



Herstellung und Charakterisierung von
Polybutylcyanacrylat-Vitamin E-
Hybridnanopartikeln

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Diplom-Chemikers (Dipl.-Chem.)
am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Viet Nguyen-Kim

geb. am 11.02.1983 in Aachen

Mainz, im Juli 2009

1. Einleitung	1
2. Theorie und Grundlagen	3
2.1. Emulsionen.....	3
2.1.1. Konventionelle Emulsionen	3
2.1.2. Emulsionspolymerisation	5
2.1.3. Miniemulsionen	7
2.1.4. Miniemulsionspolymerisation	8
2.2. Verkapselung in Nanopartikel	9
2.3. Freisetzungskinetik verkapselter Substanzen.....	13
2.4. Poly-(n-butylcyanacrylat).....	15
2.5. Vitamin E.....	17
3. Messmethoden	20
3.1. UV-Vis-Spektroskopie.....	20
3.2. Lichtstreuung	22
3.3. Gelpermeationschromatographie (GPC).....	24
4. Experimenteller Teil	26
4.1. Allgemeine Vorbemerkungen	26
4.2. Synthese der PBCA-Partikel.....	27
4.2.1. Miniemulsion mit Hexadekan als Hydrophob	27
4.2.2. Verkapselung von α -Tocopherol.....	27
4.3. Synthese der PECA-Partikel.....	28
4.4. Charakterisierung der Partikel.....	29
4.4.1. Dynamische Lichtstreuung.....	29
4.4.2. UV-Vis-Spektroskopie	29
4.4.3. Feststoffbestimmung.....	30
4.4.4. Gelpermeationschromatographie (GPC)	30
4.5. Zentrifugation der Dispersionen	30
4.6. Bestimmung der Freisetzungskinetik	31

4.7. Extraktion	31
5. Ergebnisse und Diskussion.....	32
5.1. Herstellung und Analyse der PBCA-Partikel	32
5.1.1. Vergleich der Tenside SDS, Tween®80 und Lutrol®F68.....	32
5.1.2. Verkapselung von α -Tocopherol.....	35
5.1.3. Abtrennen von freiem α -Tocopherol durch Zentrifugation.....	41
5.2. Bestimmung der Freisetzungskinetik	43
5.2.1. Freisetzung in n-Hexan	44
5.2.2. Freisetzung in anderen organischen Lösungsmitteln.....	49
5.3. Extraktion der Dispersionen mit n-Hexan.....	49
5.4. Herstellung von PECA-Partikeln.....	59
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	61
7. Literaturverzeichnis	63
8. Danksagung	69
9. Erklärung.....	70

1. Einleitung

Es ist von großem Interesse, eine möglichst hohe Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen zu erzielen. Bei vielen Wirkstoffen ist diese hohe Bioverfügbarkeit aufgrund ihres hydrophoben Charakters schwierig zu erreichen. Vitamin E, ein wichtiger Radikalfänger, ist einer dieser wasserunlöslichen Wirkstoffe und kann nur in einer dispergierten Form effektiv verabreicht werden [1]. Wässrige Vitamin-E-Dispersionen wurden schon auf verschiedene Weisen hergestellt. Eine Möglichkeit ist beispielsweise eine Stabilisierung mit Sojaöl und Sojaphosphatidycholin [2]. Eine solche Dispersion ist allerdings nur für 24 h stabil. Eine bessere Lösung stellt eine Vitamin-E-Emulsion dar, die durch Tenside wie Tween 80 oder Span 80 stabilisiert wird [3].

Eine weitere vorstellbare Methode zur effektiven Versorgung des Körpers mit Vitamin E wäre ein Wirkstofftransportsystem, in dem Vitamin E in ein Polymer mit Hilfe der Miniemulsionstechnik eingekapselt wird [4], [5]. Diese Methode erlaubt es, sehr stabile Dispersionen herzustellen. Weitere Vorteile ergeben sich durch eine einfache Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit sowie durch die Homogenität der Partikel. Als Polymer wäre in diesem Fall Poly-(n-butylcyanacrylat), oder kurz PBCA geeignet, da es sich hierbei um ein bioabbaubares und bioverträgliches Polymer handelt [6]. Außerdem kann es anionisch und nicht wie viele andere Polymere nur radikalisch polymerisiert werden, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen zwischen der Polymerisation und der antioxidierenden Funktion des Vitamin E als Radikalfänger vermieden werden. Zusätzlich besitzen mit Tween 80 ummantelte PBCA-Nanopartikel die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren [7], [8]. Durch eine dortige Freisetzung des Vitamin E ergäbe sich z.B. die Möglichkeit, neuronale Zellen durch den Abfang von freien Radikalen zu schützen.

In dieser Arbeit wurde ein erster Schritt unternommen, um dieses System zu entwickeln und zu charakterisieren. Dazu wurde α -Tocopherol, eine Form des Vitamin E, mit Hilfe der Miniemulsionstechnik in PBCA eingekapselt. Zur Stabilisierung der Dispersion wurden neben dem häufig verwendeten ionischen Tensid Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfate, SDS) auch die nichtionischen Tenside, Polysorbat 80 (Tween[®] 80) und Poloxamer 188 (Lutrol[®] F68) eingesetzt.

Es entsteht eine Dispersion aus Nanopartikeln in Wasser, welche aus PBCA und α -Tocopherol bestehen. Diese sollen nun als Wirkstofftransportsystem in der Lage sein, den Wirkstoff wieder freizusetzen und an die Umgebung abzugeben [9]. Die genaue Charakterisierung dieser Freisetzung ist für die Beurteilung der Tauglichkeit von Wirkstofftransportsystemen unentbehrlich.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Freisetzungskinetik von α -Tocopherol aus den Partikeln, um damit weitere Informationen für eine Erklärung des Freisetzungsmechanismus zu erhalten. Außerdem wird eine Methode vorgestellt, mit welcher der Verkapselungsgrad bestimmt werden kann.

2. Theorie und Grundlagen

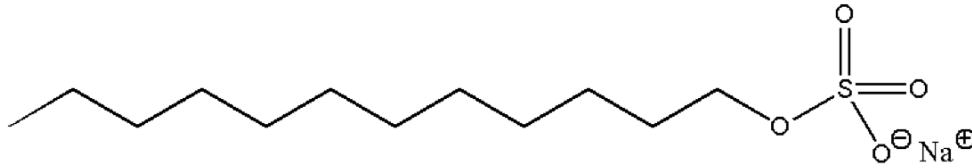
2.1. Emulsionen

2.1.1. Konventionelle Emulsionen

Emulsionen stellen ein disperses System aus zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen dar. Dabei liegt die disperse Phase in Form von feinverteilten Tröpfchen in der kontinuierlichen Phase vor [10].

Man unterscheidet hierbei zwischen direkten und inversen Emulsionen. Bei der direkten Emulsion handelt es sich um ein „Öl-in-Wasser“-System, in welchem die hydrophobe Flüssigkeit die disperse Phase darstellt und von Wasser als kontinuierliche Phase umgeben wird. Von einer inversen Emulsion spricht man bei einem „Wasser-in-Öl“-System, in welchem Wasser die disperse Phase bildet, die hydrophobe Flüssigkeit die kontinuierliche.

Um eine feine Verteilung der dispersen Phase in der kontinuierlichen Phase, d.h. eine größere Grenzfläche, zu erreichen, muss Energie aufgebracht werden. Diese Energie wird mechanisch hinzugefügt, z.B. durch starkes Schütteln, Rühren oder auch durch Ultraschall. Nach Herstellung der Emulsion ist das System jedoch aufgrund der größeren Grenzfläche und der damit erhöhten Gesamtgrenzflächenenergie thermodynamisch instabil; es tritt eine Entmischung der beiden Phasen ein. Um eine längere Stabilität von Emulsionen zu gewährleisten, gibt man Tenside hinzu, die amphiphile Eigenschaften aufweisen. Dadurch lagern sie sich an der Grenzfläche der beiden Phasen an, was zu einer Senkung der Grenzflächenspannung führt. Sie sorgen außerdem für eine elektrostatische oder sterische Abschirmung der Tröpfchen untereinander, so dass eine Koaleszenz der Tröpfchen weitestgehend verhindert werden kann. Die Strukturen der drei in dieser Arbeit verwendeten Tenside sind in Abbildung 1 zu sehen. SDS ist ein ionisches Tensid, das somit eine elektrostatische Abschirmung der Tröpfchen bewirkt. Bei Tween® 80 und Lutrol® F68 handelt es sich um nichtionische Tenside. Hier verhindern die sperrigen polaren Gruppen die Koaleszenz der Tröpfchen.



SDS: Natriumlaurylsulfat

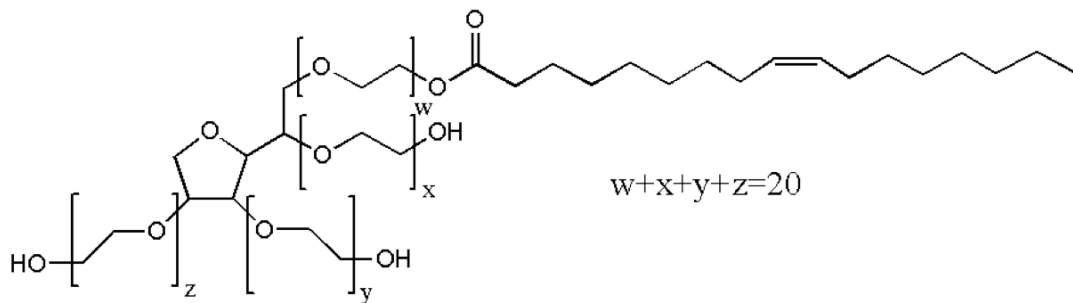
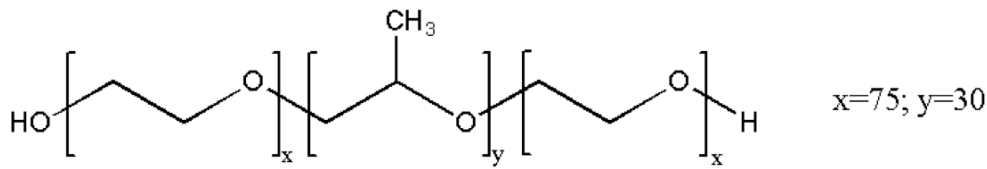
Tween[®] 80: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monoelatLutrol[®] F68

Abbildung 1: In der Arbeit eingesetzte Tenside.

Trotz einer ausreichenden Stabilisierung der Tröpfchen durch das Tensid erhält man bei Emulsionen keine homogene Verteilung der Tröpfchengröße. Grund dafür ist die ständige Diffusion zwischen den einzelnen Tröpfchen, die Ostwaldreifung genannt wird [11]. Triebkraft der Diffusion ist der Ausgleich der unterschiedlichen Laplace-Drücke P_L (Gleichung 1), die mit abnehmender Tröpfchengröße zunehmen:

$$P_L = \frac{2\gamma}{r_T} \quad (1)$$

P_L = Laplace-Druck

γ = Grenzflächenspannung

r_T = Tröpfchenradius

Die Ostwaldreifung ist ein Prozess, bei dem große Tröpfchen auf Kosten kleiner Tröpfchen anwachsen, was insgesamt zu einem Anstieg der durchschnittlichen

Partikelgröße führt. Somit erklärt sich, weshalb selbst durch Tenside geschützte Emulsionen nur eine begrenzte Zeit lang stabil bleiben. In Abbildung 2 sind die beiden destabilisierenden Effekte Koaleszenz und Ostwaldreifung schematisch dargestellt.

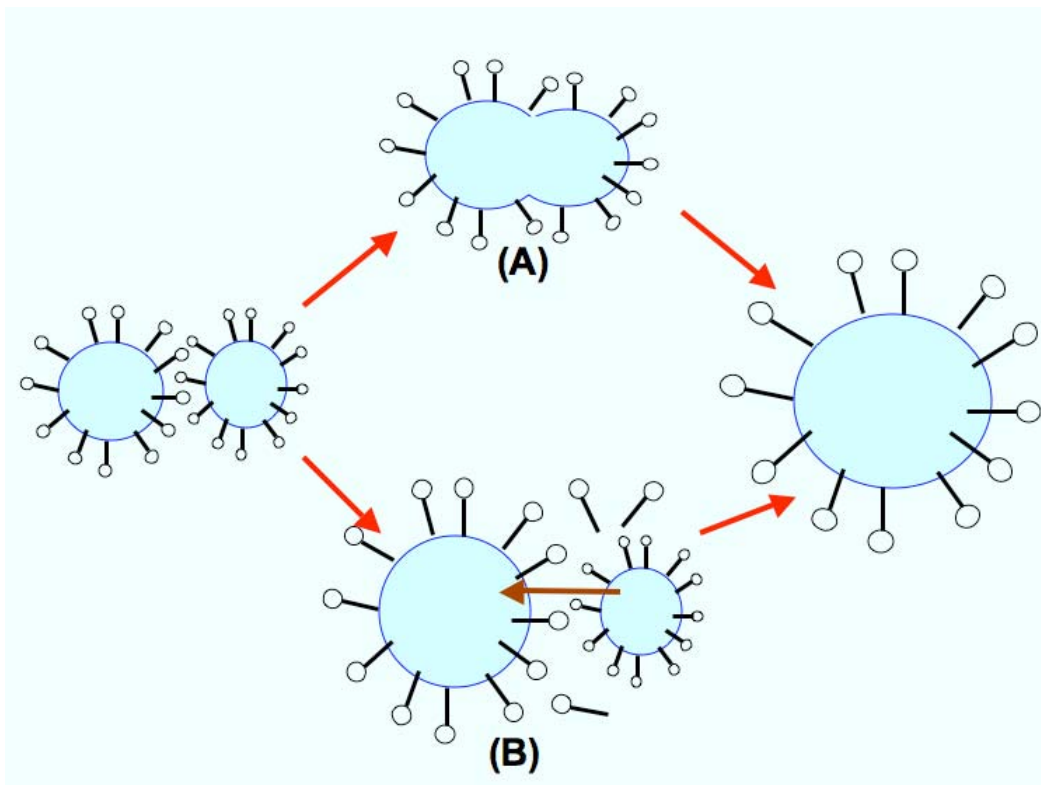


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Koaleszenz (A) und der Ostwaldreifung (B).

2.1.2. Emulsionspolymerisation

Besteht die disperse Phase aus einem nicht wasserlöslichem Monomer und die kontinuierliche Phase aus Wasser, kann man eine sogenannte Emulsionspolymerisation durchführen.

Abbildung 3 zeigt eine solche konventionelle Emulsionspolymerisation. Es handelt sich hierbei um eine radikalische Polymerisation. Die eingesetzten Tenside bilden ab einer sogenannten kritischen Mizellenbildungskonzentration (cmc) Mizellen mit einem Durchmesser von etwa 5-10 nm aus. Diese sind in der Lage, das Monomer einzuschließen, wodurch der Durchmesser geringfügig zunimmt. Überschüssiges Monomer liegt in bis zu 1 µm großen Monomertropfen vor. Der Initiator ist in diesem System wasserlöslich und reagiert mit Monomermolekülen, die durch ihre Diffusion

zwischen Monomertröpfchen und Mizellen gelöst in der wässrigen Phase vorliegen. Nach einigen Wachstumsschritten haben die Radikale die Möglichkeit, in die Mizellen oder in die Monomertröpfchen zu diffundieren. Bei 10^{19} - 10^{21} Mizellen und nur 10^{13} - 10^{14} Monomertropfen pro Liter Emulsion findet die Polymerisation fast ausschließlich in den Mizellen statt. Auch die Polymerisation in der wässrigen Phase hat nun keine Bedeutung mehr. Aus den Monomertropfen diffundiert Monomer in die Mizellen nach. Die entstehenden Polymerpartikel werden Latexpartikel genannt [12].

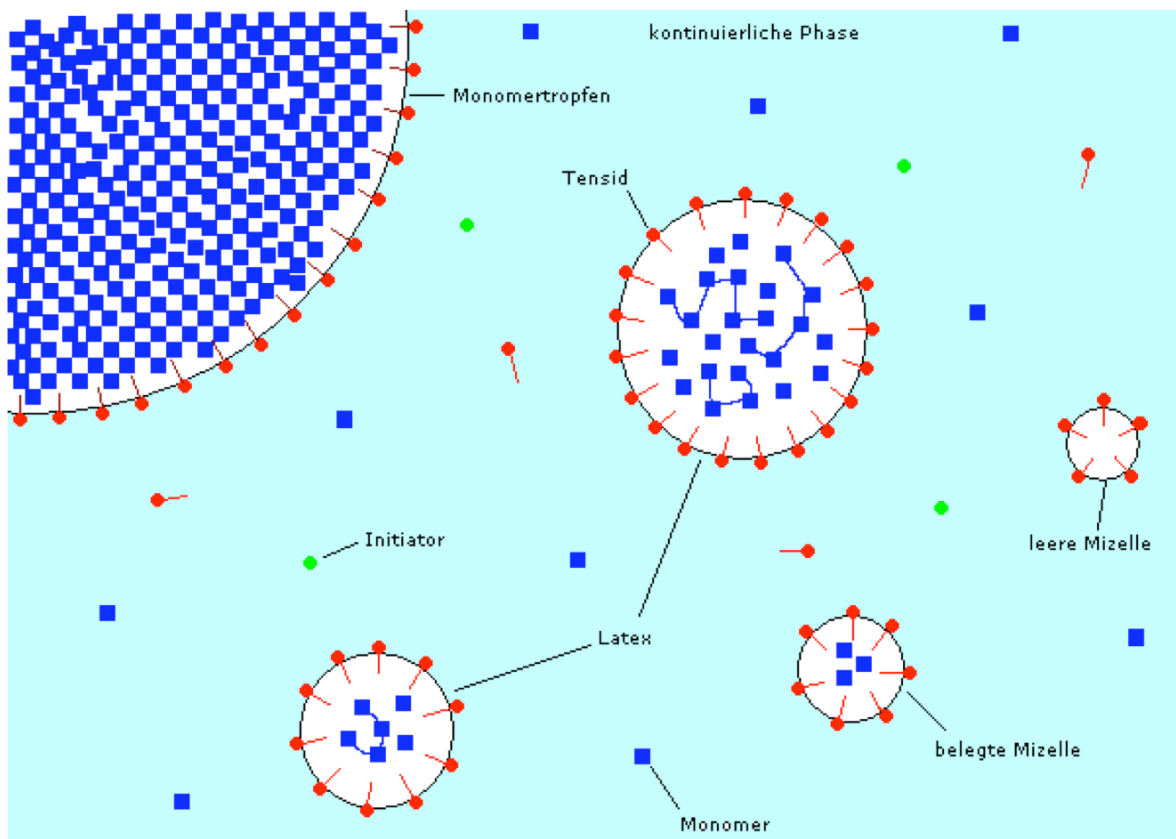


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Emulsionspolymerisation-System.

Die Emulsionspolymerisation birgt im Vergleich zur Lösungspolymerisation in homogener Phase viele Vorteile, z.B. den Verzicht auf organische Lösungsmittel, die stets ein Sicherheits- und Gesundheitsrisiko mit sich bringen und außerdem im Vergleich zu Wasser teuer sind. Ein weiterer Vorteil ist die Umgehung des Trommsdorf-Effekts, d.h. einer Zunahme der Viskosität und der damit verbundenen Senkung der Abbruchrate, was bei einer radikalischen Polymerisation in homogener Phase ein beträchtliches Problem darstellt. Mit einer Emulsionspolymerisation ist

somit die Formulierung von Polymerdispersionen mit einem hohen Feststoffgehalt möglich.

Allerdings ist das Einsatzgebiet der Emulsionspolymerisation auf die radikalische Polymerisation beschränkt. Copolymerisationen sind schwierig, andere Polymerisationstypen wie Polykondensationen und Polyadditionen oder anionische Polymerisationen erst gar nicht durchführbar. Hier kann die Miniemulsionstechnik Abhilfe schaffen. Diese wird in den folgenden Kapiteln 2.1.3 und 2.1.4 erläutert.

2.1.3. Miniemulsionen

Miniemulsionen sind kinetisch stabilisierte Emulsionen bestehend aus kleinen homogenen Tröpfchen, die je nach Menge an Öl in Wasser, Dichte des Öls und Tensidkonzentration eine Größe von 30-500 nm aufweisen [4]. Eine Besonderheit der Miniemulsion ist ihre Stabilität gegenüber der Koaleszenz und auch der Ostwaldreifung [13]. Erstere wird wie bei der normalen Emulsion durch den Einsatz von Tensiden verhindert. Die Ostwaldreifung wird unterdrückt, indem der dispersen Phase eine weitere Komponente hinzugefügt wird. Bei einer direkten Miniemulsion ist diese Komponente ein Ultrahydrophob, wie z.B. ein langkettiger Kohlenwasserstoff, bei der inversen Miniemulsion gibt man eine möglichst polare Komponente, wie z.B. ein Salz, hinzu [14], [15]. Diese zusätzliche Komponente baut einen osmotischen Druck auf, der dem Laplace-Druck (Gleichung 1) entgegenwirkt. Die Diffusion zwischen den Tröpfchen wird somit unterbunden (Abbildung 4).

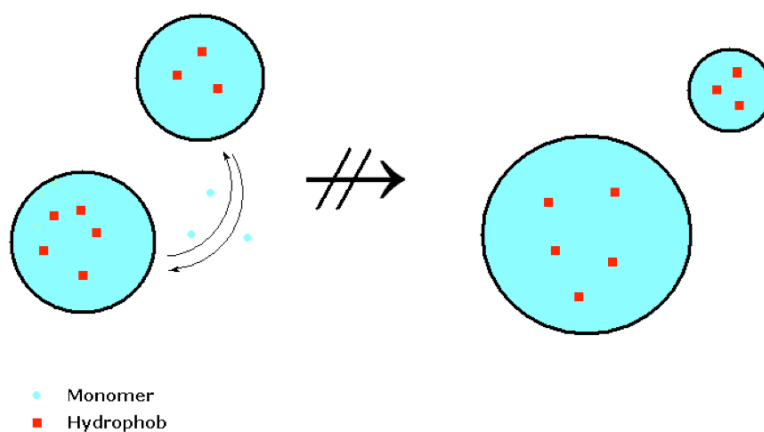


Abbildung 4: Prinzip der Unterdrückung der Ostwaldreifung.

Die Erzeugung der Tröpfchen wird z.B. durch den Einsatz von Ultraschall erreicht. Im Ultraschallprozess kommt es durch die sehr schnelle Auf- und Abbewegung des Ultraschallstabs zu einer abwechselnden Bildung von Unterdruck- und Überdruckphasen. Während der Unterdruckphase bilden sich Hohlräume und Dampfbläschen unterhalb des Stabes, die beim Eintreten der Überdruckphase sofort wieder kollabieren. Diesen Effekt nennt man Kavitation. Die dabei entstehenden hohen Drücke und Temperaturen ermöglichen nun die Bildung kleiner homogener Tröpfchen. Diese besitzen eine einheitliche Größe und Zusammensetzung, welche nun durch die Unterdrückung der Ostwaldreifung über einen längeren Zeitraum gewährleistet sind [16].

