

## Ergebnisse

### 2 Lokalisierung lipophiler Solubilisate innerhalb der Doppelschicht von Phospholipidvesikeln

#### 2.1 Untersuchungsmethoden zur Lokalisierung des Solubilisats in Vesikeln

Die Charakterisierung des Einflusses eines Solubilisats auf die physiko-chemischen Eigenschaften von Vesikeln erfordert die Kenntnis der Lokalisierung des Gast-Moleküls im Bereich der Doppelschicht des Assoziats. Der Aufenthaltsort kleiner aromatischer Solubilisate in Vesikeln wird wie bei mizellaren Systemen durchaus kontrovers diskutiert: Benzol wird sowohl im inneren Membranbereich [39], als auch im Kopfgruppenbereich [40] fluider Vesikel vermutet. Demgegenüber ist Pyren wahrscheinlich im rein lipophilen Bereich lokalisiert [41]. Hinsichtlich dieser Problematik wurden zunächst detaillierte Untersuchungen der Einlagerung aromatischer Solubilisate in unilamellaren Vesikeln mit Hilfe der Protonenresonanzspektroskopie, der Röntgenbeugung und der Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt.

#### 2.2 Protonenresonanzspektroskopie zur Charakterisierung der Packungseigenschaften innerhalb der Doppelschicht

Die Protonenresonanzspektroskopie ist eine empfindliche Methode zur Detektion von Packungsänderungen der Phospholipidmoleküle innerhalb der Doppelschicht von Vesikeln. Auf diese Weise kann das thermotrope Verhalten der Phospholipide untersucht [42] und eine Einlagerung von Solubilisaten in die Doppelschicht nachgewiesen werden [43]. Weiterhin besteht die Möglichkeit lipophile aromatische Solubilisate in Mizellen [29] sowie innerhalb der Doppelschicht kleiner unilamellarer Vesikel [44,41] zu lokalisieren und zu quantifizieren.

Die intrinsischen Eigenschaften kleiner unilamellarer Vesikel werden durch die unterschiedlichen Krümmungen beider Monoschichten stark beeinflusst, ein Effekt, der ebenfalls spektroskopisch detektierbar ist. Die beiden Schichten weisen, bedingt durch die Präparationsart, eine unterschiedliche Anzahl an Lipidmolekülen sowie verschiedene Packungsdichten auf. Der lipophile Bereich der äußeren Monoschicht ist hierbei im Vergleich zur inneren dichter gepackt (vgl. Abbildung 2-1).

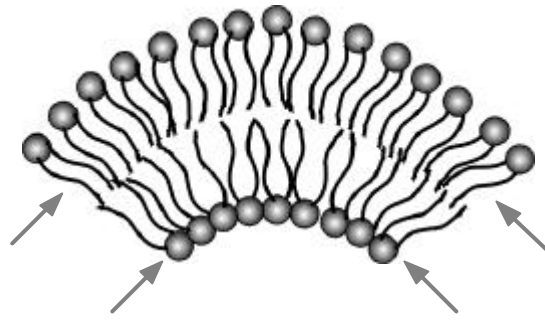
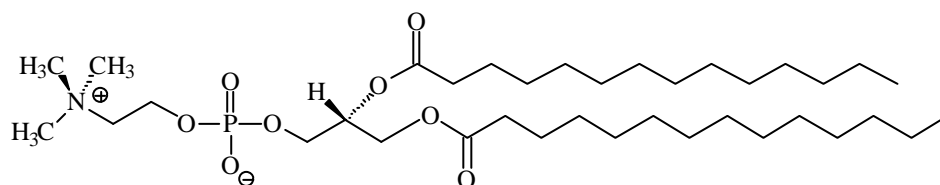


Abbildung 2-1: Ausschnitt aus der Doppelschicht eines kleinen unilamellaren Vesikels mit hoher Membrankrümmung. Der Überschuss der Amphiphilmoleküle in der äußeren Monoschicht bedingt Unterschiede in den Packungsdichten. Die Pfeile markieren die jeweils dicht gepackten Bereiche. Hierzu zählen der lipophile Bereich der äußeren Monoschicht und der Kopfgruppenbereich der inneren Monoschicht. Der lipophile Bereich der inneren Monoschicht, sowie der Kopfgruppenbereich der äußeren Monoschicht sind hingegen vergleichsweise locker gepackt.

Die dichte Packung des lipophilen Bereichs der äußeren Monoschicht führt ferner zu verstärkten Wechselwirkungen der Acylreste unter Expansion der Elektronenwolken der Protonen. Diese erfahren somit eine Entschirmung und zeigen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eine Resonanz bei geringfügig tieferem Feld im Vergleich zu Acyl-Protonen der inneren Monoschicht [42]. Die eingeschränkte Beweglichkeit der unpolaren Ketten der äußeren Monoschicht ist vermutlich Grund für die vergrößerte Linienbreite der terminalen Methyl- und der Methylenresonanzen dieser Schicht. Hierdurch kommt es zu einer Überlagerung der Signale, so daß ein Unterschied der Resonanzen oftmals nicht auflösbar ist. Abbildung 2-2 zeigt das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von DMPC-Vesikel in  $\text{D}_2\text{O}$  nach Ultraschallbehandlung mit der Zuordnung der entsprechenden Resonanzen [44]. Die unterschiedlichen Resonanzen der Methylgruppen des Cholin bei einer chemischen Verschiebung  $\delta$  von 3.32 ppm und 3.28 ppm der äußeren und inneren Monoschicht sind in Abbildung 2-2 gut detektierbar. Grund für die Differenzierung sind vermutlich elektrostatische Effekte [45]. Der dichter gepackte Kopfgruppenbereich der inneren Doppelschicht liefert erwartungsgemäß eine Resonanz bei höherem Feld [46].



Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)

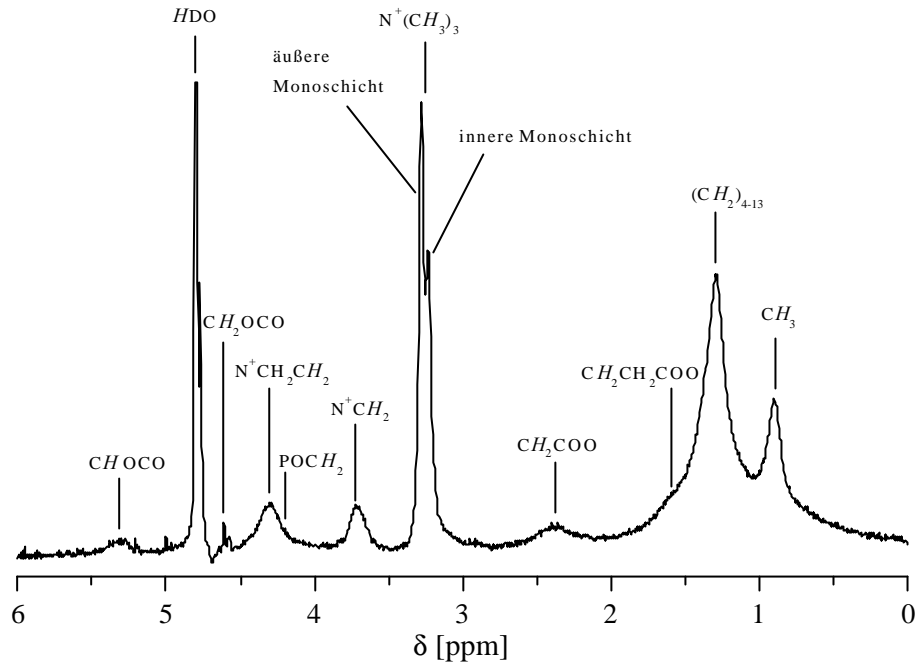


Abbildung 2-2: Strukturformel von DMPC und 200 MHz-Protonenresonanzspektrum kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel ( $c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $25^\circ\text{C}$  ( $L_a$ -Phase). Die Signale sind mit der jeweiligen Zuordnung versehen [44]. Die Resonanzen bei 3.32 ppm und 3.28 ppm im Verhältnis 2:1 entsprechen den Methylgruppen des Cholin der äußeren und der inneren Monoschicht. Grund hierfür ist der zweifache Überschuß an Amphiphilmolekülen in der äußeren Monoschicht im Vergleich zur inneren und die resultierenden Unterschiede in den Packungsdichten gemäß Abbildung 2-1.

### 2.2.1 Interaktion lipophiler Solubilisate mit der Doppelschicht von Vesikeln

Die Einlagerung einer lipophilen Substanz in die Doppelschicht von Vesikeln beeinflusst die Packungsdichte und führt zu einer detektierbaren Änderung der chemischen Umgebung der Protonen des Amphiphils. Durch sukzessive Erhöhung der Solubilisatkonzentration sollte es möglich sein, bei konstanter Temperatur Informationen über die Lokalisierung des Solubilisats innerhalb des Membranbereichs als Funktion der Konzentration zu erhalten. Aromatische Solubilisate fungieren innerhalb der Doppelschicht zusätzlich als eine Art „Sonde“, da sie eine selektive Änderung der chemischen Verschiebung der Protonen benachbarter Phospholipidmoleküle verursachen [41,47]. Grund hierfür ist die diamagnetische Anisotropie des aromatischen Systems. Bei Wechselwirkung des Aromaten mit Protonen des Amphiphils erfahren diese effektiv eine scheinbare Abschirmung. Hieraus folgt eine Resonanz der Protonen bei höherem Feld [29].

Die  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Untersuchungen erfolgten durch Titration einer homogenen Dispersion kleiner unilamellarer Vesikel mit einer Reihe aromatischer Solubilisate.

Abbildung 2-3 zeigt typische Protonenresonanzspektren nach Solubilisierung von Toluol in DMPC-Vesikeln.

