daus, T. Heinze, *Macromol Biosci* **2010**, *10*, 211.
[86] D. Horn, J. Rieger, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 4330.
[87] M. Beck-Broichsitter, E. Rytting, T. Lebhardt, X. Wang, T. Kissel, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *41*, 244.
[88] T. Jung, A. Breitenbach, T. Kissel, *Journal of Controlled Release* **2000**, *67*, 157.
[89] R. Zech, G. Domagk, *Enzyme Biochemie, Pathobiochemie, Klinik, Therapie*, VCH, Weinheim, **1986**.
[90] A. Fallert-Müller, Elsevier, **2000**.
[91] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.
[92] D. E. Koshland Jr., *Angewandte Chemie* **1994**, *106*, 2468.
[93] L. Michaelis, M. M. L. Menten, *Biochemische Zeitschrift* **1913**, *49*, 333.
[94] M. T. Ashby, *Journal of Chemical Education* **2007**, *84*, 1515.
[95] R. Verger, *Trends in Biotechnology* **1997**, *15*, 32.
[96] U. Derewenda, A. M. Brzozowski, D. M. Lawson, Z. S. Derewenda, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1532.
[97] E. J. Gilbert, *Enzyme and Microbial Technology* **1993**, *15*, 634.
[98] Y. Hideaki, S. Sakayu, *Angewandte Chemie* **1988**, *100*, 640.
[99] D. P. C. de Barros, L. P. Fonseca, J. M. S. Cabral, E. M. Aschenbrenner, C. K. Weiss, K. Landfester, *Biotechnology and Bioengineering* **2010**, *106*, 507.
[100] E. M. Aschenbrenner, C. K. Weiss, K. Landfester, *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 2434.
[101] M. D. Lechner, K. Gehrke, *Makromolekulare Chemie*, Birkhäuser Verlag, Basel, **1993**.
[102] P. N. Pusey, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1999**, *4*, 177.
[103] M. Mulisch, U. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik, Vol. 18*, Spektrum Akademischer Verlag, **2010**.
[104] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Phys Rev Lett* **1972**, *29*, 705.
[105] O. Krichevsky, G. Bonnet, *Rep Prog Phys* **2002**, *65*, 251.
[106] A. N. de Belder, K. Granath, *Carbohydrate Research* **1973**, *30*, 375.
[107] X. Guo, Z. Rong, X. Ying, *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *298*, 441.
[108] S.-H. Kim, C.-C. Chu, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2000**, *49*, 517.
[109] G. Mistlberger, K. Koren, E. Scheucher, D. Aigner, S. M. Borisov, A. Zankel, P. Pölt, I. Klimant, *Advanced Functional Materials* **2010**, *20*, 1842.

[110] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, *187*, 143.

[111] C. Gavory, A. Durand, J.-L. Six, C. Nouvel, E. Marie, M. Leonard, *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84*, 133.

[112] O. Thioune, H. Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, *146*, 233.

[113] A. Schrade, Z. Cao, K. Landfester, U. Ziener, *Langmuir*, *27*, 6689.

[114] S. Hornig, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1487.

[115] S. H. Kim, C. Y. Won, C. C. Chu, *Carbohydrate Polymers* **1999**, *40*, 183.

[116] J. K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, K. Matyjaszewski, *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, 448.

[117] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, Article 74.

[118] F. Lince, D. L. Marchisio, A. A. Barresi, *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *322*, 505.

[119] I. Garcia-Moreno, A. Costela, L. Campo, R. Sastre, F. Amat-Guerri, M. Liras, F. Lopez Arbeloa, J. Banuelos Prieto, I. Lopez Arbeloa, *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 3315.

[120] N. Vogel, C. P. Hauser, K. Schuller, K. Landfester, C. K. Weiss, *Macromolecular Chemistry and Physics*, *211*, 1355.

[121] E. Aschenbrenner, **2007**.

[122] K. Manabe, Y. Mori, T. Wakabayashi, S. Nagayama, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7202.

[123] A. Daneshfar, H. S. Ghaziaskar, L. Shiri, M. H. Manafi, M. Nikorazm, S. Abassi, *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *37*, 279.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben bedanken.

Zuerst gilt mein Dank Frau Prof. Katharina Landfester für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation, sowohl in Ulm als auch in Mainz, und die Betreuung während dieser Zeit.

Meinem Projektleiter, Clemens Weiß, möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und für das Korrekturlesen der Arbeit danken. Diese und viele andere Faktoren haben letztendlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Tanja Weil möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Meinen Kooperationspartnern am MPIP: Dr. Kaloian Koynov, Dr. Michael Kappl, Marcin Makowski (AK Butt) und Dr. Manfred Wagner (AK Müllen) gilt mein Dank.