2.1.4. Miniemulsionspolymerisation

Das Miniemulsionssystem kann auch für Polymerisationen verwendet werden und weist im Vergleich zu der in 2.1.2 erläuterten Emulsionspolymerisation bedeutende Vorteile auf.

Nach dem Homogenisieren mit Ultraschall findet man kleine, stabile Tröpfchen vor, die im Idealfall alle dieselbe Menge Monomer enthalten. Da die Diffusion zwischen den Tröpfchen unterbunden ist, verhalten sie sich wie unabhängige Reaktionsgefäße und werden daher auch als Nanoreaktoren bezeichnet [4]. Somit ist mit der Miniemulsionspolymerisation jegliche Polymerisationsart in heterogener Phase durchführbar, so z.B. Copolymerisationen [17], anionische und kationische Polymerisationen [18], [19], Polyadditionen [20], und Polykondensationen [21]. Bei der Emulsionspolymerisation ist man hingegen auf die radikalische Polymerisation beschränkt. In Abbildung 5 ist der Ablauf einer anionischen Miniemulsionspolymerisation schematisch dargestellt, wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

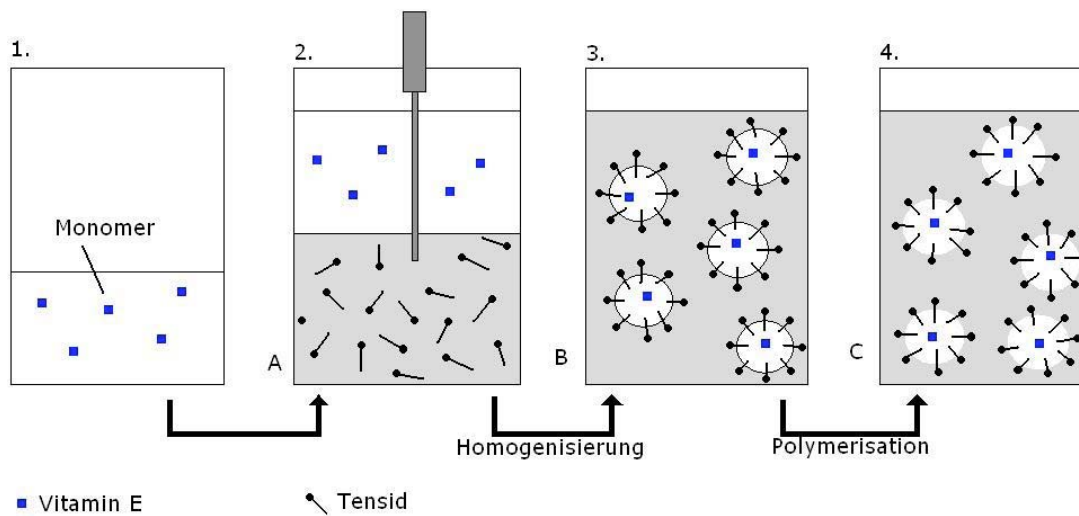


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Miniemulsionsprozess mit anschließender anionischer Polymerisation.

Ein weiterer Vorteil der Miniemulsionstechnik ist die Homogenität bezüglich der Größe und Zusammensetzung der Tröpfchen. Es ist z.B. möglich, Stoffe in Polymerhüllen einzukapseln (siehe 2.1), um somit monodisperse Hybridpartikel, d.h. Partikel, die aus mindestens zwei Komponenten bestehen, mit derselben Größe und Zusammensetzung herzustellen [4]. Sowohl Größe als auch Zusammensetzung können über einen großen Bereich variiert werden. Mit der Miniemulsionstechnik sind damit Partikel mit zahlreichen Eigenschaften für einen breiten Anwendungsbereich synthetisierbar.

2.2. Verkapselung in Nanopartikel

In dieser Arbeit ist ein Ziel die Herstellung von Hybrid-Partikeln aus PBCA und α -Tocopherol, also einer Flüssigkeit und einem Polymer, mit der Miniemulsionstechnik. Bei dieser Methode liegt die Flüssigkeit vor ihrer Verkapselung gelöst in der dispersen Phase vor. Nach der Behandlung durch Ultraschall erhält man zunächst Tröpfchen, die im Idealfall dieselbe Größe und Zusammensetzung besitzen. Im nächsten Schritt erfolgt die Polymerisation, bei der es zu einer Entmischung zwischen der Flüssigkeit, dem Monomer und entstehendem Polymer kommt. Diese Entmischung schreitet

soweit fort, bis die Gleichgewichtsmorphologie erreicht ist [22] (Abbildung 6). Hier sind thermodynamisch stabile Gleichgewichtsmorphologien aufgezeigt, die nun zusammen mit kinetisch stabilen Gleichgewichtsmorphologien näher erläutert werden.

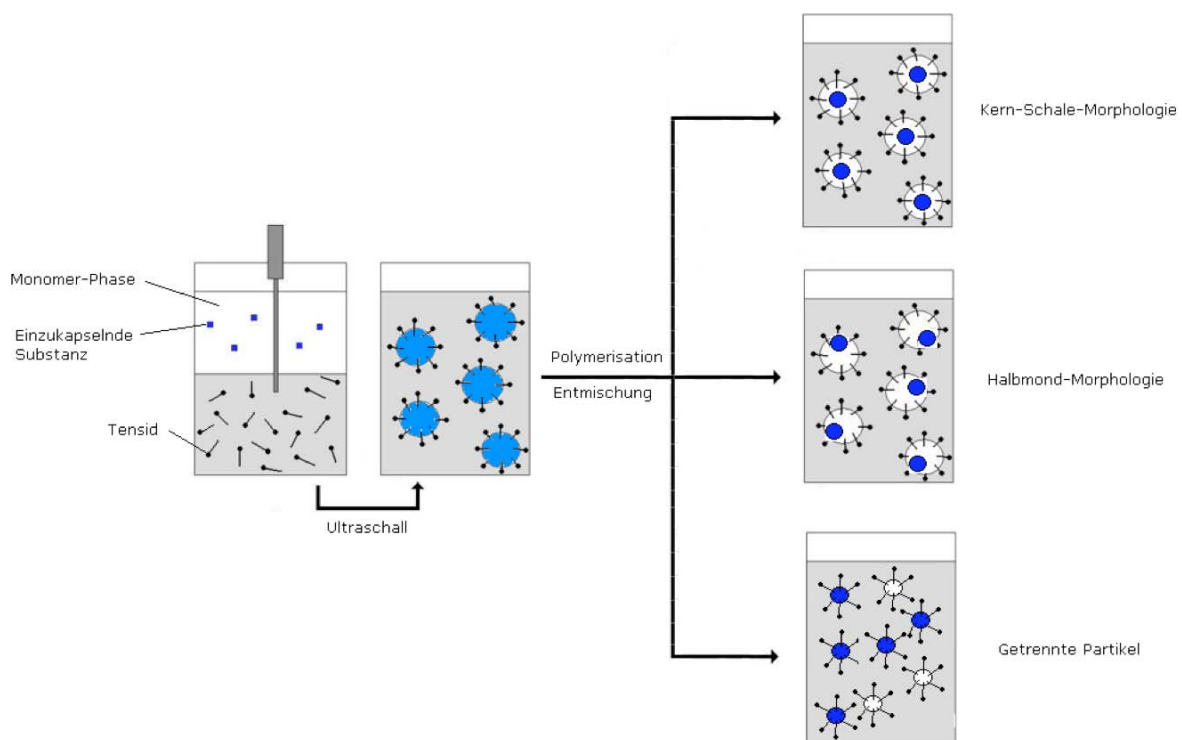


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Verkapselung in Miniemulsion und mögliche Gleichgewichtsmorphologien.

Thermodynamische Morphologien treten auf, wenn es zwischen den beiden Komponenten im Partikel zu einer schnellen Phasenseparation kommt, so dass kinetische Faktoren vernachlässigt werden können und die thermodynamisch stabilste Gleichgewichtsmorphologie erreicht wird. Diese Morphologien wurden z.B. anhand einer Emulsion von Silikonöl und Anilin in Wasser untersucht. Damit konnte die resultierende Gleichgewichtsmorphologie über die Grenzflächenspannungen γ_{ij} , γ_{ik} und γ_{jk} und Spreitkoeffizienten S_i vorausgesagt werden, wobei die Koeffizienten i , j und k jeweils für die drei verschiedenen Phasen, also für die zwei organischen Phasen und die Wasserphase stehen. Daraus lassen sich die drei Spreitkoeffizienten der jeweiligen Phasen ausrechnen [23]:

$$S_i = \gamma_{jk} - (\gamma_{ij} + \gamma_{ik}) \quad (2)$$

Anhängig von den verschiedenen Grenzflächenspannungen sind verschiedene thermodynamische Gleichgewichtsmorphologien denkbar: Eine Komponente kann durch die andere vollständig eingehüllt vorliegen (Kern-Schale-Partikel), aber auch eine teilweise Einhüllung und eine komplette Entmischung, woraus die Bildung separater Tröpfchen resultiert, ist möglich (Abbildung 7).

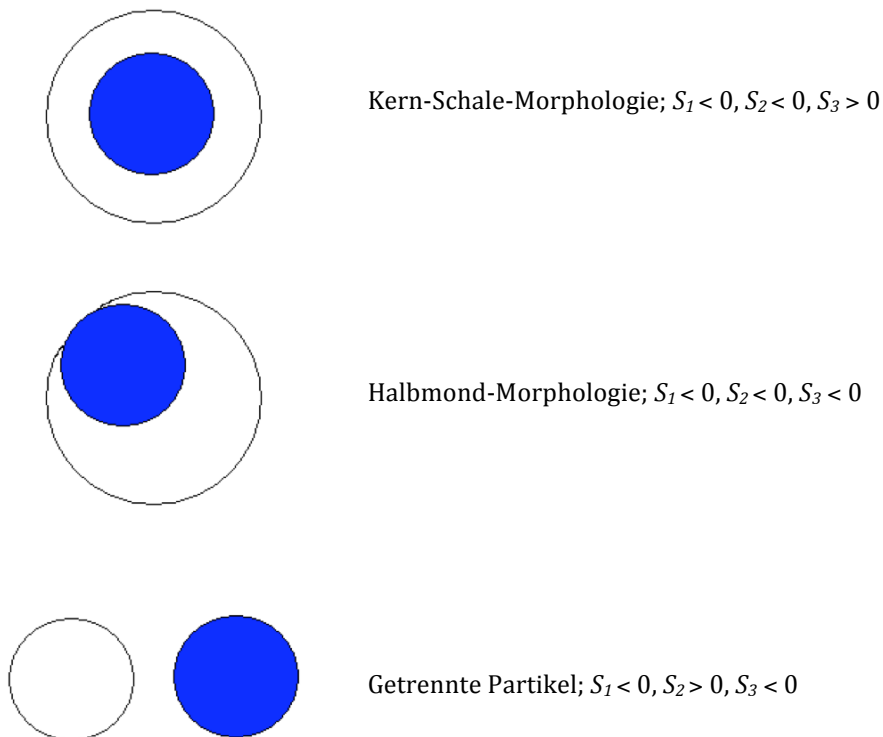


Abbildung 7: Mögliche thermodynamische Gleichgewichtsmorphologien.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Gleichgewichtszustand zwischen drei Phasen derjenige mit einer minimalen freien Grenzflächenenergie ΔG ist:

$$\Delta G = \sum \gamma_{ij} A_{ij} \quad (3)$$

Dabei bezeichnet A_{ij} die Grenzfläche zwischen den Phasen i und j .

Handelt es sich bei mindestens einer der Komponenten nicht um eine niedrigviskose Flüssigkeit, sondern z.B. um ein Polymer, kommen nun neben den thermodynamischen Faktoren zusätzlich kinetische ins Spiel, da die Diffusion der

Polymerketten nicht mehr uneingeschränkt stattfinden kann, woraus eine unvollständige Phasenseparation resultiert [24]. Es wird somit in diesem Fall nicht die thermodynamisch stabilste, sondern die kinetisch stabilste Gleichgewichtsmorphologie erreicht (Abbildung 8). Dabei kann es neben einer mononuklearen Struktur (Kern-Schale) auch zu einer Ausbildung von mehreren Mikrodomänen, also einer polynuklearen Struktur kommen. Im Falle einer kinetisch vollständig eingeschränkten Diffusion der Komponenten kommt es zu keiner Phasenseparation und es entsteht eine Matrix-Struktur. Diese erhält man auch, wenn beide Komponenten mischbar sind und eine Phasenseparation deswegen ausbleibt.

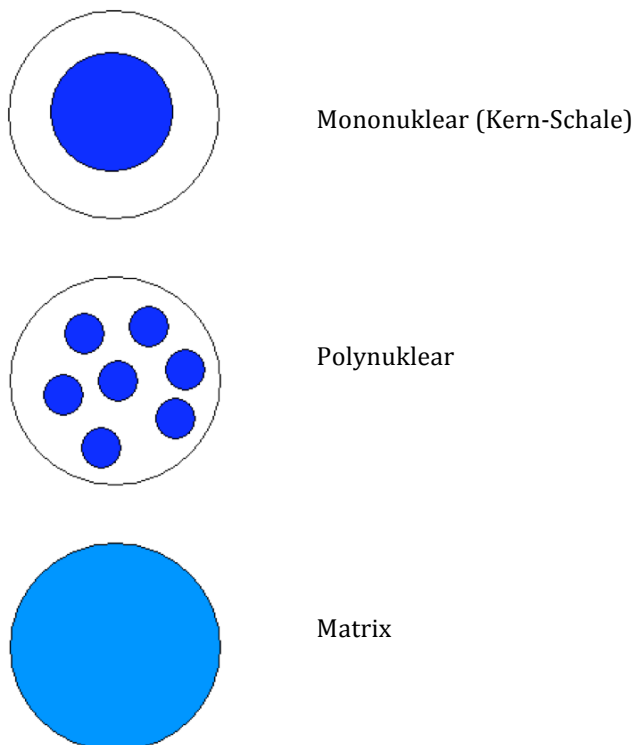


Abbildung 8: Mögliche kinetische Gleichgewichtsmorphologien.

Diese Gleichgewichtsmorphologien sind von der Kettenlänge und dem Vernetzungsgrad des Polymers, aber auch von der Viskosität innerhalb der Partikel abhängig [25].

Im Allgemeinen können Substanzen, welche hydrophober sind als das Monomer, ohne Vorbehandlung verkapselt werden, wie z.B. α -Tocopherol. Substanzen, die hingegen die hydrophiler sind als das Polymer, müssen zur Verkapselung zunächst hydrophobisiert werden. Dies kann durch eine Ummantelung der Oberfläche durch

Octadekanol oder Organosilane erreicht werden. Ein Beispiel hierfür ist die Verkapselungen der anorganischen Substanz SiO_2 [26].

Außer der Miniemulsionstechnik gibt es noch weitere Methoden, um Substanzen in Polymere zu verkapseln:

Eine wie die Miniemulsion chemische Methode ist die Verkapselung durch Emulsionspolymerisation. Hier ist die Verkapselung im Gegensatz zur der in Miniemulsionen stark von kinetischen Faktoren abhängig, da die zu verkapselnde Substanz zusammen mit dem Monomer in die Mizellen diffundieren muss. Daher eignet sich diese Methode nicht für die Verkapselung hydrophober Substanzen.

Weitere Verkapselungsmöglichkeiten ergeben sich durch die physikalischen Methoden der Koextrusion, Sprühtrocknung, Sprühbeschichten oder Vakuumverkapselung. Damit ist die Herstellung von Kapseln mit einem Durchmesser von über einem Mikrometer möglich. Allerdings sind diese Methoden aufwendig und teuer [27]. Eine physikalisch-chemische Methode ist die sogenannte Koazervation, bei der das Hüllmaterial auf die in Tröpfchenform vorliegende zu verkapselnde Substanz ausgefällt wird [27].

Die Eigenschaften der Hybrid-Partikel, wie z.B. mechanische Eigenschaften, Filmbildungsverhalten oder auch Freisetzungverhalten sind stark von ihrer Morphologie abhängig. Durch eine gezielte Herstellung von Partikeln mit einer bestimmten Morphologie kann man somit die Partikeleigenschaften steuern, womit es möglich wird, eine Vielzahl von neuen Materialien herzustellen, die ein breites Anwendungsspektrum abdecken. Dazu gehören z.B. Farben und Lacke, Haftmittel, Kosmetika, magnetische Speichermedien, Katalysatoren oder auch Wirkstofftransportsysteme [28].

2.3. Freisetzungskinetik verkapselter Substanzen

Bei der in dieser Arbeit hergestellten Hybrid-Partikel handelt es sich um sogenannte Wirkstofftransportsysteme. Die Verkapselung soll den Wirkstoff vor äußeren Einflüssen, denen er im Körper ausgesetzt ist, schützen. Nun sind Wirkstofftransportsysteme nur dann effektiv, wenn der Wirkstoff gezielt und richtig dosiert freigesetzt wird. Daher ist die Kenntnis über die Freisetzungskinetik des Wirkstoffs

von großer Wichtigkeit. Soll der menschliche Körper über einen längeren Zeitraum mit einem Wirkstoff versorgt werden, ist eine entsprechend langsame Freisetzung erwünscht. Wiederum wäre eine langsame Freisetzung von Nachteil, wenn der Wirkstoff nur an einer bestimmten Stelle des Körpers mit einem Mal freigesetzt werden soll.

In Abbildung 9 sind verschiedene Arten der Freisetzung dargestellt. Bei Partikeln aus bioabbaubaren Polymeren wird der eingekapselte Wirkstoff im Laufe der Zersetzungszeit abgegeben. Ein Beispiel sind Kapseln aus Poly-(milchsäure-co-glycolsäure) (PLGA), in welche ein Wirkstoff gegen Brust- und Prostatakrebs Leurorelin-Acetat (Leuprogel[®]) eingekapselt ist [29]. Um Bedingungen zu schaffen, welche dem menschlichen Körper entsprechen, wurden die PLGA-Partikel in einer Phosphatpuffer-Lösung (PBS-Lösung) bei 37 °C zersetzt [30], [31].

Partikelhüllen aus bestimmten Polymeren lassen sich durch thermische Einflüsse oder Änderungen des pH-Wertes gezielt beeinflussen, so dass sie unterhalb oder oberhalb einer bestimmten Temperatur oder bei einem definierten pH-Wert den eingekapselten Wirkstoff freisetzen. Eine solche Schaltung einer Polymerhülle wurde z.B. mit Poly-(N-isopropylacrylamid) (Poly-NIPAM) und dessen Derivaten erreicht [32], [33].

In dieser Arbeit wird die Freisetzung von α -Tocopherol über Diffusion durch eine Polymerhülle aus Poly-(n-butylcyanacrylat) erforscht. Die gleiche Freisetzungsvariante mit dem gleichen Polymer wurde schon von *Huang et al.* anhand der Freisetzung von Paclitaxel, einem Wirkstoff gegen Brustkrebs, untersucht [34]. Hierzu wurden die Partikel in einer Tween[®]80 Lösung redispergiert, die das austretende Paclitaxel stabilisieren sollte. Die Freisetzungsgeschwindigkeit ist hier zunächst abhängig von der Durchlässigkeit und der Porengröße der Polymerhülle [35], aber auch die Löslichkeit der verkapselten Substanz im umgebenden Lösungsmittel trägt zur Freisetzungsgeschwindigkeit bei. Die vollständige Freisetzung kann hierbei schon nach wenigen Minuten abgeschlossen sein, allerdings durchaus auch bis zu mehreren Wochen dauern [36], [37].

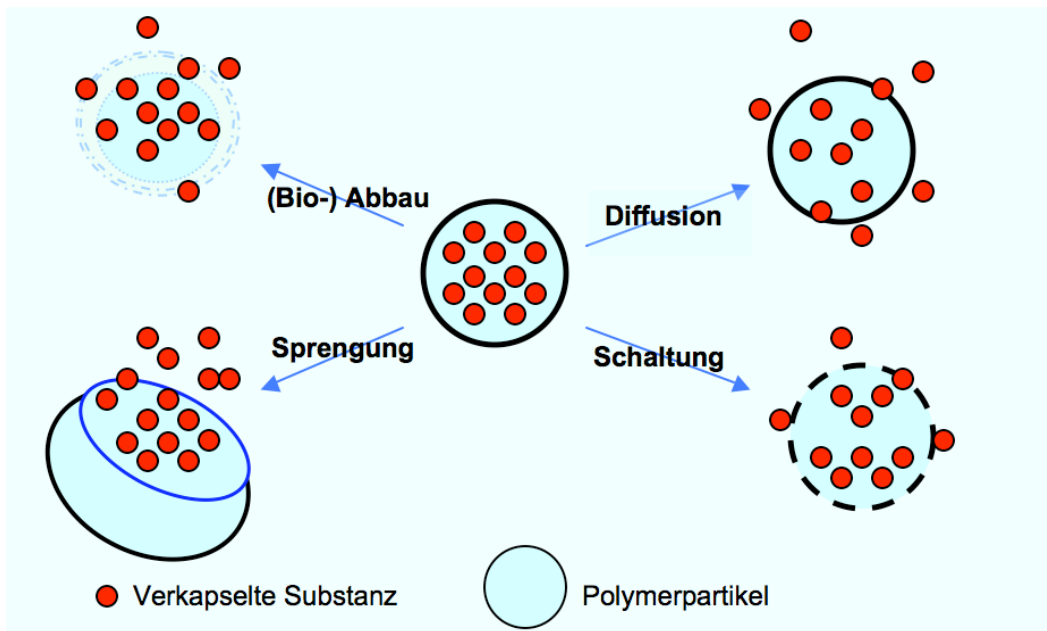


Abbildung 9: Freisetzungsmechanismen verkapselter Substanzen.

2.4. Poly-(n-butylcyanacrylat)

Alkylcyanacrylate gehören zu den wenigen Monomeren, die in der Regel anionisch polymerisiert werden. Die Initiierung erfolgt durch Addition einer Base an die C=C-Bindung. Aufgrund der elektronenziehenden Ester- und Cyanogruppen kann das hierbei entstehende Carbanion ausreichend stabilisiert werden (Abbildung 10).

Die Polymerisation von Alkylcyanacrylaten wird bereits durch die in der Luft enthaltenen Feuchtigkeit initiiert. Dies wird beispielsweise in ihrer Verwendung als Sekundenkleber ausgenutzt. Aufgrund der Verträglichkeit des Polymers wird es außerdem als Wundkleber in der Medizin eingesetzt [38].