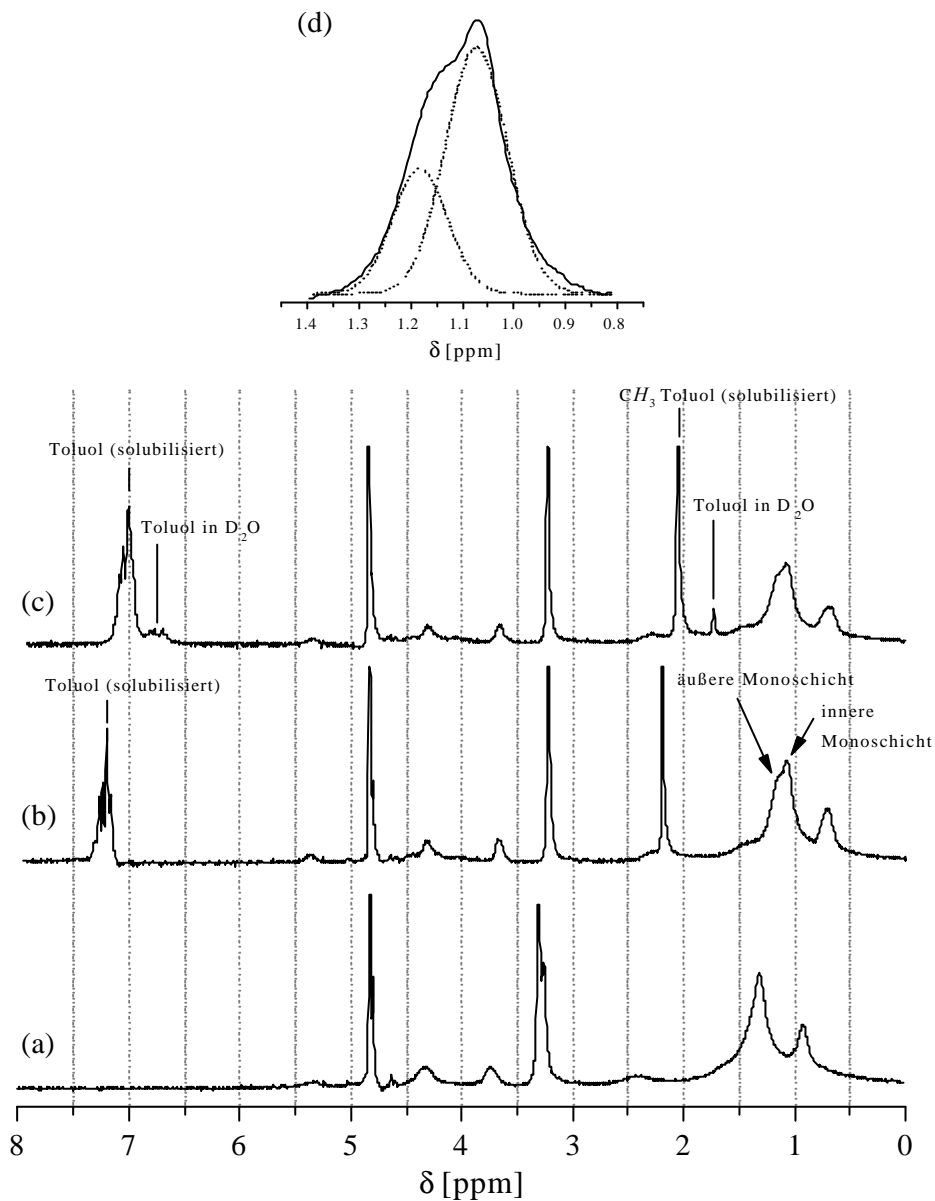


Abbildung 2-3: 200 MHz- $^1H$ -NMR-Spektrum kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel in  $D_2O$  in Abwesenheit von Toluol (a) und mit solubiliertem Toluol (0.4 mg/mg DMPC) im Bereich der Doppelschicht (b). Die Zugabe von Toluol (0.9 mg/mg DMPC) oberhalb der Solubilisierungskapazität der Vesikel (c) führt zu zusätzlichen Resonanzen von Toluol in der Wasserphase. Mit zunehmender Toluolkonzentration wird die Differenzierung der Methylenresonanzen in eine breite Komponente bei tiefem und eine schmale bei hohem Feld deutlich (d). (d) zeigt die Methylenresonanzen aus (b). Die Methylsignale des Cholin im Kopfgruppenbereich bei  $\delta \approx 3.3$  ppm sind mit steigender Toluolkonzentrationen nicht mehr unterscheidbar.

Die Wechselwirkung des Solubilisats mit dem Amphiphil innerhalb der Vesikel wird durch eine charakteristische Hochfeldverschiebung der Acylprotonen des Phospholipids und der Methylgruppen des Cholin manifestiert. Ferner ist solubilisiertes Toluol in Abbildung 2-3 (b) mit einer Resonanz bei  $\delta = 6.9 - 7.3$  ppm ( $CH_{\text{aromat.}}$ ) und  $\delta = 2.0 - 2.3$  ppm ( $CH_3$ ) detektierbar und läßt sich von emulgiertem Toluol  $\delta = 6.7$  ppm ( $CH_{\text{aromat.}}$ ) und  $\delta = 1.8$  ppm ( $CH_3$ ) bei Konzentrationen oberhalb des Solubilisierungsvermögens der Vesikel unterscheiden. Das Solubilisat zeigt somit ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hochfeldverschiebung. Dies deutet auf intermolekulare Toluolwechselwirkungen innerhalb der Doppelschicht in Form von  $\pi$ -Stapeln hin [48]. Der konzentrationsabhängige Verlauf der Hochfeldverschiebungen ist für unterschiedliche Molekülbereiche in Abbildung 2-4 wiedergegeben.

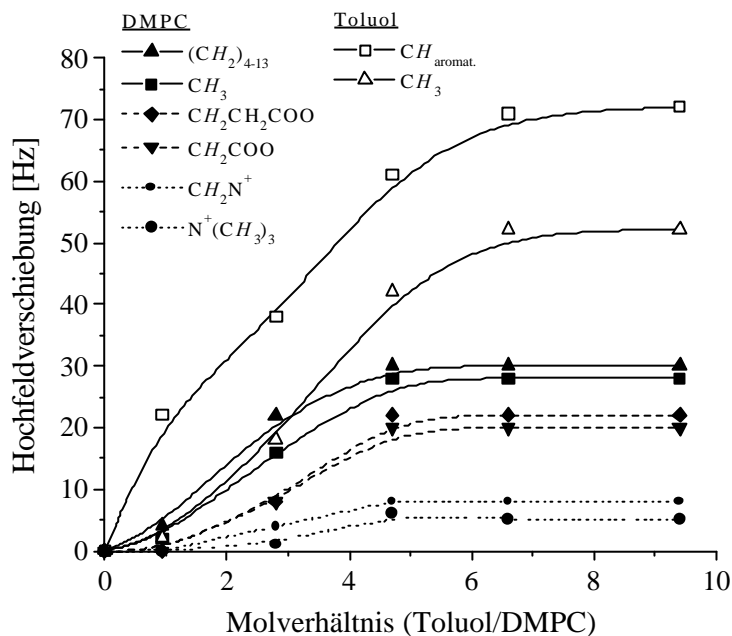


Abbildung 2-4: Mittlere Hochfeldverschiebung der aus dem 200 MHz-Protonenresonanzspektrums ermittelten Signale kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel in Abhängigkeit von der zugeführten Toluolmenge. Vergleich der Verschiebung der Signale des solubilisierten Toluol (offene Symbole) mit denen des DMPC (gefüllte Symbole).

Auffällig ist die deutliche Hochfeldverschiebung der Protonen des DMPC unterhalb eines Molverhältnisses von etwa 4.5, gefolgt von einem Plateaubereich. Innerhalb dieses Plateaubereichs sollte die Interaktion von Lipid und Toluol maximal und die Lipid-Lipid-Wechselwirkungen durch Interkalation des Solubilisats nahezu vollständig aufgehoben sein. Ferner ist das Plateau der Hochfeldverschiebung der Resonanzen des Toluol geringfügig zu höheren Solubilisatkonzentrationen verschoben, so daß eine Aggregation von Toluol in der

Membran angenommen werden kann. Entsprechend werden die Resonanzen des solubilierten Toluol denen einer O/W-Emulsion ähnlicher.

Weiterhin verdeutlicht Abbildung 2-4 den Einfluß des aromatischen Solubilisats auf die unterschiedlichen Bereiche der Doppelschicht (gefüllte Symbole). Betrachtet man den jeweiligen Betrag der Hochfeldverschiebung, so fällt auf, daß dieser im lipophilen Bereich (durchgezogene Linie) maximal ist und in Richtung des Kopfgruppenbereichs (gepunktete Linie) deutlich abnimmt. Entsprechend wird mit steigender Solubilisatkonzentration wird die Einlagerung im Bereich der Kopfgruppe wahrscheinlicher.