Ganz großer Dank geht an diejenigen die mir die Arbeit in Ulm und in Mainz so angenehm wie möglich machten. Die besten Laborkollegen (Christoph, Niki, Matthias, Julien), die Techniker, ohne die nichts liefe (Günni, Elvira, Marlies, Gunnar, Kathrin, Sandra, Christine, Beate, Ute, Petra, Rainer, Angelika und Elke) und alle anderen (Rüdiger, Steffen, Viktor, Umaporn, Daniel, Anke, Max, Evi, Renate, Nermeen, Daniela, Hendrik, Niklas, Birger, Carlos, Markus, Johannes, Grit, Frieda, Kilian, Christian, Anne, Caro und noch viele, viele mehr….) die mir eine schöne Zeit ermöglichten. Verzeiht mir bitte wenn ich jemanden vergessen habe aber es waren sooooo viele!

Danke im Speziellen an meine „Herbergsväter“: Daniel, Niki, Max und Rüdi, ihr seid die Besten! Ebenso einen besonderen Dank an die „Ulmfahrer“ (ihr wisst schon wer gemeint ist), die mich Woche für Woche ertragen haben und mir die Fahrerei deutlich erleichterten.

Meinen lieben Freunden aus Brasilien: Silmar, Paula, Ginia und Cesar möchte ich für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe und die schöne Zeit in Porto Alegre danken.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich meine tiefste Dankbarkeit ausdrücken, denn ohne deren Rückhalt und bedingungslose Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen, vielen Dank!!!!!

Last but not least möchte ich den größten Dank meiner lieben Freundin Nicole aussprechen. Sie unterstütze mich so liebevoll, wo es auch immer nötig war, und hatte jede Menge Geduld aufzubringen, um meine Hochs und Tiefs zu ertragen. Ich kann dir gar nicht genug danken.

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf.

Publikationen:

Enzymatic Esterification in Aqueous Miniemulsion

E. Aschenbrenner, C. K. Weiß and K. Landfester

Chemistry - A European Journal, Volume 15, Issue 10, 2009, pages: 2434-2444

Miniemulsion as efficient system for enzymatic synthesis of acid alkyl esters

D. de Barros, L. Fonseca, J. Cabral, E. Aschenbrenner, C. Weiss, K. Landfester

Biotechnology and Bioengineering, Volume 106, Issue 4, 2010, pages: 507-515

Catalytic properties of lipases and cutinase in alkyl ester synthesis in miniemulsion

D. de Barros, L. Fonseca, J. Cabral, E. M. Aschenbrenner; C. K. Weiss, K. Landfester

Eingereicht bei Catalysis Communications

Enzymatically Biodegradable Nanogels by Inverse Miniemulsion Copolymerization of Acrylamide with Dextran Methacrylates as Crosslinkers

D. Klinger, E. Aschenbrenner, C. K. Weiss, K. Landfester

Eingereicht bei Polymer Chemistry

Polysaccharide nanoparticles prepared by the Polymeric-Ouzo-Effect

E. Aschenbrenner, K. Landfester, C. K. Weiss

In Vorbereitung

Vortrag:

Polysaccharide nanoparticles prepared by the Polymeric-Ouzo-Effect

XII International Macromolecular Colloquium and the 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites in Gramado/Brasilien 09/2010

Poster:

Enzymatic Esterification in Aqueous Miniemulsion

E. Aschenbrenner, C. K. Weiß, and K. Landfester

1st nano today conference in Singapur 08.2009

Biocatalysis in heterophase - enzymatic reactions and synthesis of enzyme degradable polymers

J. Andrieu, E. M. Aschenbrenner, M. Maier, L. Ragupathy, C. K. Weiss, K. Landfester

Frontiers in Polymer Science in Mainz 06.2009

Enzymatically degradable modified polysaccharides

E. Aschenbrenner, C. K. Weiß, and K. Landfester

Bio & Polymers - New Polymer Technologies with Water Biannual Meeting of the GDCh-Division of "Macromolecular Chemistry" in Aachen 09.2008

Reactions in miniemulsion

L. Ragupathy, J. B. Doucet, A. Schatzinger, H. Frank, K. Cwiok, C. Hauser, E. Aschenbrenner, U. Ziener, and K. Landfester.

Wissenschaftsforum Chemie der GDCh in Ulm 09.2007

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01.01.2008 bis 30.09.2008 am Institut für Organische Chemie III – Makromolekulare Chemie und Organische Materialien – der Universität Ulm und vom 01.10.2008 bis 31.03.2011 im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Polymere am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn gemäß anderen Arbeiten entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Neu-Ulm, den 05.10.2011

_____

Eugen Aschenbrenner