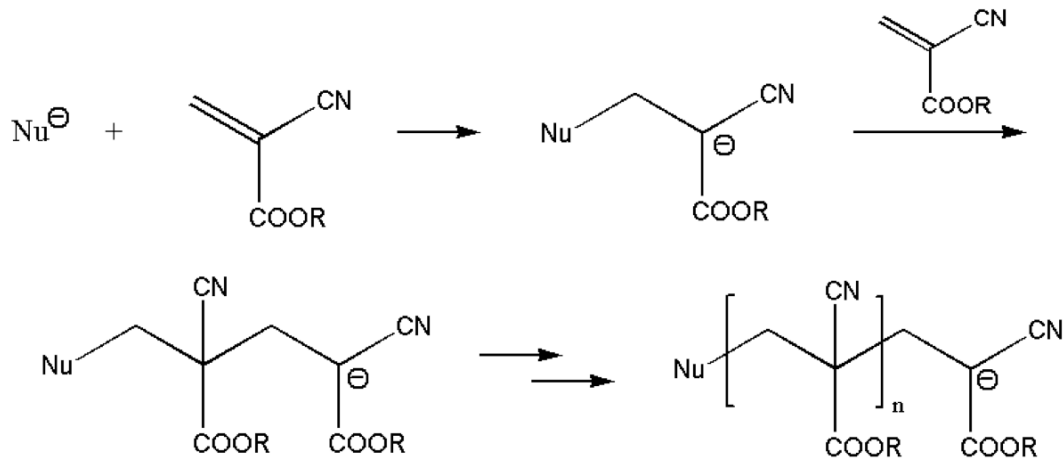


Abbildung 10: Anionische Polymerisation von Alkylcyanoacrylaten.

In neuerer Zeit hat sich v.a. Poly-(n-butylcyanoacrylat) (PBCA) als vielversprechendes Polymer zum Transport von Wirkstoffen hervorgetan. Es ist biologisch abbaubar, ungiftig und zudem einfach zu synthetisieren. Als Wirkstofftransportsystem wurde es bereits für Cytostatika [34], Analgetika [39], Antibiotika [40] und Peptide [41] untersucht. Außerdem hat es die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain-barrier, BBB) und die Blut-Netzhaut-Schranke (blood-retina-barrier, BRB) zu passieren [42], [43] und könnte somit z.B. zur Behandlung von Gehirntumoren Verwendung finden. Dazu muss PBCA in Form von mit Polysorbat 80 ummantelten Nanopartikeln vorliegen [44]. Um eine Detektierung der Nanopartikel im Gehirn bzw. in der Netzhaut mit Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, wurden diese Partikel mit der Miniemulsionstechnik hergestellt, da es auf diesem Weg mit Tween 80 ummantelte PBCA-Nanopartikel mit verkapselten Fluoreszenzmarkern zu erhalten werden konnten [45]. Bei ihrer in-vivo-Anwendung an Ratten wurden die Partikel eindeutig im Gehirn und in der Netzhaut detektiert, womit eine erfolgreiche Durchquerung der BBB bzw. BRB nachgewiesen wurde. Der erfolgte Transport des verkapselten Fluoreszenzmarkers lässt die Annahme zu, dass auch der Transport von anderen verkapselten Substanzen ins Gehirn möglich ist [46]. Der Mechanismus des Wirkstofftransports durch Nanopartikel durch die BBB bzw. BRB ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [47].

In dieser Arbeit wurden PBCA-Partikel mit eingeschlossenem α -Tocopherol mit der Miniemulsionstechnik hergestellt. Als Tenside wurden, wie oben bereits erwähnt, auch die verträglichen Tenside Tween[®] 80 und Lutrol[®] F68 eingesetzt, um die Partikel

später auch als Wirkstofftransportsysteme einsetzen zu können. Diese Arbeit wird sich jedoch ausschließlich mit der Untersuchung der Freisetzung von α -Tocopherol aus den Partikeln beschäftigen.

2.5. Vitamin E

Vitamin E bildet den Überbegriff über die komplette Gruppe der Tocopherole und Tocotrienole (Abbildung 11).

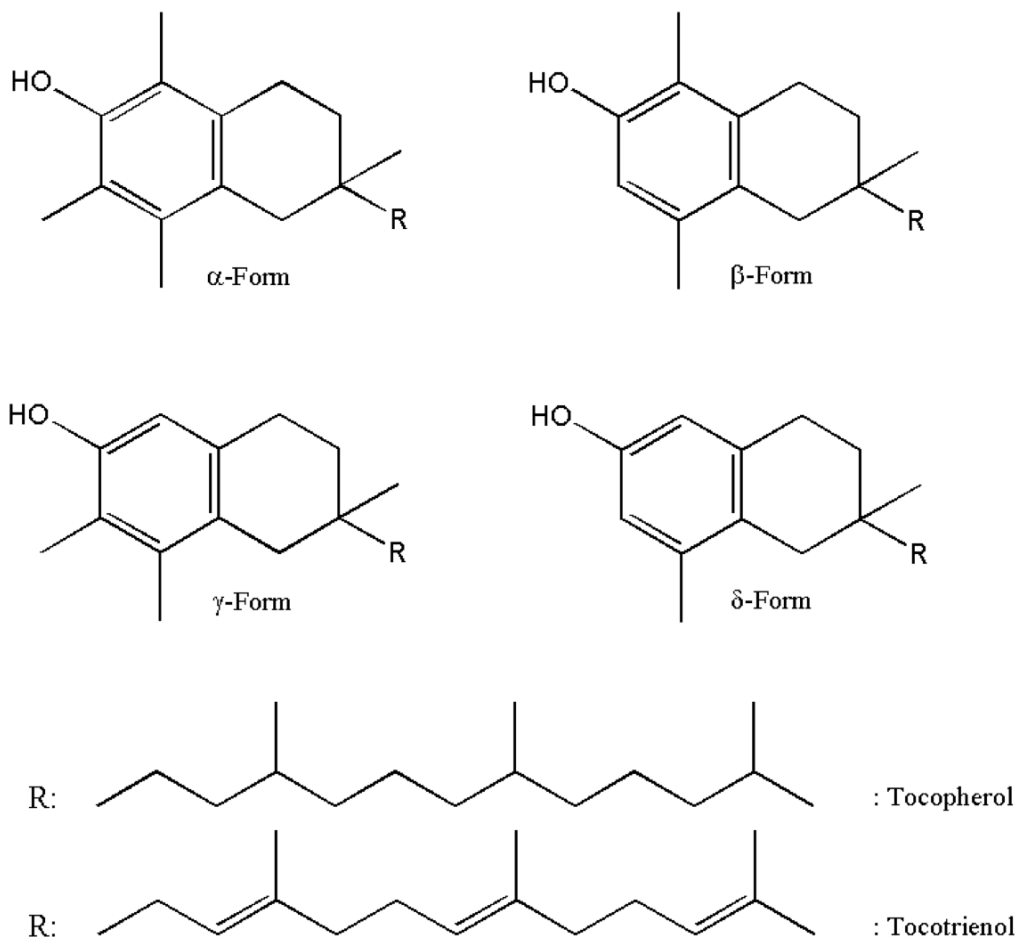


Abbildung 11: Übersicht über Strukturen des Vitamin E.

Dabei ist das α -Tocopherol die aktivste Form im menschlichen Körper [48], [49]. Dort agiert es als Radikalfänger und schützt aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften die hauptsächlich aus Lipiden bestehenden Zellmembranen besonders effektiv vor Angriffen freier Radikale [48] (Abbildung 12).

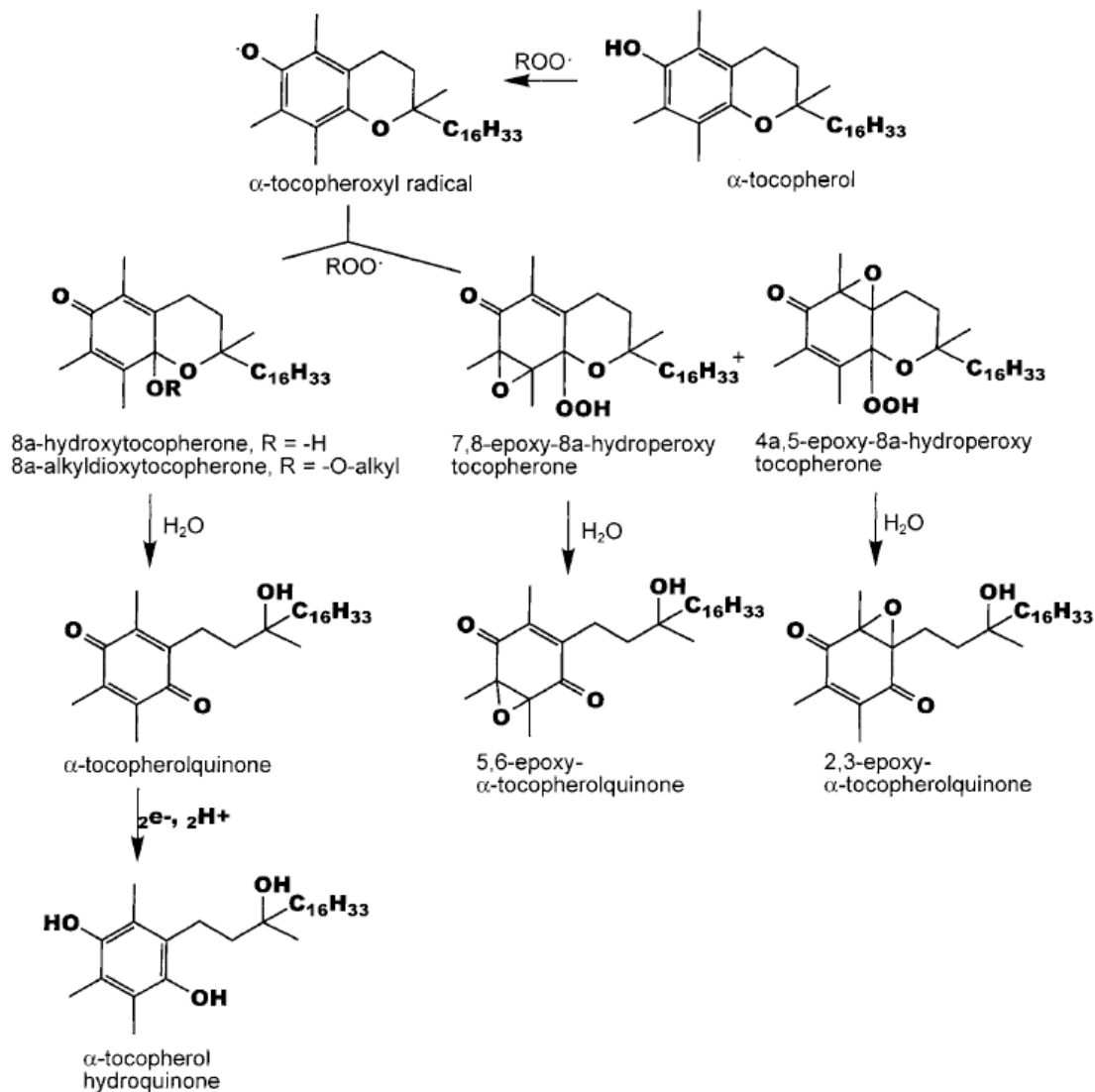


Abbildung 12: Reaktion von α -Tocopherol mit Peroxyl-Radikalen [48].

Freie Radikale können außerdem Lipoproteine, die dem Transport von wasserunlöslichen Lipiden, wie z.B. Cholesterin, im Körper dienen, oxidieren. Die dadurch entstehenden Verbindungen sind für Herz-Kreislauf-Erkrankungen verantwortlich. α -Tocopherol wirkt gerinnungshemmend und trägt zu einer Erweiterung der Blutgefäße bei, weshalb es auch zur Vorbeugung gegen Herzinfarkte eingesetzt werden kann [50]. Es verhindert darüberhinaus das frühe Absterben von roten Blutkörperchen und wirkt Muskelkrämpfen entgegen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass α -Tocopherol positiv zur Bekämpfung von Prostatakrebs beiträgt [51].

Um diese wichtige Funktion von α -Tocopherol im Körper vollständig ausnutzen zu können, wurde in dieser Arbeit PBCA als Wirkstoffträger verwendet, welches im Gegensatz zu vielen anderen radikalisch synthetisierten Polymeren anionisch hergestellt wird. Dadurch beeinflussen sich die antioxidierende Funktion des α -Tocopherol und der Polymerisationsvorgang nicht, sodass dieser nicht behindert wird.

3. Messmethoden

3.1. UV-Vis-Spektroskopie

Mit der UV-Vis-Spektroskopie werden Verbindungen anhand derer Absorption von sichtbarem und ultraviolettem Licht untersucht. Der sichtbare Spektralbereich umfasst einen Wellenlängenbereich von etwa 400-800 nm. Der UV-Bereich reicht noch bis etwas 200 nm hinab. Unterhalb von 200 nm ist keine sinnvolle Messung mehr möglich, da in diesem Bereich auch Küvette und Luft Strahlung absorbieren.

Die UV-Vis-Spektroskopie gehört zu den Elektronenspektroskopien. Das bedeutet, dass Elektronen in ein höheres Energieniveau übergehen, sobald die Energie der anregenden elektromagnetischen Welle der Energiedifferenz zweier elektronischer Zustände entspricht.

Bei diesen beiden elektronischen Zuständen handelt es sich um das HOMO und das LUMO des Moleküls. Orbitale spalten bei Überlappung in ein bindendes und ein antibindendes Orbital auf, wobei im das bindende Orbital besetzt ist (HOMO) während das antibindende Orbital unbesetzt bleibt (LUMO). Bei der Anregung wechseln die Elektronen in das antibindende Orbital. $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge werden nicht beobachtet, da aufgrund der großen Aufspaltung der σ -Orbitale entsprechend hohe Energien zur Anregung benötigt werden, die außerhalb des UV-Vis-Bereichs liegen. Die UV-Vis-Spektroskopie eignet sich somit für die Detektion von energetisch niedrigeren $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen, die z.B. in konjugierten organischen Molekülen möglich sind. Die entsprechenden Frequenzen werden absorbiert und nicht mehr detektiert.

Man erhält somit für jede Verbindung, die im UV-Vis-Bereich absorbiert, eine charakteristische Bande im Absorptionsspektrum. Scharfe Linien werden im Spektrum nicht beobachtet, da die Anregung von einem Schwingungszustand in den nächst höheren in verschiedene Vibrations- oder Rotationszustände erfolgen kann, die sich alle energetisch geringfügig unterscheiden. Zusätzlich kommt es durch Stöße der Moleküle mit Lösungsmittelmolekülen zur sogenannten Stoßverbreiterung. Verwendet man polare Lösungsmittel, kommt es dazu noch zu Wechselwirkungen mit den permanenten und induzierten Dipolen, was ebenfalls zu einer Verbreiterung der

Bande führt [52]. Ein Beispiel für ein Absorptionsspektrum von α -Tocopherol und oxidiertem α -Tocopherol zeigt Abbildung 13 [53].

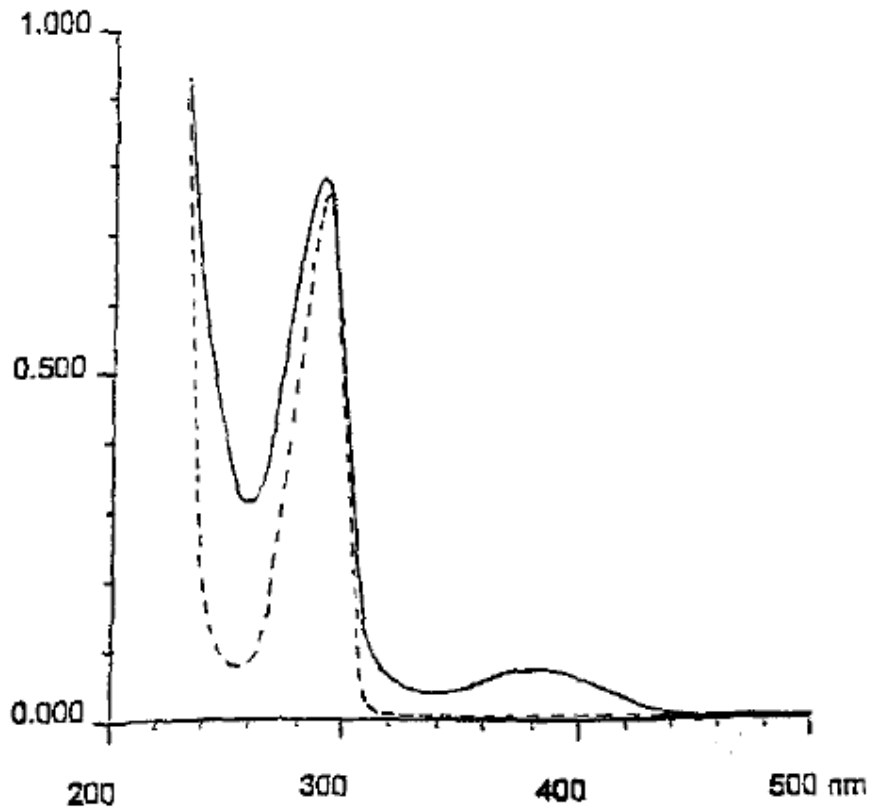


Abbildung 13: Absorptionsspektrum von α -Tocopherol (gestrichelte Kurve) und oxidiertem α -Tocopherol (durchgezogene Kurve).

Der schematische Aufbau eines Spektralphotometers zur Aufnahme der UV-Vis-Spektren, wie er auch in der Arbeit benutzt wurde, ist in Abbildung 14 gezeigt.

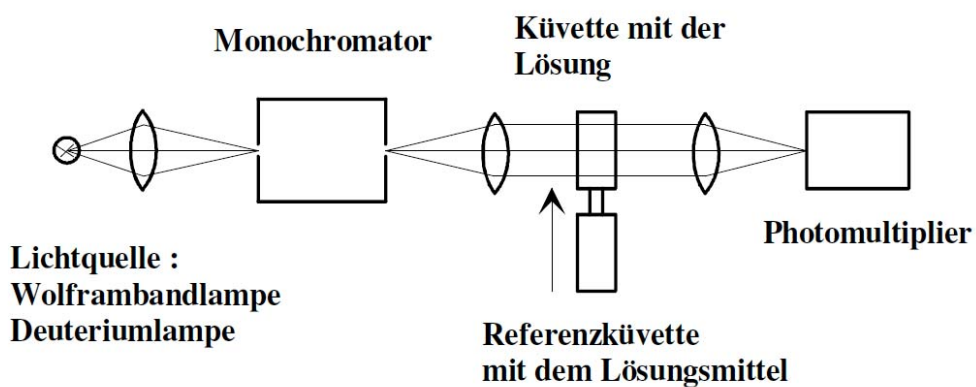


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines Ein-Strahl-Spektralphotometers.

Die UV-Vis-Spektroskopie folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz [52]:

$$E = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (4)$$

E: Extinktion

I: Intensität des transmittierten Lichts

*I*₀: Intensität des einfallenden Lichts

ε: molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

c: Konzentration

d: Schichtdicke der Küvette

Mit dieser Gleichung ist es möglich bei einem bekannten molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten und bekannter Schichtdicke der Küvette aus der Höhe der Absorptionsbande die Konzentration der Probe zu bestimmen.

Es handelt sich hierbei um eine sehr empfindliche Methode. Die UV-Vis-Spektroskopie dient daher in dieser Arbeit zur genauen Quantifizierung von α -Tocopherol in n-Hexan.

3.2. Lichtstreuung

Die Lichtstreuung dient zur Untersuchung und Charakterisierung von Molekülen, indem die Proben mit Licht bestrahlt werden. Hierbei liegt folgendes physikalisches Prinzip zu Grunde: Das elektromagnetische Wechselfeld des Lichts verschiebt die Elektronen des Moleküls periodisch gegen die Kerne und erzeugt so oszillierende Dipole. Diese Dipole wirken ihrerseits wiederum als Sender und strahlen senkrecht zur Oszillationsachse kreisförmige Lichtwellen ab, wobei die Intensität dieses Streulichts mit einem Detektor gemessen werden kann.

Es gibt bei der Lichtstreuung zwei verschiedene Messmodi. Betrachtet man die unter einem definierten Streuwinkel über den Meßzeitraum (ca. 10 s) gemittelte Streustrahlintensitäten, spricht man von der statischen Lichtstreuung. Das Streuvermögen der streuenden Teilchen ist von ihrer Form und ihrer Größe abhängig. Wird einfallendes Primärlicht an mehreren Streuzentren gestreut, so haben die resultierenden Sekundärwellen einen Gangunterschied. Dieser führt zu einer Phasendifferenz der Streuwellen. Es kommt zur Interferenz, weil eine feste Beziehung

zwischen den Phasen der Streuwellen besteht. Nun besitzen Teilchen ab einer gewissen Größe, die ungefähr der Wellenlänge des Lichts entspricht, mehrere Streuzentren. Neben der Interferenz der Streustrahlung, die von Streuzentren unterschiedlicher Teilchen ausgeht, muss auch die Interferenz der Streuwellen von unterschiedlichen Streuzentren innerhalb eines Teilchens berücksichtigt werden. Das hat zu Folge, dass das Streuvermögen des Teilchens winkelabhängig wird. Man erhält den Teilchenformfaktor. Mit ihm können vor allem über die Bestimmung des Trägheitsradius-Quadrates das Gewichtsmittel der Molmassen von Polymeren ermittelt werden.

Der zweite Messmodus, die dynamische Lichtstreuung, wird für die Aufnahme von zeitabhängigen Messungen verwendet. Man erhält aufgrund der Brownschen Bewegung der Partikel, die zu zeitlichen Fluktuationen der interpartikulären Interferenzen führt, auch zeitliche Fluktuationen in der Streuintensität (Abbildung 15) [54].

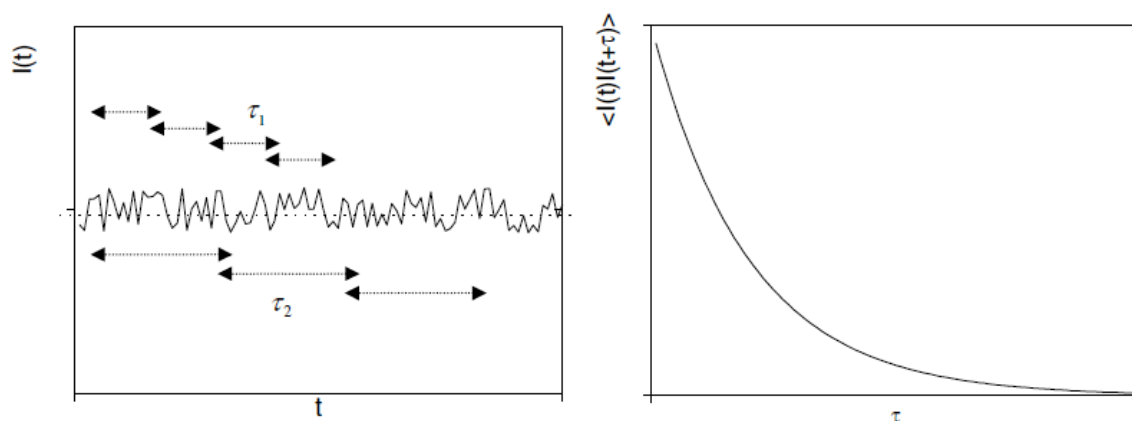


Abbildung 15: links: zeitliche Fluktuationen der Streuintensität; rechts: Autokorrelationsfunktion der Fluktuationen.