### 2.2.1.1 Einfluß des Phasenverhaltens der Phospholipide

Der Vergleich des Einflusses des Solubilisats auf DMPC-Vesikel im fluiden Zustand (Abbildung 2-4) und DPPC-Vesikeln im Gelzustand in Abbildung 2-5 zeigt einen nahezu analogen Verlauf.

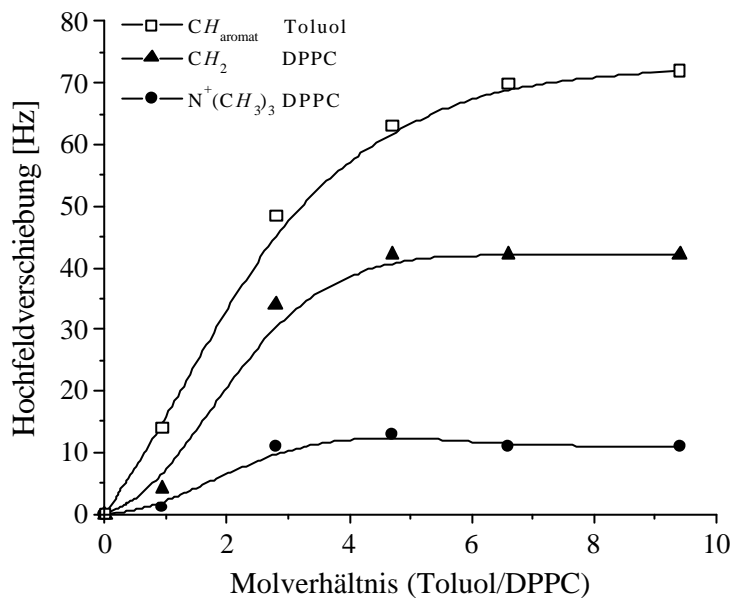


Abbildung 2-5: Durch Solubilisierung von Toluol bedingte Hochfeldverschiebung der Protonenresonanz kleiner unilamellarer DPPC-Vesikel in D<sub>2</sub>O. Die Messung der Kernresonanzspektren erfolgte bei 25°C in der Gelphase des DPPC bei einer Meßfrequenz von 200 MHz. Die starke Signalverbreiterung der Acylreste aufgrund der stark eingeschränkten Bewegungsfreiheit erschwert hierbei die exakte Detektion der Signale bei kleiner Solubilisatkonzentration.

Der Betrag der Hochfeldverschiebung der DPPC-Protonen ist geringfügig höher als bei DMPC im fluiden Zustand, ein Effekt, der auf die höhere Ordnung der Gelphase zurückzuführen ist. Das Plateau tritt bei einem etwas niedrigeren Molverhältnis auf. Dies deutet auf ein kleineres Solubilisierungsvermögen von Vesikeln im Gelzustand im Vergleich zu flui-

den Vesikeln hin [47]. Das Plateau der Hochfeldverschiebung der Resonanzen des Toluol hingegen zeigt in beiden Fällen identische Werte von etwa 70 Hz.

### 2.2.1.2 Einfluß der Gestalt des Solubilisats

Die Untersuchung der Solubilisierung von Styrol in DMPC-Vesikeln in der  $L_a$ -Phase ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Hier zeigt sich für die beobachteten Hochfeldverschiebungen der Methylenresonanzen ein analoger Verlauf im Vergleich zur Einlagerung von Toluol (vgl. Abbildung 2-4), wobei im Bereich maximaler Solubilisatmenge keinerlei Abhängigkeit vom jeweiligen aromatischen Solubilisat festgestellt werden kann. Auffällig ist einzig die geringere Hochfeldverschiebung der Resonanzen des Styrol gegenüber Toluol. Dieser Effekt könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Packungsdichten des Solubilisats im lipophilen Membranbereich sein.

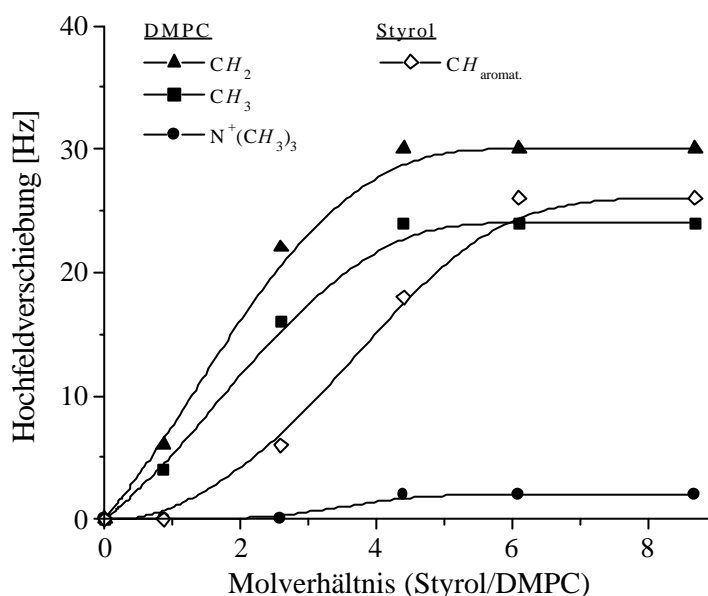


Abbildung 2-6: Hochfeldverschiebung der Protonenresonanzen nach Titration kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel in  $D_2O$  mit Styrol bei einer Meßfrequenz von 200 MHz und einer Temperatur von  $25^\circ C$ .

### 2.2.1.3 Solubilisierungsvermögen der inneren und äußeren Monoschicht

Wie bereits beschrieben, sind die Packungsdichten der unterschiedlichen Bereiche der Monoschichten kleiner Vesikel keinesfalls identisch. Die hohe Krümmung der Vesikel bedingt die dichtere Packung des lipophilen Bereichs der äußeren Monoschicht im Vergleich zu inneren (vgl. Abbildung 2-1). Aus diesem Grunde sollte das Solubilisierungsvermögen für lipophile Substanzen ebenfalls Unterschiede in Bezug auf die Einlagerung in den einzelnen Monoschichten aufweisen. Hierzu wurden aromatische Solubilisate mit unterschiedlicher Affinität zum Kopfgruppenbereich des Amphiphils untersucht.