Aus der van-Hove-Autokorrelationsfunktion erhält man durch Anwendung der Siegert-Relation den Selbstdiffusionskoeffizienten D_s . Bei bekannter Viskosität η kann man damit mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 3) den hydrodynamischen Radius der Partikel bestimmen [54]:

$$D_s = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (5)$$

D_s : Selbstdiffusionskoeffizient

k : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

η : Viskosität

R_H : Hydrodynamischer Radius

3.3. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei der Gelpermeationschromatographie (GPC) handelt es sich um ein Trennverfahren, das in der Polymer- bzw. Proteinanalytik zur Bestimmung von Molmassen und Molmassenverteilungen eingesetzt wird. Der wesentliche Unterschied zu anderen chromatographischen Methoden besteht darin, dass die Auftrennung der Analysensubstanz nicht auf chemischen Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase beruht. Die Trennung erfolgt nach der Molekülgröße, d.h. nach dem hydrodynamischen Volumen.

Zur Vermessung wird das zu untersuchende Polymer im Eluenten gelöst und anschließend mit hohem Druck durch eine Trennsäule gepresst. Als Säulenmaterial dient bei organischen Eluenten meist ein vernetztes Copolymer von Styrol und Divinylbenzol, bei Wasser verwendet man vernetztes Dextran. In jedem Fall handelt es sich bei dem Säulenmaterial um eine poröse Substanz mit definierten Porengrößen und definierter Porengrößenverteilung.

Die in der mobilen Phase gelösten Polymere dringen nun in das poröse Säulenmaterial ein, wobei Eindringmöglichkeit und Verweildauer von der Polymergröße bestimmt werden. Innerhalb eines größenabhängigen Anteils des gesamten Porenvolumens bewegen sich die Polymere nun vom Eluentenstrom ausgeschlossen durch Diffusion fort, bis sie schließlich wieder von der mobilen Phase aufgenommen und eluiert werden.

Kleinere Polymere können einen größeren Teil des Gesamtporenvolumens einnehmen und werden entsprechend langsamer eluiert als größere.

Große Polymere, deren Durchmesser die Porengröße überschreiten, können in das Säulenmaterial nicht eindringen. Sie werden mit dem Lösungsmittelfluss durch die Trennsäule mitgenommen und können nicht voneinander getrennt werden. Das bis

dahin eluierte Volumen wird Totvolumen V_{tot} genannt und ist neben dem Porenvolumen V_x und dem Zwischenkornvolumen V_0 ist in Abbildung 16 gegeben. Sehr kleinen Moleküle steht das gesamte Porenvolumen V_x zur Verfügung. Diese verlassen mit dem maximalen Elutionsvolumen ($V_0 + V_x$) ebenfalls ungetrennt die Säule.

Um nun auf die absolute Molmasse schließen zu können, muss die GPC vor jeder Messung mit einem entsprechenden Polymer bekannter Molmasse kalibriert werden. Es handelt sich hierbei also um eine Relativmethode.

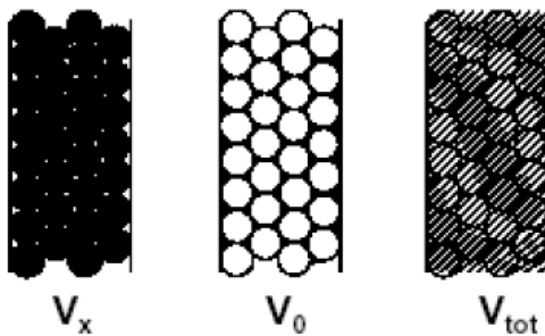


Abbildung 16: Schematische Darstellung der verschiedenen Volumina innerhalb einer Trennsäule.

4. Experimenteller Teil

4.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Monomere (BCA und ECA) sind eine Spende der Henkel AG. Alle anderen erforderlichen Chemikalien sind kommerziell erhältlich. Diese sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Aus Tabelle 2 kann entnommen werden für welche Anwendungen welche Geräte zum Einsatz kamen.

Tabelle 1: Chemikalienverzeichnis.

Chemikalie	Summenformel	Hersteller	Reinheit
α -Tocopherol	$C_{29}H_{50}O_2$	Sigma-Aldrich	$\geq 96\%$
Hexadekan	$C_{16}H_{34}$	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$
Natriumlaurylsulfat	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$
Tween 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	BASF	k.A.
Lutrol F68		BASF	k.A.
n-Hexan	C_6H_{14}	Fisher-Scientific	95%
Phosphorsäure	H_3PO_4	Sigma-Aldrich	$\geq 99,999\%$
Natronlauge	NaOH	Carl Roth	k.A.

Tabelle 2: Geräteverzeichnis.

Methode	Hersteller	Gerätebezeichnung
UV-Vis-Spektrometrie	Perkin-Elmer	Lambda 25 UV-Vis-Spektrometer
	Hellma	100-QS Quarzküvette (10 mm)
Dynamische Lichtstreuung	Sympa Tec	Nanophox DLS-Gerät
	Sarstedt	PMMA-Küvetten (10mm)
Ultraschall	Branson Digital	Sonifier W-450D (1/2"-Spitze)
Extraktion	Ika	Vortex Genius 3
Zentrifugation	Sigma	2-16k
Filtern	Millipore	Hydrophobic PTFE 0,2 μ m
Gefriertrocknung	Christ	Alpha 2-4 LD plus
Gravimetrie	Mettler	AE 163 Analysenwaage
GPC	Waters	Waters 515 Pumpe
		Waters 717plus Injektor
	PSS	SDV-Trennsäulen
	SOMA	UV S-3702 UV-Detektor
	ERC	ERC RI-101 IR-Detektor

4.2. Synthese der PBCA-Partikel

4.2.1. Miniemulsion mit Hexadekan als Hydrophob

Für die kontinuierliche Phase wurde das Tensid in einer H_3PO_4 -Lösung gelöst. Dabei wurde bei SDS stets eine 0,1 molare H_3PO_4 -Lösung, bei Tween[®]80 und Lutrol[®]F68 eine 1 molare H_3PO_4 -Lösung verwendet. Für die disperse Phase wurde α -Tocopherol in BCA gelöst. Die eingesetzten Mengen können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Probenzusammensetzung VN001-003.

Probenbezeichnung	Tensid	m (Tensid) / g	m (H_3PO_4 -Lösung) / g	m (Hexadekan) / g	m (BCA) / g
VN001	SDS	0,90	36	0,375	9
VN002	Tween 80	2,25	36	0,375	9
VN003	Lutrol F68	2,25	36	0,375	9

Die kontinuierliche Phase wurde in einen 100 ml PMP-Becher (Polymethylpenten) gegeben und anschließend die disperse Phase unter Rühren (1000 U/min) hinzugegeben. Nach einer zweiminütigen Vorhomogenisierung bei 1000 Umdrehungen pro Minute wurde die Probe im PMP-Becher durch Ultraschall ($\frac{1}{2}$ ''-Spitze, Amplitude: 90%, gesamte Schallzeit: 2,5 min, Puls: 2 s, Pause: 15 s) homogenisiert. Während der Schallzeit wurde die Probe im Eisbad gekühlt. Nach der Behandlung im Ultraschall wurde der Probe VN001 36 g 0,1 molare NaOH-Lösung zur Initiierung der Polymerisation hinzugefügt und konnte direkt für weitere Analysen verwendet werden. Die Proben VN002 mit Tween[®]80 und VN003 mit Lutrol[®]F68 wurden ohne Zugabe eines zusätzlichen Initiators zur Polymerisation über Nacht stehengelassen.

4.2.2. Verkapselung von α -Tocopherol

Die Verkapselung von α -Tocopherol erfolgt nach derselben Vorgehensweise wie in 4.2.1 beschrieben. Dabei wurde lediglich das Hexadekan durch α -Tocopherol ersetzt.

Die Polymerisation nach der Behandlung mit Ultraschall wurde bei den Proben VN004 bis VN004d mit 36 g 0,1 molarer NaOH-Lösung initiiert und konnten direkt für weitere Analysen verwendet werden. VN005 bis VN005d und VN006 bis VN006d wurden über Nacht zur Polymerisation stehengelassen.

In Tabelle 4 sind die eingesetzten Mengen aufgelistet.

Tabelle 4: Probenzusammensetzung VN004-006d.

Probenbezeichnung	Tensid	m (Tensid) / g	m (H ₃ PO ₄ -Lösung) / g	m (α-Tocopherol) / g	m (BCA) / g
VN004	SDS	0,9	36	0,375	9,000
VN004a	SDS	0,9	36	0,938	8,438
VN004b	SDS	0,9	36	1,875	7,500
VN004c	SDS	0,9	36	3,750	5,625
VN004d	SDS	0,9	36	5,625	3,750
VN005	Tween 80	2,25	36	0,375	9,000
VN005a	Tween 80	2,25	36	0,938	8,438
VN005b	Tween 80	2,25	36	1,875	7,500
VN005c	Tween 80	2,25	36	3,750	5,625
VN005d	Tween 80	2,25	36	5,625	3,750
VN006	Lutrol F68	2,25	36	0,375	9,000
VN006a	Lutrol F68	2,25	36	0,938	8,438
VN006b	Lutrol F68	2,25	36	1,875	7,500
VN006c	Lutrol F68	2,25	36	3,750	5,625
VN006d	Lutrol F68	2,25	36	5,625	3,750

4.3. Synthese der PECA-Partikel

Die Synthese der PECA-Partikel erfolgte nach der Vorschrift aus 4.2.1. Statt BCA wurde hier ECA eingesetzt.

4.4. Charakterisierung der Partikel

4.4.1. Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung wurden die Dispersionen mittels Dynamischer Lichtstreuung vermessen.

Dazu wurde ein Tropfen der Dispersion in eine Küvette gegeben und mit Wasser verdünnt. Die Verdünnung wurde so eingestellt, dass im Laser eine Zählrate von 300 kcpm (kilo counts per minute) erreicht wurde. Dazu wurde die Küvette in die Halterung gestellt und der Vorlauf zur Messung gestartet. Beim Erreichen der 300 kcpm wurde die Messung automatisch gestartet. Folgende Parameter wurden dazu eingestellt:

Die Dichte des PBCA wurde auf $1,148 \text{ g/cm}^3$ gestellt; der komplexe Brechungsindex wurde auf 1,49 gestellt; als Lösungsmittel wurde Wasser eingestellt; die Messtemperatur wurde auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gestellt; als Messzeit wurde dreimal 100 s gewählt.

4.4.2. UV-Vis-Spektroskopie

Mithilfe des UV-Vis-Spektrometers wurde das in n-Hexan gelöste α -Tocopherol quantifiziert.

Für diese Messung wurde zunächst als Referenz reines n-Hexan vermessen. Danach konnte die α -Tocopherolkurve aufgenommen werden. Die Verdünnung des α -Tocopherols mit n-Hexan wurde dabei so eingestellt, dass der α -Tocopherolpeak zwischen 1 und 2 auf der Absorptionsachse (y-Achse) liegt. Gemessen wurde bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 200 nm, wobei bei 326 nm ein Lampenwechsel von der Vis-Lampe auf die UV-Lampe erfolgte. Die Scangeschwindigkeit wurde auf 120 nm pro Minute eingestellt. Als Küvetten kamen Quarzküvetten für Absorptionsmessungen mit 10 mm Schichtdicke zum Einsatz.

4.4.3. Feststoffbestimmung

Für die Feststoffbestimmung wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß die jeweilige Dispersion bis etwa zur 1,5 ml-Markierung auf der Analysenwaage eingewogen und das Gewicht notiert. Anschließend wurde das offene Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Zellstoff verschlossen und zum Gefrieren für ca. 2 min. in flüssigen Stickstoff gehalten. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden so in einen mit Zellstoff ausgekleideten Kolben gelegt. Dieser Kolben wurde über Nacht an die Gefriertrocknungsanlage bei einem Vakuum von 0,01 mbar und einer Eiskondensatortemperatur von -60 °C angebracht. Nicht umgesetztes Monomer und Wasser wurden so durch Sublimation entfernt, womit die Partikel als Feststoff erhalten wurden. Dieser wurde abgewogen und daraus der Feststoffgehalt ermittelt.

4.4.4. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei der GPC-Messung wurden ca. 5 mg der Partikel in 1ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst und davon 100 µl in die GPC-Anlage injiziert. Das Flussmittel war THF, die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Temperatur wurde auf 30 °C eingestellt. Als Säulenmaterial kam ein kugelförmiges vernetztes Styrol-Divinylbenzol-Copolymer mit einem Durchmesser von 10 µm zum Einsatz. Es wurden drei Säulen mit einem Durchmesser von 0,8 cm und Länge von 30 cm eingesetzt. Die Porosität der Partikel betrug bei der ersten Säule 10^6 Å, bei der zweiten 10^4 Å und bei der dritten 500 Å. Als Detektoren kamen ein UV-Vis- und ein IR-Detektor zum Einsatz.

4.5. Zentrifugation der Dispersionen

Bei der Zentrifugation aus 5.1.3 der Partikel wurden 5 g Dispersion in Zentrifugenröhrchen abgewogen und bei 2000 U/min 20 min zentrifugiert.

In der nächsten Stufe wurde die Dispersion für weitere 30 min bei einer Geschwindigkeit von 10000 U/min zentrifugiert. Der dabei erhaltene Bodensatz

wurde vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde 3 h bei 15000 U/min zentrifugiert.

4.6. Bestimmung der Freisetzungskinetik

Für die Bestimmung der Freisetzungskinetik wurden 960 mg gefriergetrocknete Partikel abgewogen und zu 40 ml n-Hexan hinzugefügt. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 2000 U/min wurden in regelmäßigen Abständen mit einer Eppendorfpipette ein Aliquot von 1,8 ml entnommen und der enthaltene Feststoff durch einen Spritzenfilter abgetrennt.

Zur gravimetrischen Quantifizierung des α -Tocopherols wurde das n-Hexan im Vakuumofen bei 40 °C unter leichtem Vakuum abgezogen, so dass nur noch das α -Tocopherol übrigblieb.

Zur Quantifizierung mittels UV-Vis-Spektrometrie wurde die α -Tocopherollösung direkt zur Messung in eine Küvette gefüllt.

4.7. Extraktion

Es wurden 4 g Dispersion in Zentrifugenröhrchen eingewogen und 5 ml n-Hexan hinzugegeben. Zur Extraktion wurde das Zentrifugenröhrchen im Vortex eine Minute gerührt und danach für drei Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, um eine schnellere Phasentrennung zu bewirken. Das n-Hexan wurde mit einer Pipette von der Dispersion abgetrennt, um das enthaltene α -Tocopherol im UV-Vis-Spektrometer zu quantifizieren. Dazu mussten keine weitere Verdünnung vorgenommen werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel widmet sich der Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel.

Als Monomer wurde Butylcyanacrylat (BCA) verwendet, welches anionisch polymerisiert wurde. Es wurden dabei das ionische Tensid SDS mit den nichtionischen Tensiden Tween®80 und Lutrol®F68 verglichen. Als hydrophobe Komponente kam Hexadekan zum Einsatz, das später durch α -Tocopherol ersetzt wurde.

Das α -Tocopherol wurde schließlich in verschiedenen Konzentrationen in PBCA eingekapselt, um die Kinetik der Freisetzung aus den Partikeln zu untersuchen. Anhand dieser Untersuchung soll die Eignung dieser Hybrid-Nanopartikel als Wirkstofftransportsystem überprüft werden.

5.1. Herstellung und Analyse der PBCA-Partikel

5.1.1. Vergleich der Tenside SDS, Tween®80 und Lutrol®F68

Tenside sind nicht nur für die Stabilisierung der Nanopartikel unerlässlich, sondern tragen auch zu einer Erhöhung der Resorption des Wirkstoffs und zu einer Verlängerung seiner Verweildauer in den Zellen bei [55]. Nichtionische Tenside haben sich hier als vorteilhaft erwiesen, da sie im Allgemeinen besser verträglich sind als ionische Tenside. Ionische Tenside können Proteine aus der Zellmembran lösen. Diese Proteine bilden die Zellkontakte und haben die Aufgabe, das Gewebe zusammenzuhalten und die Kommunikation von Zellen miteinander zu ermöglichen. Daher ist ihre Verwendung ab einer bestimmten Konzentration toxikologisch bedenklich [56].

Sowohl Tween®80 als auch Lutrol®F68 sind nichtionische Tenside, weswegen sie zur Stabilisierung der PBCA-Dispersion benutzt werden, um ihre Eignung für den Einsatz in einem Wirkstofftransport-System zu überprüfen. SDS, welches zwar ein ionisches Tensid ist, wurde zu Vergleichszwecken ebenfalls verwendet, das es eine gute Stabilisierung der Dispersion garantiert.

Mit den drei genannten Tensiden wurde über den Miniemulsionsprozess jeweils eine Dispersion hergestellt. Da die elektrostatische Stabilisierung der Teilchen durch SDS effektiver ist als die sterische Stabilisierung durch Tween[®]80 und Lutrol[®]F68, die außerdem noch ein deutlich größeres Molekulargewicht als SDS besitzen, wurden größere Mengen an Tween[®]80 und Lutrol[®]F68 als SDS eingesetzt (Tabelle 5).

In der dispersen Phase, bestehend aus dem Monomer BCA, wurde das Hydrophob Hexadekan gelöst. Als kontinuierliche Phase lag das jeweilige Tensid in einer H₃PO₄-Lösung vor. Durch das saure Milieu soll einer vorzeitigen Polymerisation vorgebeugt werden. Dabei wurde bei SDS mit 0,1 molarer H₃PO₄-Lösung gearbeitet, bei Tween[®]80 und Lutrol[®]F68 hingegen mit 1 molarer H₃PO₄-Lösung, da diese beiden nichtionischen Tenside auch durch ihre Hydroxylgruppen eine vorzeitige Polymerisation initiieren könnten. Zudem wurde in PMP-Bechern statt in Glasbehältern gearbeitet, um eine ungewollte Initiierung der Polymerisation durch Hydroxylgruppen der Glasoberfläche zu verhindern.

Nach Behandlung durch Ultraschall wurde die Polymerisation durch Zugabe einer NaOH-Lösung in den durch SDS stabilisierten Tröpfchen initiiert. Die durch Tween[®]80 bzw. Lutrol[®]F68 stabilisierten Miniemulsionen wurden über Nacht stehengelassen. Wegen der Hydroxylgruppen dieser Tenside (Abbildung 1) benötigt man hier keine zusätzliche Base zur Initiierung der Polymerisation.

Tabelle 5 kann entnommen werden, dass mit SDS (VN001) mit einer mittleren Größe von 78 nm die kleinsten und mit Tween[®]80 (VN002) mit 270 nm die größten Partikel erhalten werden. Mit Lutrol[®]F68 (VN003) erhält man Partikel mit einer mittleren Größe von 167 nm. Diese Größenunterschiede können damit erklärt werden, dass eine deutlich größere Stoffmenge an SDS eingesetzt wurde als an Tween[®]80 und Lutrol[®]F68. Die 0,3 g SDS (M=288 g/mol) entsprechen einer Stoffmenge von $1,04 \times 10^{-3}$ mol, während 0,75 g Tween[®]80 (M=1310 g/mol) $5,73 \times 10^{-4}$ mol und 0,75 g Lutrol[®]F68 (M=7700-9510 g/mol) etwa $9,82 \times 10^{-5}$ mol entsprechen. Durch diese größere Stoffmenge an SDS kann auch eine größere Grenzfläche stabilisiert werden, woraus die kleineren Partikel resultieren. Außerdem besitzt SDS wegen seines ionischen Charakters die effektivste Stabilisierungswirkung. Obwohl Tween[®]80 in einer größeren Stoffmenge eingesetzt wurde als Lutrol[®]F68, fallen die Partikel mit

Tween[®]80 größer aus. Das deutet auf eine effektivere Stabilisierungswirkung von Lutrol[®]F68 gegenüber Tween[®]80 hin.

Die Breite der Größenverteilung der Partikel soll durch die Halbwertsbreiten, die aus den Gaußkurven in Abbildung 17 ermittelt wurden, dargestellt werden. Hier ist zu erkennen, dass mit SDS die engste Größenverteilung vorliegt, während mit Tween[®]80 die Verteilung der Partikelgrößen am breitesten ausfällt. Diese Ergebnisse können auch auf die Stabilisierungseffektivität der Tenside zurückgeführt werden. Je effektiver die Stabilisierung der Partikel ist, desto effektiver wird die Koaleszenz, die zu einer breiteren Größenverteilung führt, unterdrückt. Wie bereits oben bei der Bestimmung der Partikelgrößen erwähnt, besitzt SDS aufgrund der höchsten eingesetzten Stoffmenge und seines ionischen Charakters die größte Stabilisierungswirkung. Die Stabilisierung durch Lutrol[®]F68 muss höher ausfallen als die durch Tween[®]80, da die Partikel trotz einer größeren eingesetzten Stoffmenge die breiteste Größenverteilung aufweisen.

Der theoretische Feststoffgehalt beträgt bei Dispersionen mit SDS 12,49%, mit Tween[®]80 und Lutrol[®]F68 24,41%. Aus Tabelle 5 kann man entnehmen, dass der Feststoffgehalt der hergestellten Dispersionen um ungefähr 10% niedriger liegt.

Etwa 90% der dispersen Phase liegen somit als Partikel in der Dispersion vor. Der fehlende Feststoff kann durch koagulierte Partikel hervorgerufen werden, die als Bodensatz in der Dispersion vorliegen.

Tabelle 5: Zusammensetzung und Eigenschaften der Proben VN001-VN003.

Probenbezeichnung	Monomer	Hydrophob	Tensid	m(Tensid) / g	Partikelgröße / nm	Halbwertsbreite / nm	Feststoffgehalt / Gew. %
VN001	BCA	Hexadekan	SDS	0,30	78	23	11,53
VN002	BCA	Hexadekan	Tween 80	0,75	270	65	22,48
VN003	BCA	Hexadekan	Lutrol F68	0,75	167	40	22,36

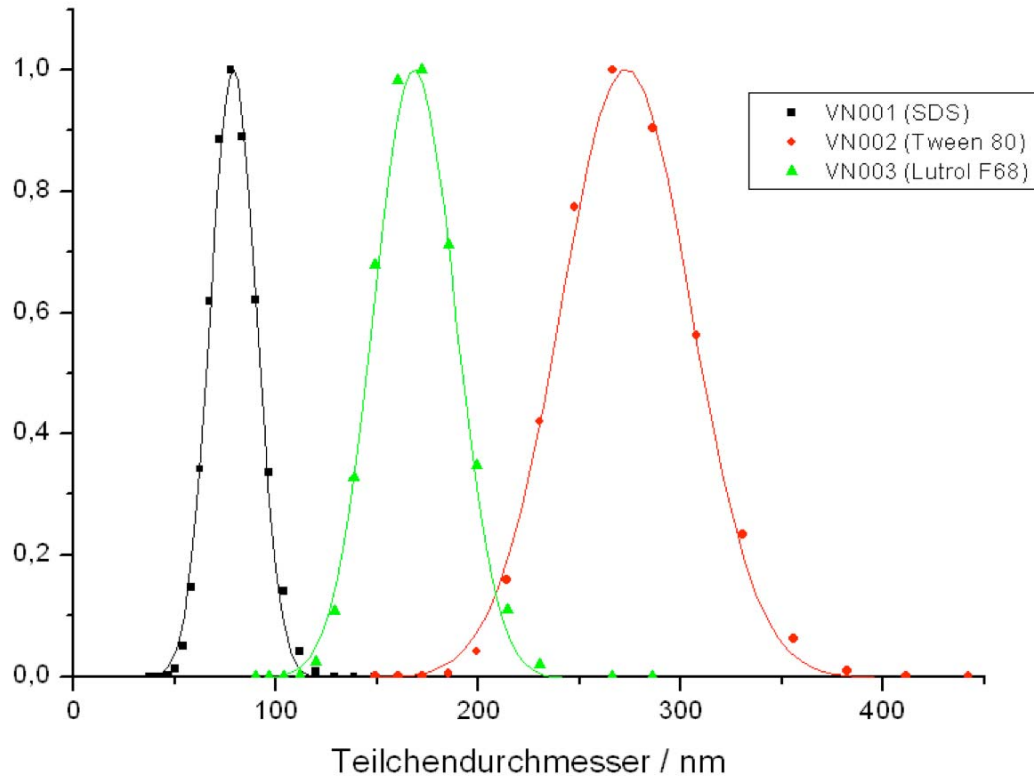


Abbildung 17: Größenverteilung der Partikel aus den Proben VN001-VN003 aus DLS-Messungen.

5.1.2. Verkapselung von α -Tocopherol

α -Tocopherol (Abbildung 18) soll über den Miniemulsionsprozess in eine PBCA-Schale eingekapselt werden. Es nimmt dabei auch die Funktion des Hydrophobs ein. Die Zusammensetzung und Eigenschaften der hergestellten Dispersionen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

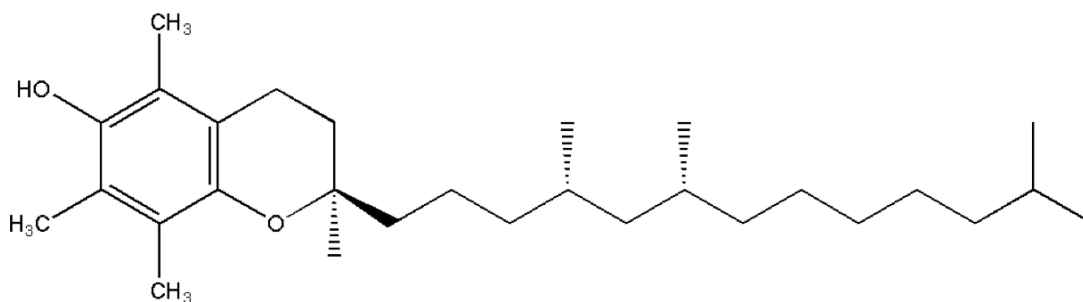


Abbildung 18: Strukturformel von α -Tocopherol.

Tabelle 6: Zusammensetzung und Eigenschaften der Proben VN004-VN006d.

Probenbezeichnung	Tensid	α -Tocopherol / Gew. %	Partikelgröße / nm (x_{50})	Halbwertsbreite / nm	M_n / g/mol	M_w / g/mol	Polydispersität (PDI)	Feststoffgehalt / Gew. %
VN004	SDS	4	79	24	36000	147000	4,11	11,15
VN004a	SDS	10	97	29	38000	154000	4,05	12,56
VN004b	SDS	20	109	33	41000	203000	4,93	12,37
VN004c	SDS	40	126	36	35000	156000	4,48	12,30
VN004d	SDS	60	199	48	49000	348000	7,06	11,04
VN005	Tween 80	4	221	53	8000	43000	5,70	21,41
VN005a	Tween 80	10	309	70	6000	67000	10,82	22,53
VN005b	Tween 80	20	368	--	21000	83000	3,92	21,56
VN005c	Tween 80	40	295	64	4000	17000	4,00	19,15
VN005d	Tween 80	60	373	--	5000	11000	2,13	23,54
VN006	Lutrol F68	4	189	43	16000	155000	9,81	24,06
VN006a	Lutrol F68	10	207	49	14000	124000	8,92	22,90
VN006b	Lutrol F68	20	221	53	15000	151000	9,92	22,52
VN006c	Lutrol F68	40	263	66	20000	177000	9,02	23,81
VN006d	Lutrol F68	60	494	--	19000	197000	10,27	22,66

Wie schon bei der Herstellung der Proben VN001-VN003 (5.1.1) besteht die disperse Phase aus dem Monomer und dem Hydrophob, das in verschiedenen Konzentrationen zwischen 4 und 60 Gewichtsprozent eingesetzt wurde. Die kontinuierliche Phase setzt sich aus einer H_3PO_4 -Lösung und dem Tensid zusammen. Wieder wurde bei den Proben VN004-VN004d mit SDS als Tensid zur Initiierung der Polymerisation eine NaOH-Lösung hinzugegeben. VN005-VN005d und VN006-VN006d mit den Tensiden Tween[®]80 und Lutrol[®]F68 wurden zur Polymerisation über Nacht stehen gelassen.

Die erhaltenen Dispersionen weisen einen Gelbstich auf, welcher auf das α -Tocopherol zurückzuführen ist und entsprechend mit steigender α -Tocopherolkonzentration der Partikel intensiver wird. Mit allen Tensiden erhält man bis zu einer Konzentration von 20% α -Tocopherol stabile Dispersionen. Bei den Dispersionen mit 40% und 60% α -Tocopherolanteil der dispersen Phase bildet sich ein fester Bodensatz aus Polymer und eine an der Oberfläche der Dispersion schwimmende α -Tocopherolschicht. Bereits nach wenigen Tagen tritt hier eine Entmischung der Phasen ein.

Der theoretische Feststoffgehalt beträgt bei Dispersionen mit SDS 12,49%, mit Tween®80 und Lutrol®F68 24,41%. Aus Tabelle 6 kann man entnehmen, dass der Feststoffgehalt der hergestellten Dispersionen wie oben um ungefähr 10% niedriger liegt. Weshalb der Umsatz der Polymerisation nicht vollständig ist, wurde bereits in 5.1.1 diskutiert.

Aus den GPC-Daten kann man keinen eindeutigen Trend des Molekulargewichts in Abhängigkeit von der eingesetzten α -Tocopherolmenge feststellen. Auch in Bezug auf die Polydispersität ist kein Trend festzustellen. Bei den Partikeln VN004-VN004d liegen alle Molekulargewichte sowie Polydispersitäten in derselben Größenordnung. Lediglich die Polydispersität von VN004d erweist sich als etwas höher. Auch bei den Proben VN006-VN006d liegen alle Werte etwa im gleichen Bereich. Die Polydispersitäten sind insgesamt viel größer als bei VN004-VN004d. Das könnte an der Art der Initiierung liegen. Bei den Proben mit SDS wurde die Polymerisation durch Zugabe von Natronlauge schlagartig initiiert, so dass durch die quasi gleichzeitige Polymerisation die Größenverteilung relativ schmal gehalten wird. Bei den Proben mit Lutrol®F68 wurde die Polymerisation ohne zusätzlichen Initiator über einem längeren Zeitraum initiiert, was zu einer vergleichsweise breiteren Größenverteilung führt. Die Partikel VN005-VN005d weisen die größten Schwankungen und die kleinsten Molekulargewichte auf.

Aus Tabelle 6 lässt sich außerdem entnehmen, dass mit steigender α -Tocopherolkonzentration auch der Durchmesser der Partikel wächst. Das kann damit erklärt werden, dass mit steigendem α -Tocopherolanteil die Dichte der Partikel abnimmt, da α -Tocopherol eine Dichte von $0,95 \text{ g/cm}^3$ (*Quelle: Sigma-Aldrich*) aufweist und PBCA eine höhere Dichte von $1,14 \text{ g/cm}^3$ [57] besitzt. Nur bei den durch Tween®80 stabilisierten Partikeln treten Schwankungen auf, so dass dieser Trend nicht zu beobachten ist. Die Partikel mit einem α -Tocopherolanteil von 40% weisen hier einen kleineren Durchmesser auf als die mit 20%.

In Abbildung 19 sind die mittleren Partikelgrößen der einzelnen Proben grafisch gegenübergestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass die mit SDS stabilisierten Partikel am kleinsten ausfallen und die Partikel mit Tween®80 am größten. Dieses Ergebnis kann auch aus Tabelle 4 entnommen werden und deckt sich mit den Resultaten aus dem vorigen Kapitel 5.1.1. Verglichen mit den Partikeln mit Hexadekan (VN001-VN003) als hydrophobe Komponente ergeben sich keine deutlichen Größenunterschiede.

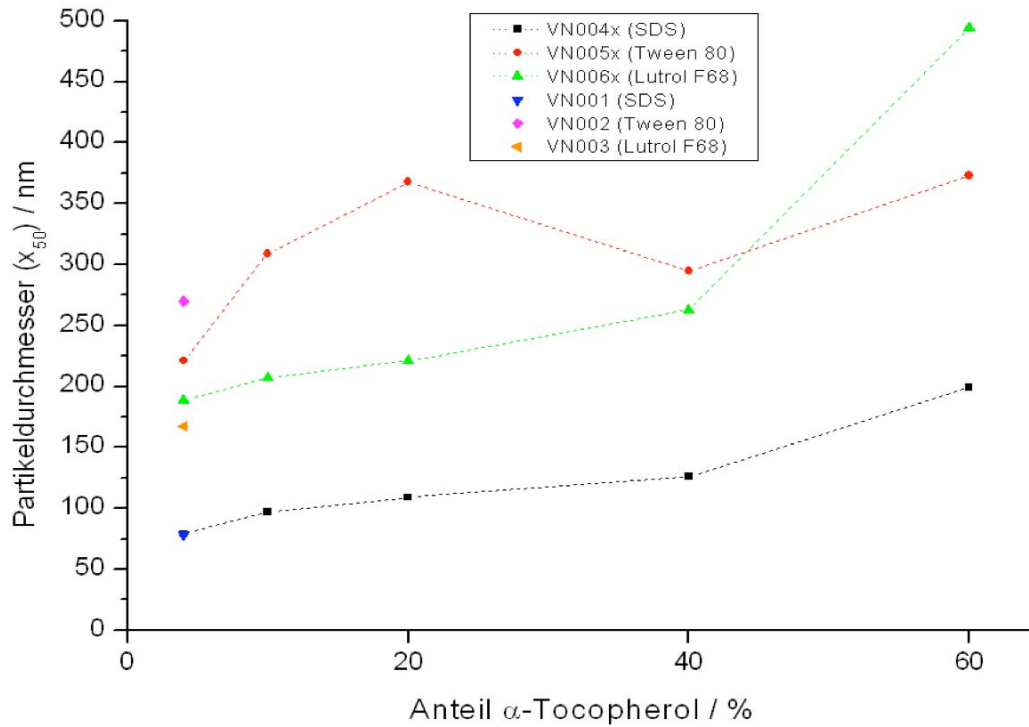


Abbildung 19: Vergleich der Partikeldurchmesser der Proben VN004x-VN006x.

In Abbildung 20–22 sind die Größenverteilungen der Partikel mit unterschiedlichem α -Tocopherolanteil grafisch dargestellt. Aus diesen Gaußkurven kann man die Halbwertsbreite ermitteln, die zur Quantifizierung der Größenverteilung der Partikel herangezogen werden kann. Die Halbwertsbreiten sind ebenfalls in Tabelle 6 zu finden.

Anhand der Werte kann man feststellen, dass die Breite der Größenverteilungen mit steigendem α -Tocopherolanteil der dispersen Phase größer wird. Diesen Trend kann man erklären, da mit steigendem α -Tocopherolanteil auch die Abbruchrate der Polymerisation steigt, da α -Tocopherol mit einem pK_a -Wert von 13,1 eine schwache Säure darstellt [58]. Ein weiterer Grund könnte der Verdünnungseffekt durch α -Tocopherol sein.

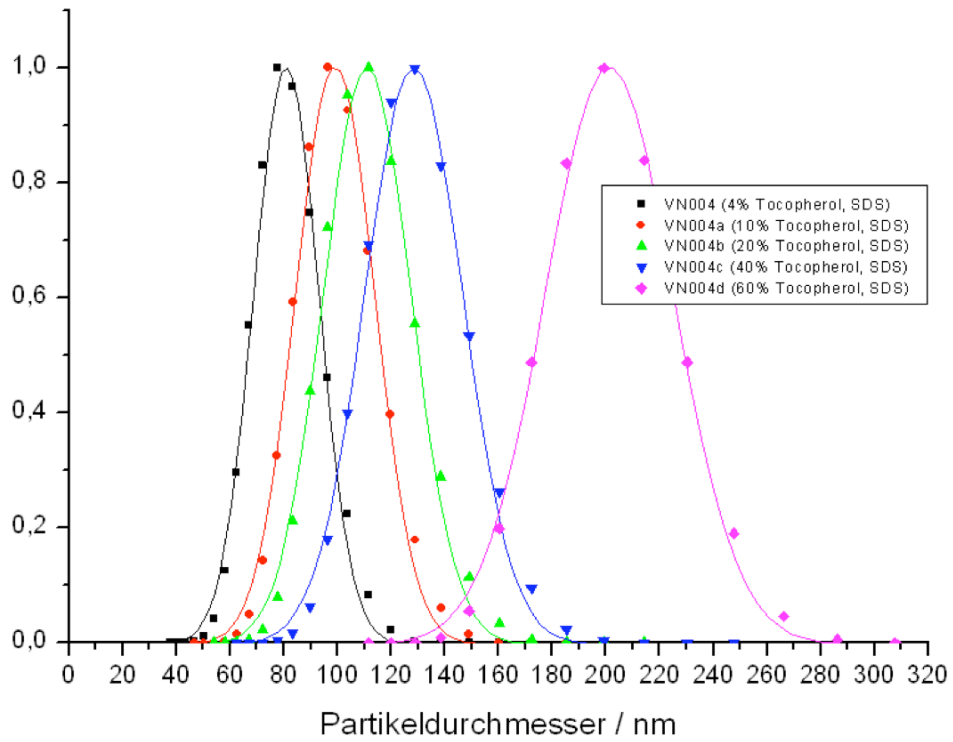


Abbildung 20: Größenverteilung der Partikel aus den Proben VN004-VN004d aus DLS-Messungen.

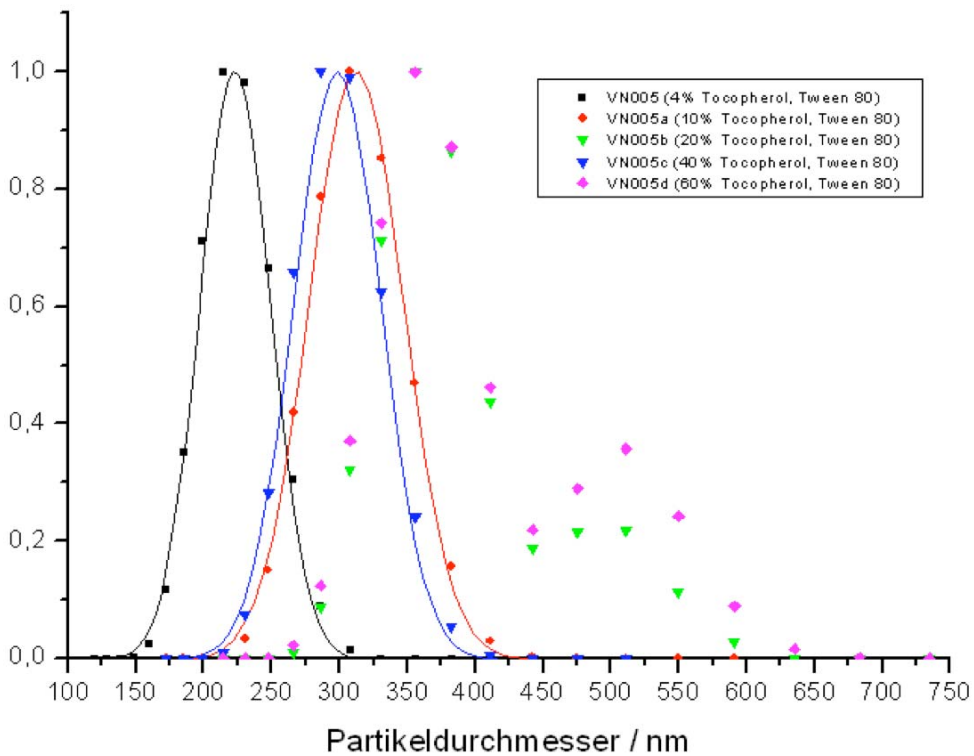


Abbildung 21: Größenverteilung der Partikel aus den Proben VN005-VN005d aus DLS-Messungen.

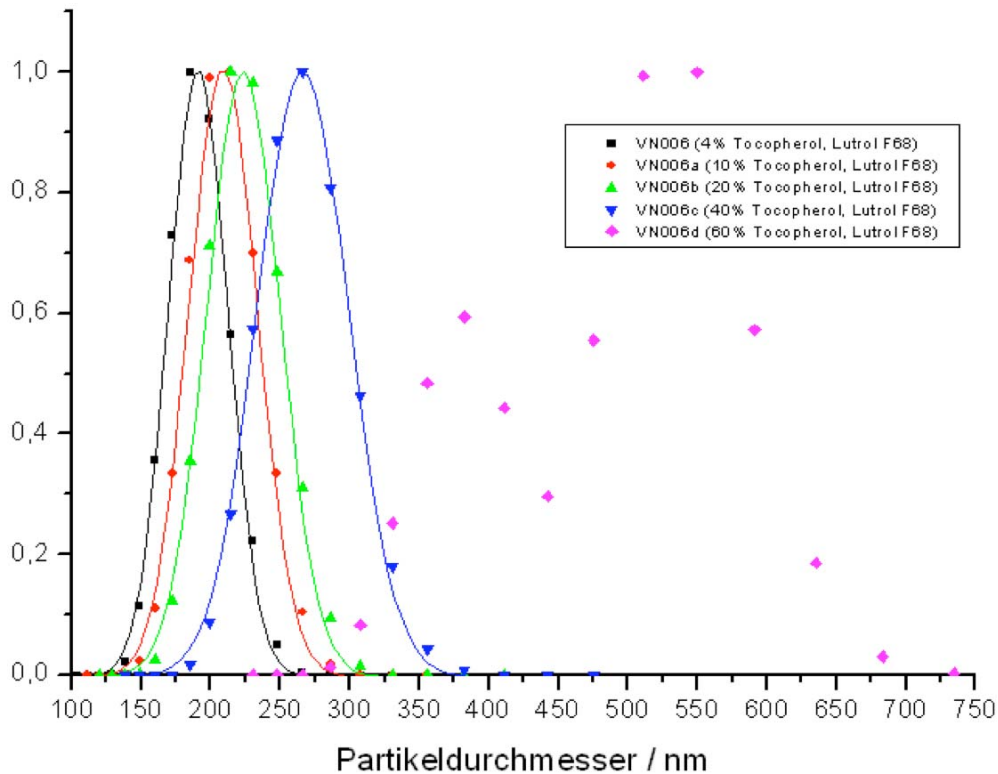


Abbildung 22: Größenverteilung der Partikel aus den Proben VN006-VN006d aus DLS-Messungen.

Vergleicht man die Breite der Größenverteilungen der Partikel in Abhängigkeit der verwendeten Tenside (Abbildung 23), so kann man erkennen, dass die mit SDS stabilisierten Partikel die engste, die mit Tween[®]80 stabilisierten Partikel die breiteste Größenverteilung aufweisen. Die genauen Werte sind Tabelle 4 zu entnehmen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten aus dem vorigen Kapitel 5.1.1 und wurde dort bereits diskutiert.

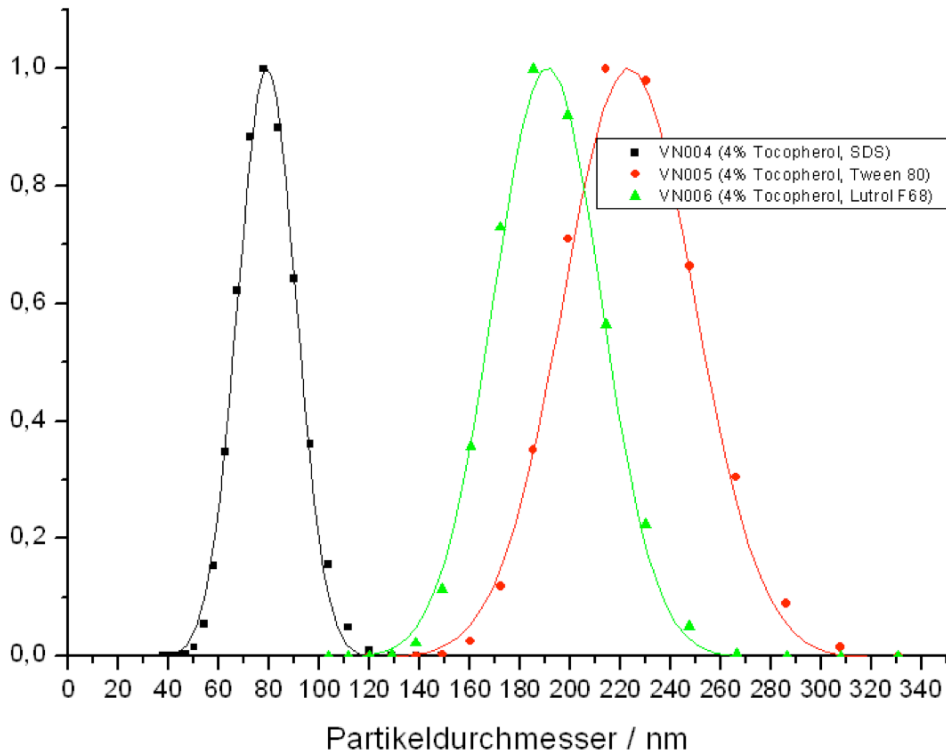


Abbildung 23: Vergleich der Größenverteilung der Partikel VN004-VN006.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Partikeln, bei denen SDS oder Lutrol®F68 verwendet wurden, Trends in der Partikelgröße und der Größenverteilung in Abhängigkeit vom α -Tocopherolanteil beobachtet werden konnten. Partikel, die mit Tween®80 stabilisiert wurden, zeigten diese Trends wiederum nicht auf. Für eine gezielte Steuerung dieser Partikeleigenschaften sind die Tenside SDS und Lutrol®F68 somit besser geeignet als Tween®80.