Unter Verwendung der Protonenresonanzspektroskopie kann zwischen dem Einfluß des Solubilisats auf die Resonanzen der inneren und äußeren Monoschicht von DMPC-Vesikeln differenziert werden. Abbildung 2-7 zeigt die durch den Anisotropieeffekt von solubiliertem Benzol verursachte Hochfeldverschiebung der Protonenresonanzen der Methylengruppen der Acylreste sowie der Methylgruppen des Cholin von DMPC.

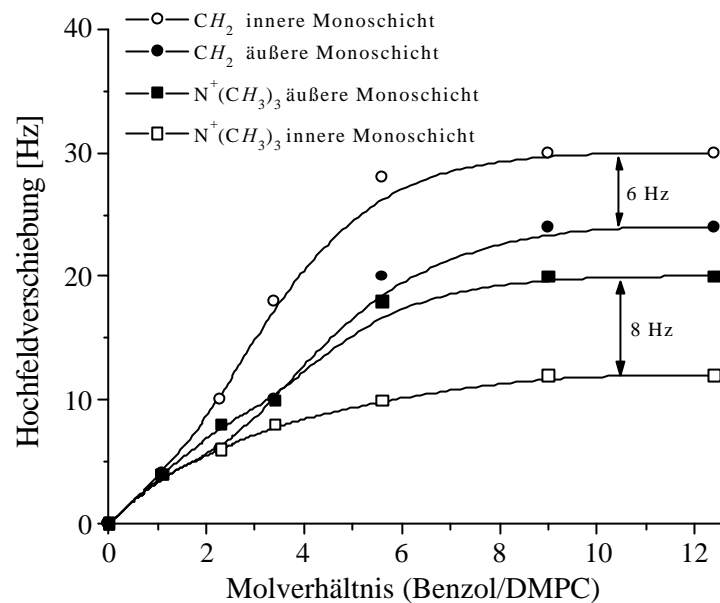


Abbildung 2-7: Hochfeldverschiebung der Protonenresonanzen der Methylengruppen der Acylreste sowie der Methylgruppen des Cholin unter Berücksichtigung der jeweiligen Monoschicht von DMPC-Vesikeln unter dem Einfluß von solubiliertem Benzol. Gefüllte Symbole bezeichnen die Resonanzen der äußeren, offene Symbole die der inneren Monoschicht.

Die Hochfeldverschiebung steigt mit zunehmender Solubilisatmenge, wobei der unterschiedliche Einfluß des Solubilisats auf die Protonen des Amphiphils in den einzelnen Monoschichten deutlich wird. Dieser resultiert aus der beschriebenen intrinsischen Asymmetrie der stark gekrümmten Doppelschicht [42] und dem damit verbundenen unterschiedlichen Solubilisierungsvermögen. Bereiche niedriger Packungsdichte zeigen eine deutlich höhere Hochfeldverschiebung im Vergleich zu denen höherer Dichte. Folglich findet eine bevorzugte Einlagerung von Benzol im lipophilen Bereich der inneren Monoschicht und im Kopfgruppenbereich der äußeren Monoschicht statt, den Bereichen mit vergleichbar lockerer Packung der Amphiphile. Hier ist das größte freie Volumen zur Einlagerung des Solubilisats vorhanden.

Die Solubilisierung von Toluol zeigt ähnliche Aufspaltungen der Signale mit 4 Hz für die Methylengruppen und 8 Hz für die Methylgruppen des Cholin (Daten nicht aufgeführt).



## 2.2.2 Einfluß des Solubilisats auf den Kopfgruppenbereich

Die beobachteten Hochfeldverschiebungen der Protonen des lipophilen Bereichs des DMPC zeigen keinerlei Abhängigkeit vom jeweiligen aromatischen Solubilisat im Bereich maximaler Solubilisatmenge. Die Verschiebung der Methylenprotonen des DMPC liegt bei Solubilisierung von Benzol, Toluol bzw. Styrol jeweils bei etwa 30 Hz.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen des Einflusses auf den lipophilen Bereich der Vesikel, zeigt die mittlere Verschiebungen der Methylresonanzen der Kopfgruppe in Abbildung 2-8 eine deutliche Abhängigkeit vom Solubilisat. Mit steigender Wasserlöslichkeit der Solubilisate wird eine deutliche Affinität zur Kopfgruppe des Amphiphils beobachtet. Diese ist bei Benzol bereits bei vergleichbar kleinen Molverhältnissen gegeben, während die vergleichbar schlechter löslichen Aromaten Toluol und Styrol erst bei einem molaren Überschuss in diesen Bereich verdrängt werden.

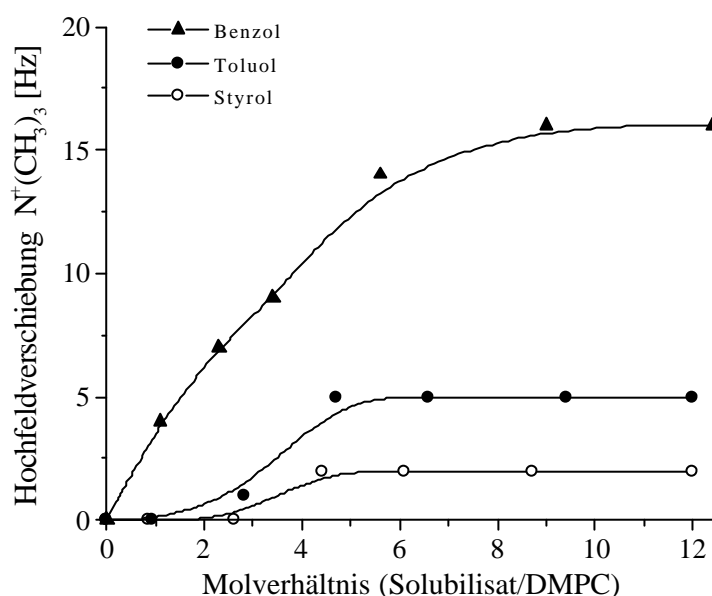


Abbildung 2-8: Mittlere Hochfeldverschiebung der Methylresonanz des Cholin im Kopfgruppenbereich kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel unter dem Einfluß verschiedener aromatischer Solubilisate. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Verschiebung der Protonen der inneren und der äußeren Monoschicht.