5.1.3. Abtrennen von freiem α -Tocopherol durch Zentrifugation

Nach der Herstellung der Dispersionen gilt es, die Freisetzung des α -Tocopherols aus den Partikeln zu untersuchen. Bevor das geschieht, muss allerdings festgestellt werden, ob das α -Tocopherol tatsächlich in die Partikel eingekapselt wurde oder noch frei, an der Partikeloberfläche oder mizellisiert vorliegt. Dieses α -Tocopherol würde eine spätere Untersuchung der Freisetzungskinetik des eingekapselten α -Tocopherols aus den Partikeln stören und muss daher entfernt werden. Hierzu wurde ausgenutzt, dass α -Tocopherol eine geringere Dichte (0,95 g/mol) als Wasser und die Partikeln (\leq

1,14 g/mol, da die Dichte zwischen 1,14 g/mol von PBCA und 0,95 g/mol von α -Tocopherol liegt) besitzt und daher mittels Zentrifugation abgetrennt werden kann. Die Dispersionen wurden einer zweistufigen Zentrifugation unterzogen. In der ersten Stufe wurde mit 2000 U/min für 20 min. zentrifugiert, um eventuell vorhandenes freies α -Tocopherol zu abzutrennen. In der zweiten Stufe wurde mit 10000 U/min zentrifugiert, womit auch das eventuell vorhandene mizellisierte α -Tocopherol abgetrennt werden sollte.

Zunächst wurden die Proben VN004b, VN005b und VN006b, d.h. mit einem α -Tocopherolanteil von 20%, der Zentrifugation unterzogen, wodurch jedoch zunächst keine Abtrennung von α -Tocopherol erreicht werden konnte. Durch seine geringere Dichte müsste es oben aufschwimmen und durch seine gelbe Farbe sichtbar werden. Nach der ersten Stufe wurde allerdings keine optische Veränderung der Dispersion festgestellt und somit war zunächst keine Abtrennung von α -Tocopherol aus der Dispersion möglich.

Nach der zweiten Stufe der Zentrifugation wurde ein Pellet erhalten, welches nur etwa 10 Gew.% des vorhandenen Feststoffs ausmachte. Der Rest befand sich im Überstand, was durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigt wurde. Dieser wurde abgetrennt und bei einer höheren Rotationsgeschwindigkeit von 15000 U/min für 3 h zentrifugiert, womit eine Abtrennung des restlichen PBCA erwirkt werden sollte. Hier wurde jedoch weder ein Pellet erhalten noch eine optische Veränderung der Dispersion durch aufschwimmendes α -Tocopherol festgestellt. Eine Abtrennung von α -Tocopherol durch Zentrifugation ist somit fehlgeschlagen.

Nach den Zentrifugationsvorgängen wurden Proben zur Vermessung in der DLS entnommen. Diese sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Partikelgrößen vor und nach der Zentrifugation.

Probenbezeichnung	Partikeldurchmesser (x_{50}) vor Zentrifugation / nm	Partikeldurchmesser (x_{50}) nach Zentrifugation (2000U/min) / nm	Partikeldurchmesser (x_{50}) nach Zentrifugation (10000 U/min) / nm
VN004b	109	99	56
VN005b	368	228	78
VN006b	221	191	132

Man kann anhand der Abnahme der durchschnittlichen Partikelgröße erkennen, dass größere Partikel durch die Zentrifugation abgetrennt wurden; im Überstand immer noch kleinere Partikel vorhanden.

Für die nicht stattgefundenen Abtrennung von α -Tocopherol gibt es verschiedene mögliche Erklärungen:

Eine Erklärung wäre eine vollständige Verkapselung, womit kein freies α -Tocopherol vorhanden wäre, welches abgetrennt werden kann.

Geht man hingegen davon aus, dass doch Spuren an freiem α -Tocopherol in der Dispersion vorhanden ist, so kann man die nicht gelungene Abtrennung mit dem geringen Dichteunterschied zwischen α -Tocopherol, Wasser und den Hybridpartikeln begründen, der keine Auftrennung erlaubt.

Für das weitere Vorgehen wurde angenommen, dass eine vollständige Verkapselung von α -Tocopherol stattgefunden hat und somit die Voraussetzung für eine Charakterisierung der Freisetzungskinetik des α -Tocopherols aus den Partikeln gegeben ist. Um einen Fehler durch doch eventuell vorhandenes freies α -Tocopherol in der späteren Untersuchung der Freisetzungskinetik auszuschließen, soll der erste gemessene Wert als Nullpunkt in der Freisetzungskurve festgelegt werden.

5.2. Bestimmung der Freisetzungskinetik

Um letztlich einen effektiven Einsatz des α -Tocopherol als Wirkstoff im Körper zu gewährleisten, ist es essentiell, seine Freisetzungsgeschwindigkeit aus den Partikeln zu untersuchen. Wie in Kapitel 2.3 bereits beschrieben, sind hier zwei verschiedene Freisetzungsmechanismen denkbar: Erstens die Freisetzung durch den biologischen Abbau des PBCA durch Enzyme, und zweitens die Freisetzung mittels Diffusion, wobei das α -Tocopherol aus dem Partikel heraus in ein umgebendes Lösungsmittel diffundieren soll. Diese Arbeit beschränkt sich auf den Freisetzungsmechanismus der Diffusion.

5.2.1. Freisetzung in n-Hexan

Die Freisetzung von α -Tocopherol über Diffusion wird im redispergierten Zustand der getrockneten Partikel in n-Hexan untersucht. n-Hexan wurde als Lösungsmittel ausgesucht, da PBCA darin weder gelöst wird noch aufquillt. Außerdem stellt es ein sehr gutes Lösungsmittel für α -Tocopherol dar. Eine Freisetzung durch Diffusion scheint damit gewährleistet zu sein.

5.2.1.1. Gravimetrische Charakterisierung der Freisetzungskinetik

Zur Untersuchung der Freisetzungskinetik wurde eine definierte Menge Feststoff zu einer definierten Menge n-Hexan gegeben und durchgehend gerührt. Gleich nach der Zugabe wurde ein Aliquot entnommen, dessen α -Tocopherolanteil später in der Freisetzungskurve den Nullpunkt darstellen soll. Danach wurde stündlich ein weiteres Aliquot entnommen und das n-Hexan entfernt, um das darin enthaltene α -Tocopherol gravimetrisch zu quantifizieren.

Es wurde erneut mit den Proben VN004b, VN005b und VN006b, und daher mit einem jeweiligen α -Tocopherolanteil von 20%, gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Auswertung der Freisetzungskinetik der Proben VN004b, VN005b, VN006b.

t/h	freigesetztes α -Tocopherol aus VN004b / %	freigesetztes α -Tocopherol aus VN005b / %	freigesetztes α -Tocopherol aus VN006b / %
0	86	87	86
1	109	99	85
2	101	94	84
3	105	98	79
4	74	90	79
5	101	92	78
6	90	89	76
7	82	92	92
8	79	77	91
9	94	76	68
10	89	85	86
11	77	103	64
12	92	85	84
13	90	99	78
20	7,8	87	91
30	100	94	72

Aus den Werten der Tabelle 8 kann man erkennen, dass bei den Proben mit SDS (VN004b) und Tween[®]80 (VN005b) etwa 90%, bei der Probe mit Lutrol[®]F68 (VN006b) etwa 80% des α -Tocopherols mit einem Mal freigesetzt worden ist. Die restlichen 10% bzw. 20% wurden nicht freigesetzt, was bedeutet, dass diese Menge dem n-Hexan nicht zugänglich war. Es wird vermutet, dass sich das nicht freigesetzte α -Tocopherol so tief im Partikel befindet, dass es nicht herausgelöst werden kann.

Ansonsten ist keine zeitliche Mengenzunahme festzustellen. Die aus den Aliquoten gewonnenen α -Tocopherolmengen bleiben weitestgehend konstant. Eine langsame Freisetzung des α -Tocopherols hat folglich nicht stattgefunden und war bereits abgeschlossen, bevor die erste Probe entnommen wurde.

Für diese sofortige Freisetzung kann es mehrere Erklärungen geben: n-Hexan könnte als Lösungsmittel ungeeignet sein, da es das α -Tocopherol zu schnell aus den Partikeln herauslösen könnte. Daher wird in 5.2.2 versucht, n-Hexan durch ein anderes Lösungsmittel zu ersetzen.

Eine weitere Erklärung wäre eine schlechte oder unvollständige Verkapselung des α -Tocopherol, wobei das α -Tocopherol sich z.B. ungeschützt an der Oberfläche der Partikeln befindet und dort schnell vom n-Hexan abgelöst wird.

Nimmt man an, dass die Partikel eine Kern-Schale-Morphologie besitzen, könnte die schnelle Freisetzung auch durch eine Beschädigung der Polymerhülle durch den Gefriertrocknungsprozess zustande kommen.

Diese Punkte werden durch eine in 5.3 entwickelte Methode näher untersucht.

5.2.1.2. Charakterisierung der Freisetzungskinetik mittels UV-Vis-Spektroskopie

Die Ergebnisse aus der Charakterisierung der Freisetzungskinetik sollen nun durch UV-Vis-Spektroskopie bestätigt werden. Dazu wurden dieselben Proben vermessen. Diese Art der Quantifizierung ist genauer, da die Methode empfindlicher ist und ausschließlich α -Tocopherol detektiert wird. Ein UV-Vis-Spektrum von α -Tocopherol in n-Hexan ist in Abbildung 24 zu sehen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 289 nm. Bei dieser Wellenlänge wurde eine Kalibrationsgerade aufgenommen, die in Abbildung 25 dargestellt ist. Die Geradengleichung dazu lautet:

$$y = 0,126 x - 0,007 \quad (6)$$

Damit lässt sich die Höhe des α -Tocopherolpeaks (x) in die α -Tocopherolkonzentration im n-Hexan (y) umrechnen.

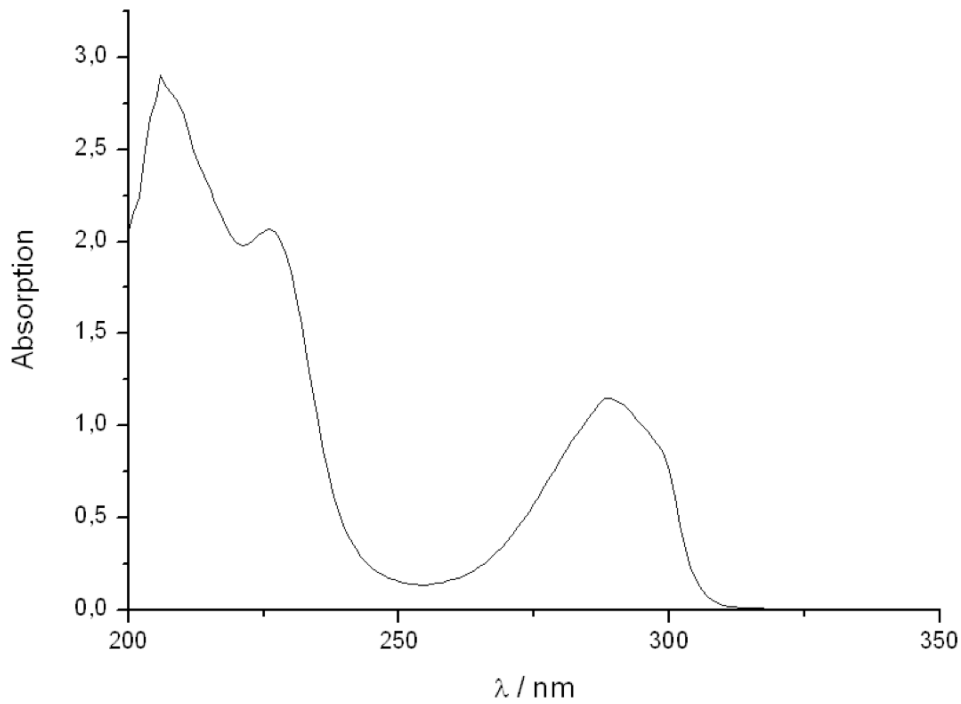


Abbildung 24: Absorptionsspektrum von α -Tocopherol in n-Hexan.

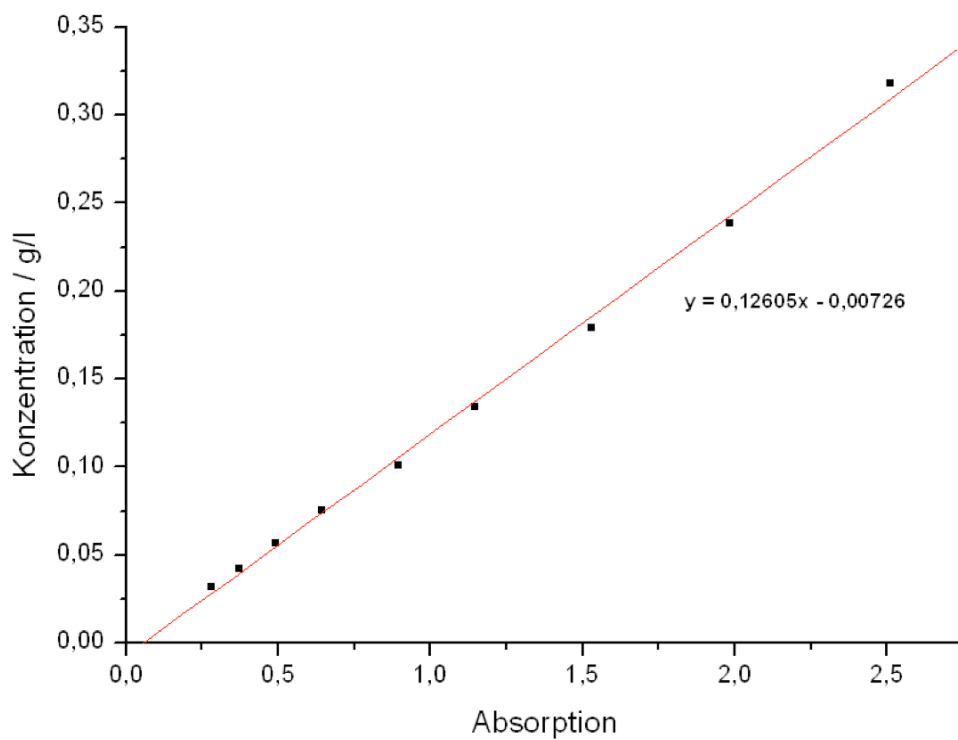


Abbildung 25: Kalibrationsgerade von α -Tocopherol in n-Hexan gemessen bei $\lambda=289$ (Absorptionsmaximum von α -Tocopherol).

Für den Versuch wurde eine bestimmte Menge Feststoff aus VN004b in einem definierten Volumen n-Hexan redispergiert und stündlich Proben zur Analyse im UV-

Vis-Spektrometer entnommen. In Abbildung 26 sind die UV-Vis-Spektren der nach 0, 2 und 20 h entnommenen Proben dargestellt. Die Messergebnisse weisen identische Spektren auf, was darauf hindeutet, dass auch hier die Freisetzung bereits vor der ersten Probenentnahme abgeschlossen war.

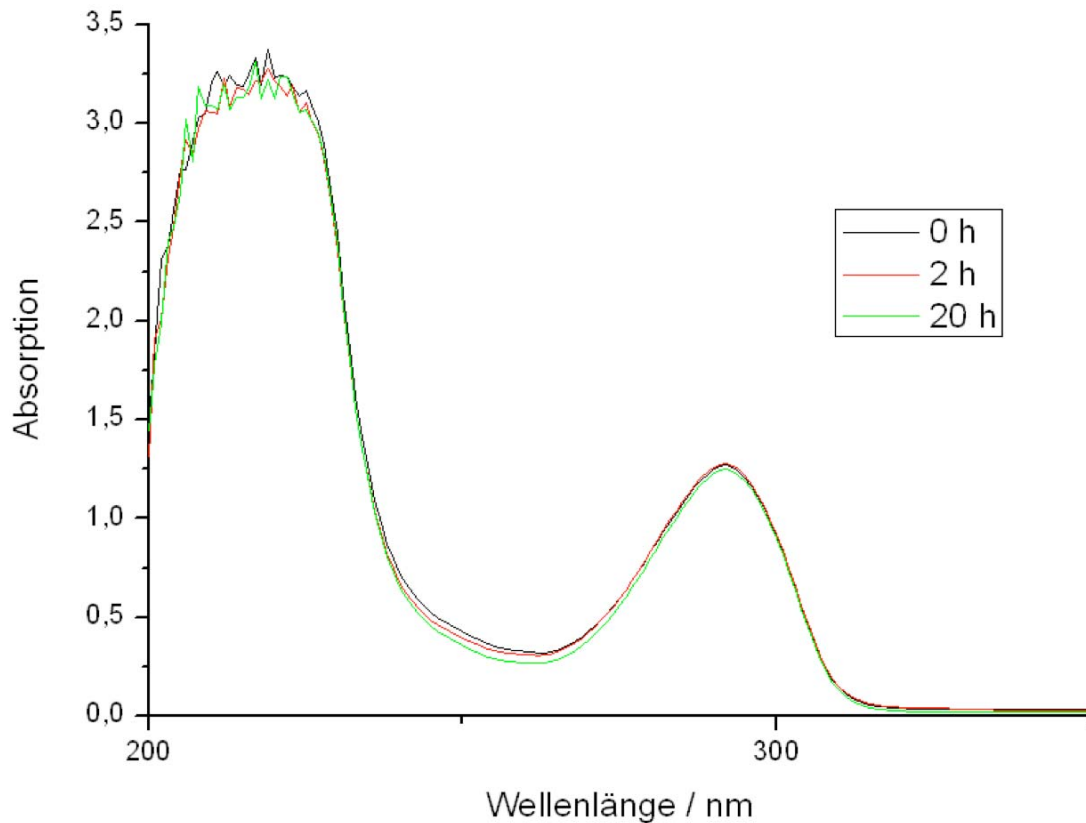


Abbildung 26: UV-Vis-Spektren zur Freisetzungskinetik von VN004b in n-Hexan.

Aus der Höhe des Absorptionsmaximums kann man berechnen, dass die extrahierbare α -Tocopherolmenge etwa 75% des eingesetzten α -Tocopherols entspricht.

Die Ergebnisse aus der gravimetrischen Charakterisierung liegen mit 80-90% etwas höher, was damit erklärt werden könnte, dass eventuell Oligomere mit durch den Spritzenfilter gelangt sind und mitgewogen wurden, während mit der UV-Vis-Spektroskopie ausschließlich α -Tocopherol detektiert wurde.

5.2.2. Freisetzung in anderen organischen Lösungsmitteln

Da die sofortige Freisetzung von α -Tocopherol aus den Partikeln auf eine zu hohe Löslichkeit in n-Hexan zurückgeführt werden könnte, wurden nun weitere Lösungsmittel verwendet, um eine langsamere Freisetzung zu erzielen. Die Verwendung von Lösungsmittelgemischen höherer Polarität anstelle von n-Hexan soll die Löslichkeit von α -Tocopherol herabsetzen.

Somit wurde die Freisetzung in verschiedenen Lösungsmittelgemischen aus n-Hexan/Ethanol und n-Hexan/Isopropanol untersucht. Jedoch erbrachte diese Methode ebenfalls identische UV-Vis-Spektren, wie bereits bei der Freisetzung in reinem n-Hexan festgestellt wurde. Die Freisetzung von α -Tocopherol erfolgte erneut so schnell, dass keine Aufnahme einer Freisetzungskurve möglich war.

Das Erreichen einer langsameren Freisetzung durch die Erhöhung der Polarität durch Zugabe von Alkoholen war demnach nicht erfolgreich. Allerdings wurde auch festgestellt, dass der Einsatz von sowohl Ethanol als auch Isopropanol zu einem Aufquellen der Partikel von 109 nm auf ca. 160 nm führte, was wiederum eine schnellere Freisetzung des α -Tocopherols bewirken könnte.

Es kann damit noch nicht eindeutig belegt werden, ob die hohe Löslichkeit von α -Tocopherol in n-Hexan für die sofortige Freisetzung verantwortlich ist, da noch kein Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gefunden werden konnte, welches polarer ist als n-Hexan und dabei keine Auflösung oder kein Aufquellen von PBCA verursacht.

5.3. Extraktion der Dispersionen mit n-Hexan

Die bisherigen Ergebnisse einer zu schnellen Freisetzung legen den Verdacht nahe, dass keine vollständige Verkapselung des α -Tocopherols stattgefunden hat. Um dies zu überprüfen, wird versucht, den Grad der Verkapselung zu ermitteln. Dazu wurde eine Methode entwickelt, bei der die Dispersion mit n-Hexan ausgeschüttelt und die organische Phase im UV-Vis-Spektrometer auf α -Tocopherol untersucht wird. PBCA wird in n-Hexan weder gelöst noch aufgequollen, womit eingekapseltes α -Tocopherol unzugänglich bleibt und nur zugängliches α -Tocopherol extrahiert werden kann. Für

den Fall einer vollständigen Verkapselung kann somit auch kein α -Tocopherol detektiert werden. Wird α -Tocopherol in der n-Hexan-Phase nachgewiesen, kann dieses quantifiziert und daraus der Grad der Verkapselung berechnet werden.

Da mit der Dispersion statt mit den gefriergetrockneten Partikeln gearbeitet wurde, kann eine eventuelle Beschädigung oder Veränderung der Partikel durch den Gefriertrocknungsprozess ausgeschlossen werden. Es wurde mit den Dispersionen VN004-VN004c gearbeitet, da SDS in n-Hexan nicht löslich ist, was eine weitere Stabilisierung der Dispersion während der Extraktion gewährleistet.

Zur Extraktion wurde eine definierte Menge der Dispersion mit einem definierten Volumen n-Hexan ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde das n-Hexan möglichst vollständig entfernt, wobei ein Teil davon im UV-Vis-Spektrometer analysiert wurde. Das restliche n-Hexan wurde mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie auf PBCA untersucht, womit ausgeschlossen werden konnte, dass doch Spuren an in n-Hexan gelöstem PBCA vorhanden waren. Dieser Vorgang wurde nach Hinzufügen des gleichen Volumens frischen n-Hexans wiederholt, bis im UV-Vis-Spektrum kein α -Tocopherol mehr detektiert werden konnte.

Abbildung 27 zeigt die UV-Vis-Spektren der n-Hexan-Phasen an einem Beispiel aus der Extraktion der Probe VN004a. Es ist zu erkennen, dass nach jeder Extraktion weniger α -Tocopherol extrahiert wird.

Aus diesen UV-Vis-Spektren wurde zum einen mit Hilfe von Gleichung 6 die absolute α -Tocopherolkonzentration der n-Hexanphasen und zum anderen der prozentuale Anteil des extrahierten α -Tocopherols bezüglich der Gesamtmenge an eingesetztem α -Tocopherol gegen die Anzahl der Extraktionen in Abbildung 28 aufgetragen.