Zum Vergleich liefert die Solubilisierung von Hexan in DMPC-Vesikeln eine kaum detektierbare Tieffeldverschiebung von 2 Hz. Diese wird einzig durch die lockere Packung der Phospholipidmoleküle und die hieraus bedingte geringere Lipid-Lipid-Wechselwirkung durch Interkalation von Hexan im Zwischenlipidbereich verursacht.

Die Differenzierung der Methylresonanz des Cholin im Kopfgruppenbereich für die einzelnen Monoschichten in Abbildung 2-9 verdeutlicht den Unterschied von Toluol und Styrol zu Benzol als Solubilisat (vgl. Abbildung 2-7).

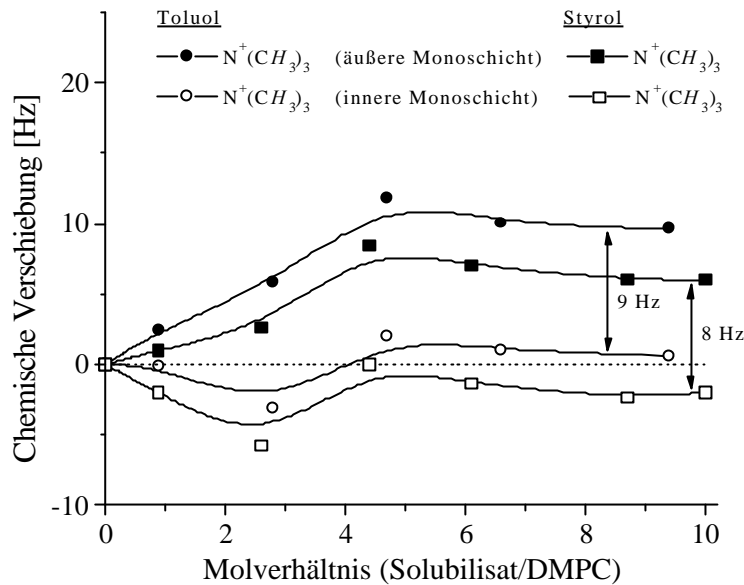


Abbildung 2-9: Verschiebung der Methylresonanz des Cholin bezogen auf die innere Monoschicht (offene Symbole) und die äußere Monoschicht (geschlossene Symbole). Positive Werte bezeichnen eine Verschiebung zu hohem, negative Werte zu tiefem Feld im Vergleich zu solubilisatfreien Vesikeln.

Der Kopfgruppenbereich der inneren, dichteren Monoschicht wird bei Solubilisierung von Toluol nur schwach und von Styrol scheinbar gar nicht beeinflusst. Die bei kleinen Styrolkonzentrationen beobachtbare Tieffeldverschiebung entspricht hierbei derjenigen der Einlagerung von Hexan in die Doppelschicht. Sie wird somit vermutlich durch die Zunahme der lateralen Abstände des Lipids verursacht [42]. Erst ab Molverhältnissen von etwa 3 wird eine Beeinflussung deutlich, so daß eine Angleichung der Packungsdichten der beiden Monoschichten zu erwarten ist [43]. Entsprechend zeigt sich eine nahezu identische Resonanz der Methylgruppen des Cholin der inneren und äußeren Monoschicht bei maximaler Solubilisatmenge (vgl. Abbildung 2-3).

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Vesikeln nach Solubilisierung aromatischer Substanzen mit ausgeprägter Affinität zur polaren Kopfgruppe des Amphiphils unterscheidet sich deutlich von Spektren nach Einlagerung lipophiler Substanzen. So verursacht die Einlagerung von Phenol eine Hochfeldverschiebung der Signale der Protonen im Kopfgruppenbereich, wobei die Protonen des unpolaren Bereichs um etwa 8 Hz tieffeldverschobene Resonanzen aufweisen (vgl. Daten im Anhang). Einflüsse dieser Art konnten für die beschriebenen unpolaren Moleküle nicht beobachtet werden. Dies verdeutlicht die Anordnung des Phenols als Cotensid im Bereich der Kopfgruppe des Amphiphils. Die Hydroxylgruppe weist vermutlich Kontakt mit der Wasserphase auf, während das aromatische System in den inneren Membranbereich der Doppelschicht ragt, ohne tief in diesen einzudringen. Mit steigender Solubilisatkonzentration kann es zur Bildung sogenannter verzahnter ( $L_{al}$ ) Phasen kommen

[49,50]. Die Kettenenden der beiden Monoschichten gleiten unter Abnahme der Membrandicke ineinander. Die zunehmende Kompaktheit des lipophilen Bereichs ist somit der Grund für die beobachtete Protonenresonanz bei tieferem Feld.

### 2.2.3 Solubilisierungskapazitäten kleiner Vesikel

Aus den jeweiligen Verhältnissen der Intensitäten der Protonenresonanzen von Phospholipid und Solubilisat läßt sich im Bereich vollständiger Solubilisierung das maximale Solubilisierungsvermögen der Vesikel abschätzen. Ein entsprechender Vergleich ist in Tabelle 2-1 aufgeführt. Hierbei ist zu beachten, daß die ermittelten Werte nur als grobe Näherung angesehen werden können, da Gestaltänderung sowie Aggregationen und Fusionen der Vesikel während der Titrationsexperimente zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen [29]. Besonders im Bereich hoher Solubilisatmengen werden die DMPC-Vesikel auch oberhalb  $T_m$  sehr instabil und neigen leicht zur Bildung größerer Aggregate. Diese zeigen geringere Intensitäten im Vergleich zu kleinen Vesikeln [51].

Tabelle 2-1: Solubilisierungskapazitäten von Phospholipiden in Form kleiner unilamellarer Vesikel ermittelt mit Hilfe von  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Titrationsexperimenten.

Phospholipid	Solubilisat	Solubilisierungskapazität Solubilisat/Phospholipid [mol/mol]
DMPC ( $L_a$ )	Styrol	$2.9 \pm 0.3$
DPPC ( $L_\beta$ )	Toluol	$3.2 \pm 0.3$
DMPC ( $L_a$ )	Toluol	$4.5 \pm 0.6$
DMPC ( $L_a$ )	Benzol	$5.6 \pm 0.8$

Der Vergleich zeigt, daß mit abnehmender Molekülgröße des Solubilisats die Solubilisierungskapazität steigt. Desweiteren zeigen Phospholipide in der fluiden Phase trotz vergleichbar kleinerem lipophilen Membranbereich eine höhere Solubilisierungskapazität [47].