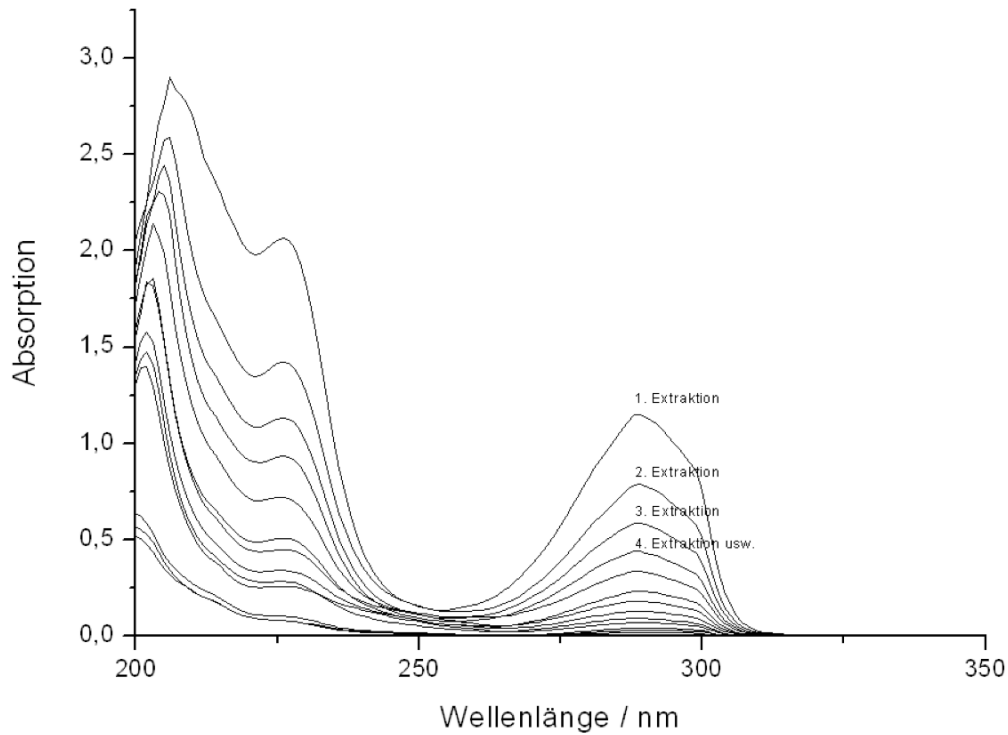


Abbildung 27: Absorptionsspektren von α -Tocopherol aus den Extraktion von VN004a.

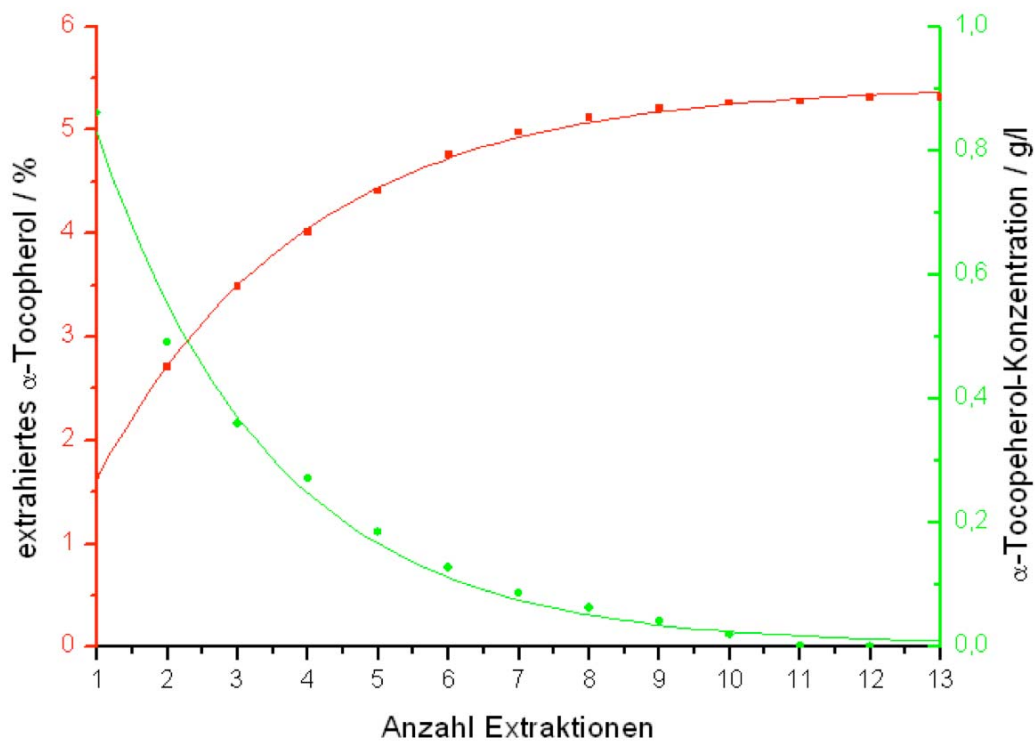


Abbildung 28: Auftragung des extrahierten α -Tocopherols und der α -Tocopherolkonzentration gegen die Anzahl der Extraktionen.

Im Folgenden werden die Extraktionen anhand aller hergestellten Dispersionen genau beschrieben und diskutiert.

Zunächst wurden bei jeder Extraktion stets 4 g Dispersion und 5 ml n-Hexan verwendet.

In Abbildung 29 sind zunächst die Abnahmen der absoluten α -Tocopherolkonzentrationen über alle durchgeführten Extraktionen gegenübergestellt. Man kann erkennen, dass es sich dabei stets um einen exponentiellen Abfall handelt. Bemerkenswert ist dabei, dass sich die Kurven von VN004, VN004a und VN004b nicht unterscheiden, woraus man schließen kann, dass hier unabhängig von der α -Tocopherolkonzentration immer dieselbe absolute Menge an α -Tocopherol extrahiert wurde.

Die Kurve von VN004c unterscheidet sich deutlich von den anderen Kurven. Sie fällt anfangs weitaus schneller ab und sinkt danach ab ungefähr 0,2 g/l nicht weiter. Das bedeutet, dass aus dieser Dispersion immer eine kleine Menge α -Tocopherol für n-Hexan zugänglich ist und extrahiert werden kann. Eine nicht vollständige Verkapselung des α -Tocopherols könnte der Grund hierfür sein, während bei den Partikeln mit einem α -Tocopherolanteil von 4%, 10%, und 20% zumindest das nicht extrahierte α -Tocopherol sich im Partikel zu befinden scheint und daher dem n-Hexan nicht zugänglich ist.

In Abbildung 30 ist der prozentuale Anteil des extrahierten α -Tocopherols gegen die Anzahl der Extraktionen aufgetragen. Man kann erkennen, dass bei einer höheren α -Tocopherolkonzentration der Anteil des extrahierbaren α -Tocopherols kleiner ausfällt.

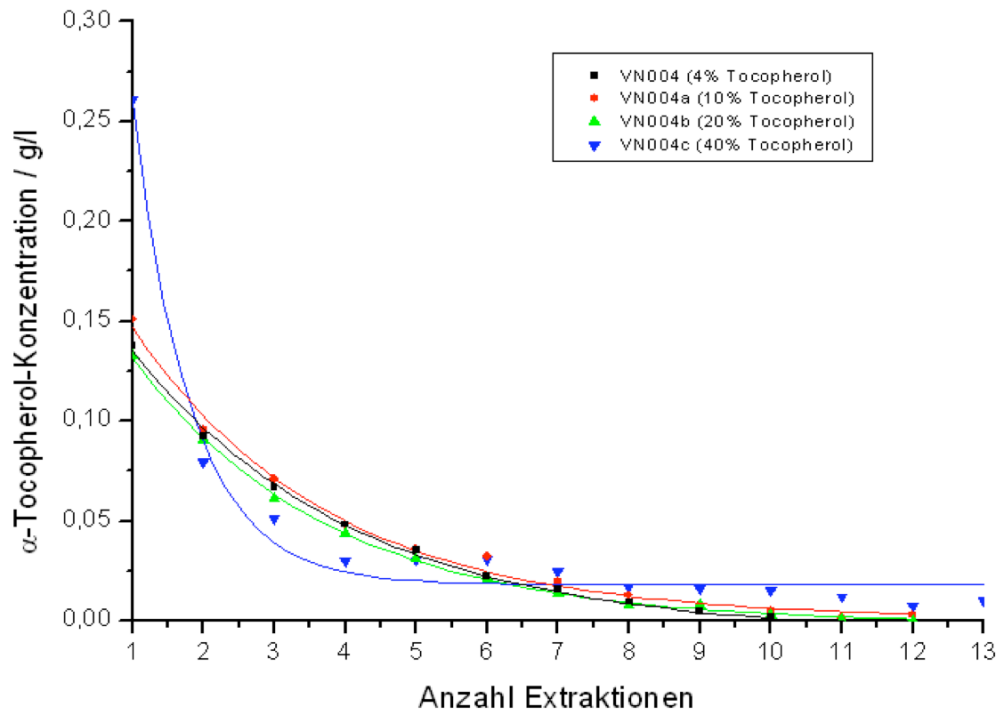


Abbildung 29: Vergleich der Proben VN004-VN004c bezüglich der Abnahme der absoluten α -Tocopherol-Konzentrationen in den n-Hexan-Phasen.

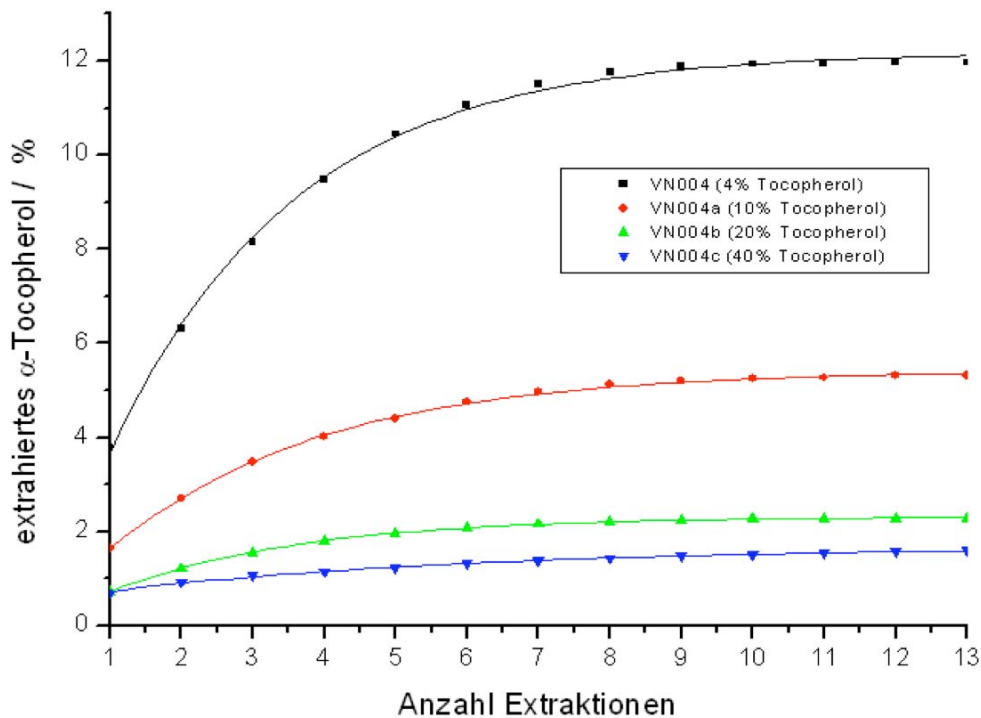


Abbildung 30: Vergleich der Proben VN004-VN004c bezüglich der extrahierten Menge an α -Tocopherol.

Es wurde berechnet, wie viel α -Tocopherol insgesamt durch alle Extraktionsvorgänge aus der Dispersion entfernt wurde. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 9

zusammengefasst und zeigen nochmals, dass unabhängig vom α -Tocopherolanteil der Dispersionen immer ungefähr dieselbe absolute α -Tocopherolmenge (ca. 2 mg) extrahiert wurde. Für die Probe VN004c wurden nach jeder Extraktion erneut α -Tocopherolspuren detektiert, womit das Ausrechnen eines absoluten Wertes nicht möglich ist.

Da die absoluten Werte konstant sind, sinkt der prozentuale Anteil an extrahierbarem α -Tocopherol bei steigendem α -Tocopherolanteil der Dispersionen von 12,1% bei einem α -Tocopherolanteil von 4% auf 2,3% bei einem α -Tocopherolanteil von 20%. Geht man von der oben erwähnten Hypothese aus, nämlich dass durch die Extraktion der Dispersionen nur nicht verkapseltes α -Tocopherol extrahiert wird und der Rest unzugänglich in den Partikeln vorliegt, kann man daraus den Verkapselungsgrad ermitteln. Dieser liegt bei den Dispersionen mit 4% α -Tocopherolanteil bei 87,9%, bei Dispersionen mit 10% bei 94,5% und bei Dispersionen mit 20% bei 97,7%, d.h. je größer der α -Tocopherolanteil der Dispersionen, desto höher fällt auch der Verkapselungsgrad aus. Bei einem α -Tocopherolanteil von 40% kann stets weiteres α -Tocopherol extrahiert werden. Da diese Mengen sehr gering sind (α -Tocopherolkonzentration in der n-Hexanphase $< 0,025$ g/l), kann trotzdem von einer Verkapselung von über 90% ausgegangen werden.

Tabelle 9: Ergebnisse aus der Extraktion von VN004-004c mit n-Hexan.

Probenbezeichnung	m (α -Tocopherol) / 4g Dispersion / mg	m (α -Tocopherol, extrahiert) / mg	% (α -Tocopherol, extrahiert)	m (α -Tocopherol, Rest) / mg	% (α -Tocopherol, Rest)
VN004	18,2	2,2	12,1	16,0	87,9
VN004a	45,6	2,5	5,5	43,1	94,5
VN004b	91,2	2,1	2,3	89,1	97,7
VN004c	182,3	--	--	--	--

Um die konstanten Werte der extrahierten absoluten α -Tocopherolmengen zu bestätigen, wurde das Verhältnis der Dispersionen VN004-004c zum n-Hexan verändert und erneut extrahiert. Statt 5 ml n-Hexan wurden nun 2,5 ml und 10 ml zur Extraktion von jeweils 4 g Dispersion (VN004a) verwendet.

Je mehr n-Hexan eingesetzt wird, desto niedriger fällt die α -Tocopherolkonzentration aus. Man braucht z.B. beim Einsatz von 2,5 ml n-Hexan pro Extraktion mehr

Durchgänge als bei 5 ml oder 10 ml bis im UV-Vis-Spektrometer kein α -Tocopherol mehr detektiert wird.

Am Ende konnte unabhängig von der Menge an n-Hexan insgesamt gleich viel α -Tocopherol aus jeweils 4 g Dispersion extrahiert werden, was in Tabelle 10 deutlich wird. Setzt man 8 g Dispersion ein, wird auch die doppelte Menge α -Tocopherol durch Extraktion gewonnen.

Damit können die konstanten extrahierten absoluten α -Tocopherolmengen bestätigt werden.

Tabelle 10: Ergebnisse aus der Extraktion von VN004a mit unterschiedlichen Verhältnissen der zwei Phasen.

Probenbezeichnung	m (Dispersion) / g	V (n-Hexan) / ml	m (α -Tocopherol, extrahiert) / mg
VN004a	4,0	2,5	2,4
VN004a	4,0	5,0	2,5
VN004a	4,0	10,0	2,4
VN004a	8,0	5,0	5,0

Nun gilt es noch festzustellen, wo sich das extrahierbare α -Tocopherol vorher in der Dispersion befunden hat. Sollte es frei oder auf der Partikeloberfläche vorliegen, müsste man bei einem größeren α -Tocopherolanteil der Dispersionen auch eine größere absolute Menge extrahieren können.

Eine mögliche Erklärung ist, dass doch Spuren von α -Tocopherol in Wasser löslich sind. Da stets dieselben Mengen an Dispersion ausgeschüttelt wurden, könnten die konstanten Mengen an extrahiertem α -Tocopherol aus der Sättigungskonzentration resultieren. Jedoch wurde festgestellt, dass die Löslichkeit von α -Tocopherol in Wasser so gering ist, dass eine Detektierung mittels UV-Vis-Spektroskopie nicht möglich ist.

Das extrahierte α -Tocopherol befindet sich somit wahrscheinlich innerhalb des Partikels. Mit Hilfe von Abbildung 31 sollen die Gründe dieser Annahme im Folgenden erklärt werden.

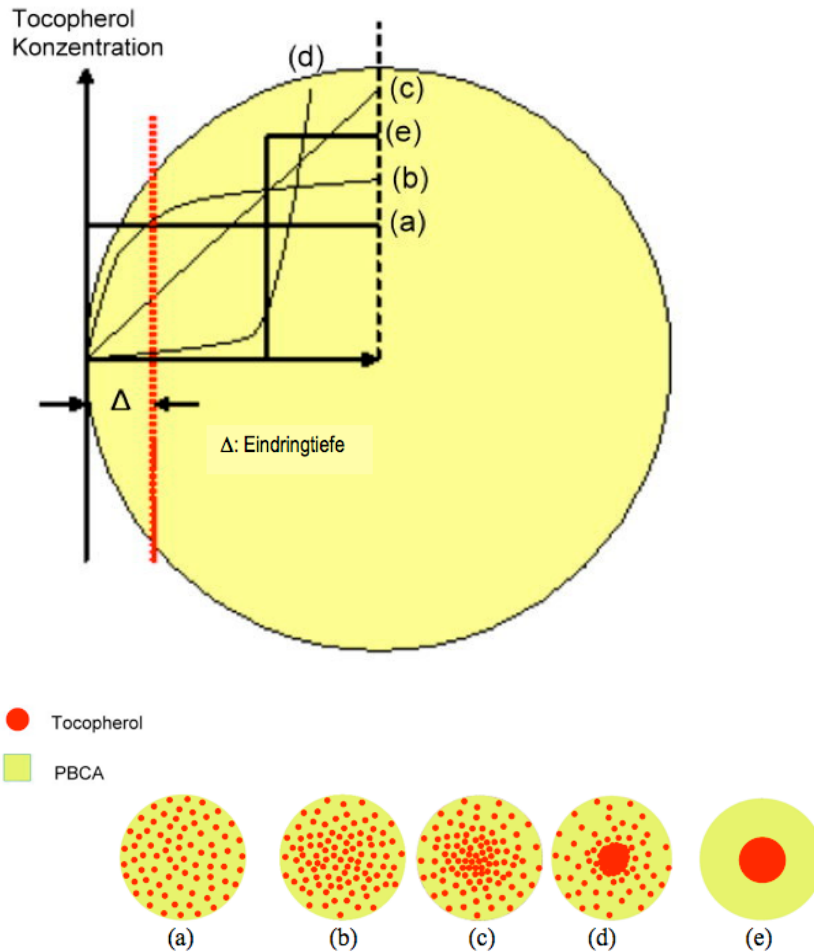


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Verteilung der α -Tocopherolkonzentration im Partikel.

α -Tocopherol ist zunächst im BCA löslich, wobei angenommen werden kann, dass bei wachsender Kettenlänge die Löslichkeit sinkt und es während der Polymerisation zu einer schrittweisen Entmischung zwischen BCA, dem PBCA und dem α -Tocopherol in Richtung der Gleichgewichtsmorphologie kommt.

Wie diese Entmischung genau verläuft, wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt. Hierzu hätte die Löslichkeit von α -Tocopherol in PBCA untersucht werden müssen. Somit ist keine exakte Aussage über die α -Tocopherolverteilung in den Partikeln möglich. Allerdings kann vermutet werden, dass bei einer Entmischung sich das α -Tocopherols aufgrund seiner Hydrophobizität tendenziell von der Wasserphase weg in das Innere des Partikels bewegt.

In Abbildung 31 sind verschiedene Modelle der Konzentrationsverteilungen von α -Tocopherol für eine solche Entmischung dargestellt. Dabei stellen die Kurven (a) und (e) die beiden Grenzfälle einer optimalen Mischbarkeit bzw. einer vollständigen Entmischung von PBCA und α -Tocopherol dar. Im Grenzfall (a) liegt eine

gleichmäßige Verteilung des α -Tocopherols, d.h. keine Entmischung vor, sodass die Konzentration unabhängig von der Eindringtiefe ist. Der gegenteilige Grenzfall (e) beschreibt eine komplette Entmischung und einen entsprechend sprunghaften Anstieg auf eine konstante α -Tocopherolkonzentration ab einer gewissen Eindringtiefe. Die Kurven (b) bis (d) liegen zwischen den beschriebenen Grenzfällen, wobei der Grad der Entmischung von (b) nach (d) zunimmt.

Nimmt man an, dass das n-Hexan bei der Extraktion bis auf eine geringe Eindringtiefe Δ in den Partikel eindringen kann, so würde bei den Kurvenverläufen nach (a), (b), (c) die erreichte und damit extrahierbare α -Tocopherolmenge stark vom α -Tocopherolanteil der Partikel abhängen. Das würde dem Ergebnis einer Extraktion der gleichen absoluten α -Tocopherolmengen unabhängig vom α -Tocopherolanteil widersprechen. Daher sind diese Modelle eher unwahrscheinlich.

Bei der Kurve (e) würde bei der geringen Eindringtiefe Δ des n-Hexans gar kein α -Tocopherol erreicht werden. Auch mit diesem Modell lassen sich die Ergebnisse nicht stützen.

Kurve (d) verdeutlicht den Fall eines Anstiegs der α -Tocopherolkonzentration von außen nach innen, was bedeuten würde, dass sich das meiste α -Tocopherol nach der Entmischung in der Mitte des Partikels vorliegt. Der exponentielle Kurvenverlauf stützt bei einer geringen Eindringtiefe Δ von n-Hexan die Messergebnisse, nämlich dass bei dieser Verteilung der α -Tocopherolkonzentration stets etwa dieselbe absolute Menge an α -Tocopherol unabhängig vom α -Tocopherolanteil der Partikel extrahiert wurde. Das α -Tocopherol, welches weiter im Partikel liegt als die Eindringtiefe, wird nicht vom n-Hexan erreicht.

In Abbildung 32 sei dieser Fall (d) genauer betrachtet. Dabei stellt (d₁) ein Partikel mit geringem, (d₂) ein Partikel mit hohem α -Tocopherolgehalt dar. Aus den vorigen Untersuchungen der Partikelgrößen geht hervor, dass Partikel (d₂) größer ist als Partikel (d₁). Die Partikel werden im Folgenden im Bezug auf die Extraktion mit n-Hexan miteinander verglichen.

Geht man von einer konstanten Eindringtiefe Δ bei allen Partikeln aus, erreicht das n-Hexan bei den größeren Partikeln mit den höheren α -Tocopherolgehalten auch ein insgesamt größeres Volumen des Partikels, womit pro Partikel eine größere Menge α -Tocopherol extrahiert werden kann. Wiederum gibt es in Relation gesehen mehr

kleine als große Partikel, womit ein gegenläufiger Trend existiert. Wie das durch n-Hexan zugängliche Volumen bei konstanter Eindringtiefe Δ pro Partikel und die Partikelanzahl zueinander stehen, wurde ausgerechnet und ist in Tabelle 11 gezeigt. Daraus kann man erkennen, dass sich die Werte der Volumina und die Partikelanzahl gegenseitig aufheben: Bei Partikeln mit z.B 40% α -Tocopherolgehalt erreicht das n-Hexan pro Partikel etwa ein vierfach größeres Volumen als es bei Partikeln mit 4% α -Tocopherolgehalt. Wiederrum gibt es auch ca. viermal so viele Partikel mit 4% α -Tocopherolgehalt als Partikel mit 40% α -Tocopherolgehalt. Das Gesamtvolumen, welches für n-Hexan zugänglich ist, ist somit in etwa konstant.

Tabelle 11: Vergleich des durch n-Hexan zugänglichen Volumens und der Partikelanzahl.

α -Tocopherol / %	Durchmesser / nm	Dichte / g/ml	V (für n-Hexan zugänglich bei gleicher Eindringtiefe Δ pro Partikel) genormt	Partikelanzahl der Dispersion genormt
4	79	1,13	1,00	3,81
10	97	1,12	1,84	2,08
20	109	1,10	2,57	1,49
40	126	1,06	3,85	1,00

Daher wird angenommen, dass sowohl bei den größeren Partikeln als auch bei den kleineren Partikeln ihre α -Tocopherolkonzentrationen bis zur Eindringtiefe Δ gleich sind, wie durch die Kurvenverläufe bei (d_1) und (d_2) veranschaulicht wird.

Daraus resultiert eine letztendlich ähnliche extrahierbare α -Tocopherolmenge.

Unter der Annahme solcher Kurvenverläufe lassen sich nun die Ergebnisse stützen, welche unabhängig vom α -Tocopherolgehalt eine konstante Menge an extrahiertem α -Tocopherol aufweisen.

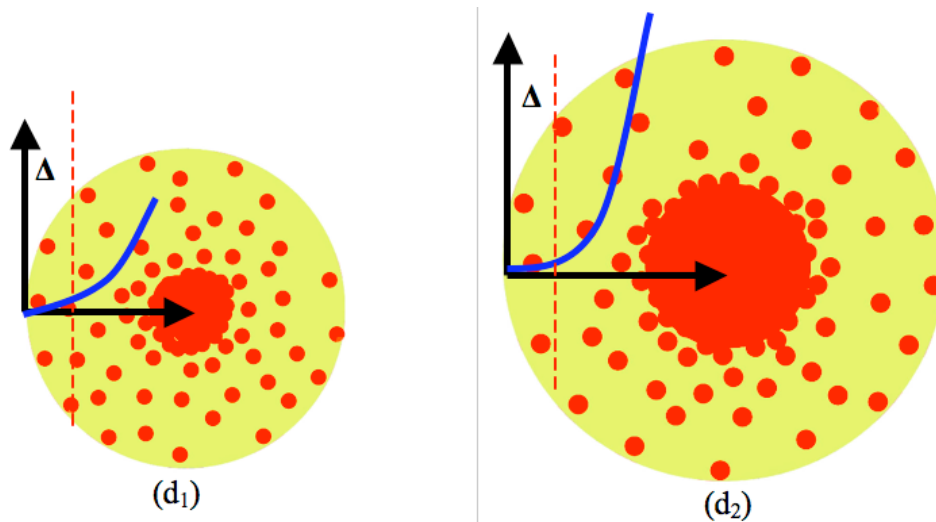


Abbildung 32: Schematische Darstellung zweier Partikel mit unterschiedlichem α -Tocopherolanteil und ihrer Verteilung der α -Tocopherolkonzentration.

Mit diesem Modell lässt sich auch erklären, warum bei dem Versuch der Freisetzung des α -Tocopherols aus den gefriergetrockneten Partikeln viel größere α -Tocopherolmengen erhalten wurden. Da die Partikel vollständig von n-Hexan umgeben sind, könnte die Eindringtiefe auch größer sein, womit mehr α -Tocopherol ins n-Hexan gelangen kann. Eine andere Erklärung wäre eine Zerstörung der Partikel durch den Gefriertrocknungsprozess.

5.4. Herstellung von PECA-Partikeln

Neben den Dispersionen mit PBCA-Partikeln wurden noch Dispersionen mit Partikel aus Poly-(ethylcyanacrylat) (PECA) mit der Miniemulsionstechnik synthetisiert. Ziel war der Beginn einer Datensammlung über Nanopartikel aus Poly-(alkylcyanacrylaten). Der Herstellungsvorgang war dabei identisch mit der von PBCA-Dispersionen. Als Hydrophob wurde Hexadekan verwendet.

Tabelle 12 zeigt, dass die PECA-Partikel größer sind und eine breitere Größenverteilung besitzen als die PBCA-Partikel. Die Größenverteilung sind erneut durch die Halbwertsbreite der Gaußkurven in Abbildung 33 ermittelt worden. Weitere Analysen konnten nicht durchgeführt werden, da bereits nach wenigen Stunden eine Entmischung der Phasen erfolgte.

Es stellte sich heraus, dass ECA leichter polymerisiert als BCA, so dass eine Verkapselung von α -Tocopherol nicht möglich war, da das ECA bereits vor der Homogenisierung im Ultraschall polymerisierte. ECA polymerisiert somit leichter als BCA. Die Polymerisation wurde wahrscheinlich durch α -Tocopherol, das trotz seines sauren Charakters in der Lage ist, die Polymerisation durch seine OH-Gruppe zu initiieren.

Tabelle 12: Vergleich der Dispersionen VN001 und VN007.

Probenbezeichnung	Tensid	Monomer	Partikelgröße / nm (x_{50})	Halbwertsbreite / nm
VN001	SDS	BCA	78	23
VN007	SDS	ECA	340	73

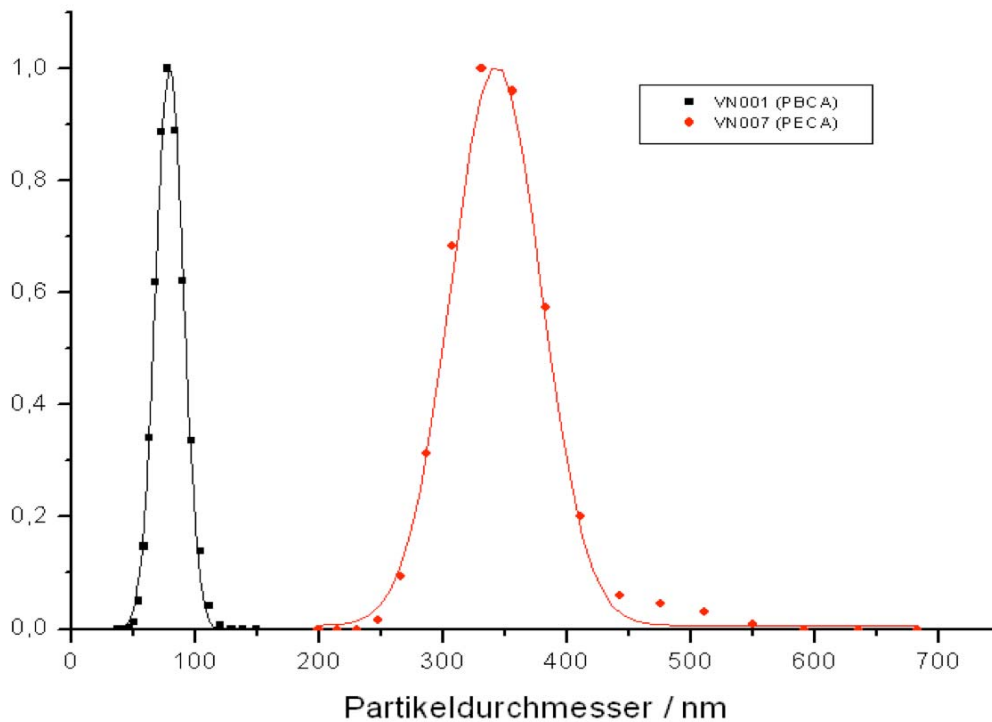


Abbildung 33: Größenverteilung der Partikel VN001 (PBCA) und VN007 (PECA).

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Partikel aus PBCA mit unterschiedlichen Anteilen an α -Tocopherol zwischen 4 und 60% mit der Miniemulsionstechnik hergestellt. Zur Stabilisierung der Dispersionen wurden die Tenside SDS, Tween[®]80 und Lutrol[®]F68 verwendet und miteinander verglichen. Aus den Ergebnissen dieses Vergleichs wurden die Partikel mit SDS für die Untersuchung der Freisetzungskinetik ausgesucht.

Die Reinigung der Partikel von freiem oder mizellisiertem α -Tocopherol erfolgte durch Zentrifugation. Da hier kein α -Tocopherol abgetrennt werden konnte, wurde angenommen, dass das gesamte α -Tocopherol in bzw. an die Partikel gebunden ist.

Die anschließende Untersuchung der Freisetzungskinetik erfolgte an gefriergetrockneten Partikeln, die in n-Hexan redispergiert wurden. Zur Quantifizierung wurde anfangs Gravimetrie angewendet, die später durch die UV-Vis-Spektroskopie ersetzt wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine sofortige Freisetzung des α -Tocopherols zu ca. 75% noch vor der ersten Probenentnahme. Diese α -Tocopherolkonzentration blieb bei zu späteren Zeitpunkten entnommenen Proben konstant. Eine Freisetzungskurve konnte somit nicht aufgenommen werden.

Diese schlagartige Freisetzung kann zwei Gründe haben: Entweder ist das n-Hexan als Lösungsmittel nicht geeignet, da es das α -Tocopherol zu schnell aus den Partikeln herauslöst, oder aber das α -Tocopherol ist nicht in den Partikeln eingekapselt und löst sich direkt in n-Hexan. Diese beiden Punkte wurden näher untersucht.

Die Eignung des n-Hexans als Lösungsmittel wurde geprüft, indem die Untersuchung der Freisetzungskinetik in n-Hexan/Alkohol-Gemischen wiederholt wurde. Durch diese Erhöhung der Polarität des Lösungsmittels sollte ein langsamerer Lösungsvorgang des α -Tocopherols bewirkt werden, wodurch eine Aufnahme einer Freisetzungskurve ermöglicht werden sollte. Wiederum folgte durch die Erhöhung der Polarität ein Aufquellen des Polymers, was eine schnellere Freisetzung von α -Tocopherol zur Folge haben könnte. Am Ende wurde mit den Lösungsmittelgemischen dasselbe Ergebnis wie mit reinem n-Hexan erhalten. Aufgrund des Aufquellens des

Polymers kann keine endgültige Aussage über die Eignung von n-Hexan als Lösungsmittel getroffen werden.

Für die Untersuchung der Verkapselung von α -Tocopherol in den Partikeln wurde die Dispersion mit n-Hexan ausgeschüttelt. Damit ist gewährleistet, dass die Partikel sich noch in ihrem „Originalzustand“ befinden und keine eventuellen Schäden durch die Gefriertrocknung auftreten. Da n-Hexan PBCA weder löst noch aufquellt, sollte eingekapseltes α -Tocopherol geschützt sein und nur ungeschütztes extrahiert werden können. Dadurch könnte der Grad der Verkapselung bestimmt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei steigendem α -Tocopherolanteil in der dispersen Phase auch der Verkapselungsgrad ansteigt. Bei einem α -Tocopherolanteil von 4% liegt der Verkapselungsgrad bei 87,9%, bei einem Anteil von 10% bei 94,5% und bei einem Anteil von 20% bei 97,7%.

Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die Mengen an α -Tocopherol, die aus den Dispersionen extrahiert werden konnten, unabhängig vom α -Tocopherolanteil von 4%, 10% und 20% nach jedem Extraktionsvorgang übereinstimmen. Daraus folgt, dass nur diese konstante Menge mit n-Hexan in Kontakt treten kann und zugänglich ist, während das restliche α -Tocopherol in den Partikeln geschützt bleibt.

Diese konstante α -Tocopherolmenge könnte durch einen Konzentrationsgradienten des α -Tocopherols innerhalb des Partikels erklärt werden. Es wird also vermutet, dass sich eine bestimmte Menge α -Tocopherol im äußeren Bereich des Partikels befindet und der größte Teil so tief im Partikel verkapselt ist, dass er nicht vom n-Hexan erreicht wird.

Eine kinetisch kontrollierbare Freisetzung von α -Tocopherol mit n-Hexan ist somit nicht möglich, obwohl sich α -Tocopherol in PBCA erfolgreich verkapseln ließ.

Eine langsame Freisetzung von α -Tocopherol aus den Partikeln wäre vielleicht möglich, wenn sich ein geeignetes Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch finden ließe, welches eine langsame Auflösung bzw. ein langsames Aufquellen des Polymers bewirkt.

7. Literaturverzeichnis

1. Wang, X.Y. and P.J. Quinn, *Vitamin E and its function in membranes*. Progress in Lipid Research, 1999. **38**(4): p. 309-336.
2. Asai, Y., T. Nomura, and S. Watanabe, *Interaction of alpha-tocopherol and soybean oil with phosphatidylcholine and their formation of small dispersed particles*. Journal of Colloid and Interface Science, 1999. **214**(1): p. 79-84.
3. Julianto, T., K.H. Yuen, and A.M. Noor, *Improved bioavailability of vitamin E with a self emulsifying formulation*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **200**(1): p. 53-57.
4. Landfester, K., *Synthesis of colloidal particles in miniemulsions*. Annual Review of Materials Research, 2006. **36**: p. 231-279.
5. Landfester, K., *Polyreactions in miniemulsions*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. **22**(12): p. 896-936.
6. Vauthier, C., et al., *Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(4): p. 519-548.
7. Alyautdin, R.N., et al., *Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 1997. **14**(3): p. 325-328.
8. Koziara, J.M., et al., *In situ blood-brain barrier transport of nanoparticles*. Pharmaceutical Research, 2003. **20**(11): p. 1772-1778.
9. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
10. Lagaly, G., O. Schulz, and Z. Ralf, *Dispersionen und Emulsionen*. 1997: Steinkopff Darmstadt.
11. Higuchi, W.I. and J. Misra, *PHYSICAL DEGRADATION OF EMULSIONS VIA MOLECULAR DIFFUSION ROUTE AND POSSIBLE PREVENTION THEREOF*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1962. **51**(5): p. 459-&.

12. Tieke, B., *Makromolekulare Chemie*. 2005: Wiley-VCH.
13. Fontenot, K.J., J. Reimers, and F.J. Schork, *MINIEMULSION POLYMERIZATION*. 4th International Workshop on Polymer Reaction Engineering, 1992. **127**: p. 429-438.
14. Fontenot, K. and F.J. Schork, *SENSITIVITIES OF DROPLET SIZE AND STABILITY IN MONOMERIC EMULSIONS*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1993. **32**(2): p. 373-385.
15. Landfester, K., M. Willert, and M. Antonietti, *Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions*. *Macromolecules*, 2000. **33**(7): p. 2370-2376.
16. Abismail, B., et al., *Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1999. **6**(1-2): p. 75-83.
17. Huang, H., et al., *Miniemulsion copolymerization of styrene and butyl acrylate initiated by redox system at lower temperature-preparation and polymerization of miniemulsion*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1998. **68**(12): p. 2029-2039.
18. Maitre, C., et al., *Anionic polymerization of phenyl glycidyl ether in miniemulsion*. *Macromolecules*, 2000. **33**(21): p. 7730-7736.
19. Cauvin, S., et al., *High molar mass polymers by cationic polymerisation in emulsion and miniemulsion*. *Chemical Communications*, 2005(21): p. 2713-2715.
20. Landfester, K., et al., *Polyaddition in miniemulsions: A new route to polymer dispersions*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2000. **201**(1): p. 1-5.
21. Barrere, M. and K. Landfester, *Polyester synthesis in aqueous miniemulsion*. *Polymer*, 2003. **44**(10): p. 2833-2841.
22. Tiarks, F., K. Landfester, and M. Antonietti, *Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization*. *Langmuir*, 2001. **17**(3): p. 908-918.
23. Torza, S. and S.G. Mason, *3-PHASE INTERACTIONS IN SHEAR AND ELECTRICAL FIELDS*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1970. **33**(1): p. 67-&.

24. Sundberg, D.C., et al., *MORPHOLOGY DEVELOPMENT OF POLYMERIC MICROPARTICLES IN AQUEOUS DISPERSIONS .1. THERMODYNAMIC CONSIDERATIONS*. Journal of Applied Polymer Science, 1990. **41**(7-8): p. 1425-1442.
25. Gonzalezortiz, L.J. and J.M. Asua, *DEVELOPMENT OF PARTICLE MORPHOLOGY IN EMULSION POLYMERIZATION .1. CLUSTER DYNAMICS*. Macromolecules, 1995. **28**(9): p. 3135-3145.
26. Zhang, S.W., et al., *Synthesis of SiO₂/polystyrene nanocomposite particles via miniemulsion polymerization*. Langmuir, 2005. **21**(6): p. 2124-2128.
27. Gosh, S.K., *Functional Coatings*. 2006: Wiley-VCH.
28. Musyanovych, A. and K. Landfester, *Core-Shell Particles*. Macromolecular Engineering, 2007: p. 1209-1247.
29. Ogawa, Y., et al., *CONTROLLED-RELEASE OF LEUPROLIDE ACETATE FROM POLYLACTIC ACID OR COPOLY(LACTIC GLYCOLIC) ACID MICROCAPSULES - INFLUENCE OF MOLECULAR-WEIGHT AND COPOLYMER RATIO OF POLYMER*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1988. **36**(4): p. 1502-1507.
30. Penco, M., et al., *Degradation behaviour of block copolymers containing poly(lactic-glycolic acid) and poly(ethylene glycol) segments*. Biomaterials, 1996. **17**(16): p. 1583-1590.
31. Vert, M., S. Li, and H. Garreau, *MORE ABOUT THE DEGRADATION OF LA/GA-DERIVED MATRICES IN AQUEOUS-MEDIA*. Journal of Controlled Release, 1991. **16**(1-2): p. 15-26.
32. Liu, J., R. Pelton, and A.N. Hrymak, *Properties of poly(N-isopropylacrylamide)-grafted colloidal silica*. Journal of Colloid and Interface Science, 2000. **227**(2): p. 408-411.
33. Wei, H., et al., *Self-assembled thermo- and pH-responsive micelles of poly(10-undecenoic acid-b-N-isopropylacrylamide) for drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2006. **116**(3): p. 266-274.
34. Huang, C.Y., C.M. Chen, and Y.D. Lee, *Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **338**(1-2): p. 267-275.

35. Sant, S., W. Nadeau, and P. Hildgen, *Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2005. **107**(2): p. 203-214.
36. Coombes, A.G.A., et al., *The control of protein release from poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method*. Journal of Controlled Release, 1998. **52**(3): p. 311-320.
37. Reis, C.P., et al., *Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **30**(5): p. 392-397.
38. Heiss, W.H. and P. Faul, *"Nervennaht" mit Klebstoff*. Langenbeck's Archives of Surgery, 1965. **313**(1): p. 710-713.
39. Kreuter, J., *NANOPARTICLE-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS*. Journal of Controlled Release, 1991. **16**(1-2): p. 169-176.
40. Couvreur, P., et al., *INTRACELLULAR TARGETING OF ANTIBIOTICS BY MEANS OF BIODEGRADABLE NANOPARTICLES*. Journal of Controlled Release, 1992. **19**(1-3): p. 259-267.
41. Damge, C., et al., *NANOCAPSULES AS CARRIERS FOR ORAL PEPTIDE DELIVERY*. Journal of Controlled Release, 1990. **13**(2-3): p. 233-239.
42. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 65-81.
43. Garcia-Garcia, E., et al. *Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain?* 2004. London, ENGLAND: Elsevier Science Bv.
44. Ramge, P., et al., *Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells*. European Journal of Neuroscience, 2000. **12**(6): p. 1931-1940.
45. Weiss, C.K., et al., *The first step into the brain: Uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation*. Chemmedchem, 2008. **3**(9): p. 1395-1403.

46. Weiss, C.K., U. Ziener, and K. Landfester, *A route to nonfunctionalized and functionalized poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles: Preparation in miniemulsion*. *Macromolecules*, 2007. **40**(4): p. 928-938.
47. Kreuter, J., et al., *Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles*. *Pharmaceutical Research*, 2003. **20**(3): p. 409-416.
48. Traber, M.G. and L. Packer. *VITAMIN-E - BEYOND ANTIOXIDANT FUNCTION*. 1994. Berlin, Germany: Amer Soc Clin Nutrition Inc.
49. Traber, M.G. and H. Arai, *Molecular mechanisms of vitamin E transport*. *Annual Review of Nutrition*, 1999. **19**: p. 343-355.
50. Traber, M.G., *Does vitamin E decrease heart attack risk? Summary and implications with respect to dietary recommendations*. *Journal of Nutrition*, 2001. **131**(2): p. 395S-397S.
51. Heinonen, O.P., et al., *Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: Incidence and mortality in a controlled trial*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998. **90**(6): p. 440-446.
52. Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden der organischen Chemie*. Vol. 7. 2005: Thieme.
53. Balz, M., E. Schulte, and H.-P. Thier, *A new Parameter for checking the Suitability of Tocopherol standards*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1996. **202**: p. 80-81.
54. Schärftl, W., *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersion*. Vol. 1. 2007: Springer.
55. Lo, Y.I., *Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **90**(1): p. 37-48.
56. Rege, B.D., J.P.Y. Kao, and J.E. Polli, *Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002. **16**(4-5): p. 237-246.

57. Bootz, A., *Entwicklung, Charakterisierung und Testung von Nanopartikeln zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke auf Basis von Poly(butylcyanoacrylat)*. 2006.
58. Mukai, K., et al., *Structure-activity relationship of the free-radical-scavenging reaction by vitamin E (alpha-, beta-, gamma-, delta-tocopherols) and ubiquinol-10: pH dependence of the reaction rates*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(3): p. 652-662.

8. Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katharina Landfester für die interessante und fordernde Themenstellung und die stets bereitwillige Unterstützung.

Vor allem möchte ich Herrn Dr. Clemens Weiss danken für die erstklassige Betreuung und unermüdliche Beratung und Hilfestellung während der gesamten Diplomsarbeitszeit.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Frey für die Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Ich danke allen Mitgliedern des Arbeitskreis Landfester für die ausgesprochen große Hilfsbereitschaft und das bemerkenswert angenehme Arbeitsklima, sowie Christoph Hauser für das Korrekturlesen.

Besonders herzlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich während des gesamten Studiums unablässig unterstützten.

9. Erklärung

Diese Diplomarbeit wurde in der Zeit vom 02.11.2008 bis zum 28.07.2009 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig 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.

Mainz, den 28.07.2009 _____
Viet Nguyen-Kim