### 2.2.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie ist es möglich, Aussagen über den Aufenthaltsort eines Solubilisats innerhalb der Doppelschicht kleiner Phospholipidvesikel vorzunehmen. Hierbei kann qualitativ zwischen den jeweiligen Monoschichten unterschieden werden.

Hinsichtlich des Aufenthaltsortes konnte gezeigt werden, daß polare Solubilisate wie Phenol ausschließlich im Kopfgruppenbereich verankert sind. Lipophile Solubilisate wie Benzol hingegen dringen in den unpolaren Bereich der Doppelschicht ein, zeigen jedoch noch eine deutliche Affinität zum Bereich der Kopfgruppe auf, die mit steigender Solubilisatmenge größer wird. Mit zunehmendem lipophilen Charakter und abnehmender Wasser-

löslichkeit des Solubilisats sinkt diese Affinität und ist im Falle des Toluol und insbesondere des Styrol bei kleiner Konzentration gering. Erst bei einem molaren Überschuß des Solubilisats gelangt dieses in den Kopfgruppenbereich. Dies zeigt, daß ein lipophiles Solubilisat innerhalb der Doppelschicht keineswegs fest verankert vorliegt. Vielmehr liegt es in dieser Matrix dispergiert vor und zeigt hinsichtlich der transversalen Anordnung eine definierte Verteilung. Der Charakter dieser Verteilung ist neben den physiko-chemischen Eigenschaften der Komponenten ebenfalls stark geprägt durch die vorherrschenden Packungsverhältnisse innerhalb der Doppelschicht.

Die detaillierte Untersuchung der Solubilisierung zeigt weiterhin, daß die Einlagerung lipophiler Substanzen selektiv in die Bereiche niedriger Packungsdichte erfolgt. Aus diesem Grund werden die Solubilisate bevorzugt in die innere lipophile Monoschicht kleiner unilamellarer Vesikel eingelagert.

Das Solubilisierungsvermögen von Phospholipidvesikeln ist von der Struktur und Größe des Solubilisats abhängig. Kleine kompakte Moleküle werden in großer Menge solubiliert. Insbesondere Vesikel im fluiden Zustand weisen ein höheres Solubilisierungsvermögen als im Gelzustand auf.

### 2.3 Röntgendiffraktometrie zur Charakterisierung struktureller Einflüsse innerhalb der Doppelschicht

Mit Hilfe der Röntgenbeugung ist es möglich, Informationen über die Art der Anordnung der Phospholipide innerhalb der Doppelschicht lamellarer Phasen zu gewinnen und den Einfluß lipophiler Solubilisate zu studieren [52]. Röntgenstrahlen wechselwirken mit Bereichen höher Elektronendichte innerhalb der Struktur, wobei diese Zentren selbst nach kohärenter Streuung wiederum als (sekundäre) Strahlungsquelle fungieren. Die Amplitude der gestreuten Strahlung ist der lokalen Elektronendichte direkt proportional. Die interferierenden Wellen, die an verschiedenen Regionen gestreut werden, erzeugen nach Detektion ein Röntgendiffraktogramm. Konstruktive Interferenz tritt immer dann auf, wenn die Bragg'sche Reflexionsbedingung

$$2d \cdot \sin \mathbf{q} = n\mathbf{l} \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad (2.1)$$

erfüllt ist.  $\mathbf{l}$  kennzeichnet die Wellenlänge der Röntgenstrahlung und  $d$  den Netzebenenabstand. Aus dieser Beziehung folgt eine reziproke Abhängigkeit der Entfernung der Strukturdetails vom Bragg-Winkel  $\mathbf{q}$ .

Die Diffraktogramme von Mesophasen unterscheiden sich aufgrund ihres amorphen Charakters deutlich von denen kristalliner Strukturen. Sie weisen keinerlei scharfe Peaks auf, sondern zeigen diffuse Banden analog den Pulverdiffraktogrammen. Zur Charakterisierung der Strukturmerkmale wird zwischen den Reflexen im Kleinwinkelbereich ( $\mathbf{q} \leq 5^\circ$ ) und denen im Weitwinkelbereich ( $\mathbf{q} > 9^\circ$ ) unterschieden. Die Reflexe definierter Verhältnisse im Kleinwinkelbereich liefern Informationen über die Überstruktur des Amphiphils und kön-

nen zur Abschätzung der vertikalen Dimensionen der Doppelschichten lamellarer Phasen herangezogen werden [53]. Die Weitwinkelreflexe ermöglichen Aussagen über die Packung und das Molekülgerüst der unpolaren Ketten im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Diese Anordnung ist abhängig vom Zustand der Acylreste des Phospholipids. Rigidere Ketten der Lecithine im Gelzustand weisen eine senkrechte Anordnung zur Membranebene auf und liefern scharfe Reflexe bei  $d = 0.42$  nm, während Diffraktogramme fluider Ketten diffuse Banden bei etwa  $d = 0.46$  nm zeigen [52].

### 2.3.1 Einfluß des Solubilisats auf die Membrangeometrie

Zur Untersuchung des Einflusses eines im lipophilen Bereich der Doppelschicht eingelagerten Solubilisats auf die Membrangeometrie wurden wäßrige Dispersionen vollständig hydratisierter lamellarer Phasen von DMPC in der  $L_a$ -Phase analysiert. Die solubilisierte Toluolmenge wurde hierzu bei konstantem DMPC/Wasser-Verhältnis variiert. Die vollständige Hydratisierung ist für die vergleichenden Untersuchungen relevant, da der Ordnungszustand der Lipide, die in lamellaren Phasen auftreten, neben einer Temperaturabhängigkeit auch eine Abhängigkeit vom Hydratisierungsgrad aufweist [54]. Ein typisches Diffraktogramm von DMPC ist in Abbildung 2-10 dargestellt.

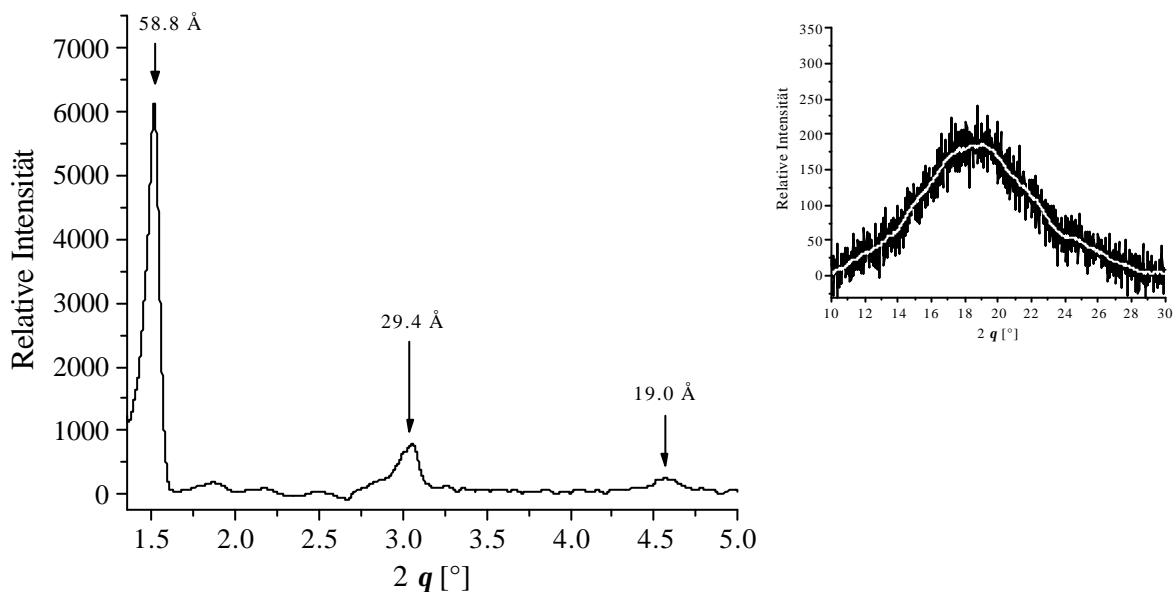


Abbildung 2-10: Röntgendiffraktogramm vollständig hydratisierter lamellarer Phasen von DMPC (mit 40 Gew.-% Wasser) in der  $L_a$ -Phase nach Einlagerung von Toluol im lipophilen Membranbereich ( $T = 25^\circ\text{C}$ ). Markiert sind die Peaks der Reflexe  $n = 1 - 3$  des Kleinwinkelbereichs mit Angabe der Netzebenenabstände  $d$ . Die eingefügte Grafik zeigt die diffuse Bande der fluider Ketten im Weitwinkelbereich.

Die Reflexe im Kleinwinkelbereich des Diffraktogramms lamellarer Phasen von DMPC entsprechen den jeweiligen Lamellenordnungen  $n = 1, 2, 3$  der Reflexe und sind entsprechend den relativen Intensitäten  $I_{\text{rel}}$  in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: Ergebnisse der Röntgenbeugungsuntersuchung vollständig hydratisierter lamellarer DMPC-Phasen (mit 40 Gew.-% Wasser) in Abhängigkeit vom Molverhältnis Toluol/DMPC bei einer Temperatur von  $T = (25 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Reflexe	Molverhältnis [Toluol/DMPC]					
	0		4		11	
Kleinwinkel	$d$ [Å]	$I_{rel}$	$d$ [Å]	$I_{rel}$	$d$ [Å]	$I_{rel}$
$n = 1$	58.8	6700	58.8	4500	57.0	3800
$n = 2$	29.4	1600	29.4	850	28.7	560
$n = 3$	19.0	160	19.8	150	18.8	140
Weitwinkel	4.5	100	4.7	90	4.8	80

Hierbei entspricht der Reflex der Ordnung  $n = 1$  der Zwischenschichtperiodizität  $d_0$  der Doppelschichten (vgl. Abbildung 2-11). Die Membrandicke  $d_1$  kann somit bei bekannter Dichte  $r_s$  der Dispersion in guter Näherung aus der Zwischenschichtperiodizität  $d_0$  abgeschätzt werden [53]. Es gilt

$$d_1 = d_0 - d_w . \quad (2.2)$$

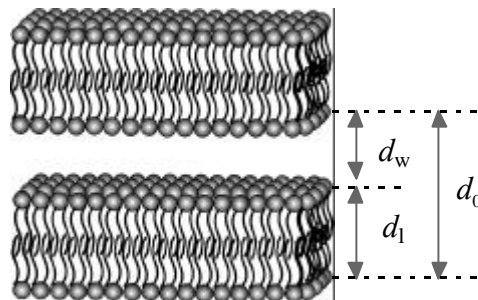


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung der Doppelschichtstruktur hydratisierter lamellarer Phasen zur Erläuterung der Ermittlung der Dicke  $d_1$  der Doppelschicht.

Die effektive Dicke der Wasserschicht  $d_w$  mit der Dichte  $r_w$  ist gegeben durch

$$d_w = d_0 \cdot \frac{m_w}{m_s} \cdot \frac{r_s}{r_w} . \quad (2.3)$$

Die ermittelten Schichtdicken sind für die lamellaren DMPC-Phasen im solubilisatfreien Zustand sowie für den Bereich maximaler Toluolkonzentration in Tabelle 2-3 zusammengefaßt.

Tabelle 2-3: Vergleich der ermittelten Schichtdicken lamellarer DMPC-Phasen bei einer Temperatur von  $T = (25 \pm 1)^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit von der Toluolkonzentration.

Toluol/DMPC	$r_s$ [ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]	$d_0$ [nm]	$d_w$ [nm]	$d_1$ [nm]
0	1.025	5.89	2.41	3.48
11	0.945	5.73	1.14	4.59

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß insbesondere im Bereich maximaler Solubilisatmengen ein Aufquellen der Doppelschicht zu beobachten ist. Hierbei führt die Einlagerung des Solubilisats in den lipophilen Membranbereich zu einer vertikalen Ausdehnung der Doppelschicht um etwa 1 nm.

In Abbildung 2-12 sind die Bragg-Reflexe im Weitwinkelbereich entsprechend der Untersuchung lamellarer Phasen von DMPC dargestellt. Die Doppelschichten weisen jeweils unterschiedliche Konzentrationen an solubiliertem Toluol auf. Auffällig sind zwei Charakteristika, die mit steigender Toluolkonzentration in Erscheinung treten: Die Banden werden breiter und zu kleinen Bragg-Winkeln verschoben.

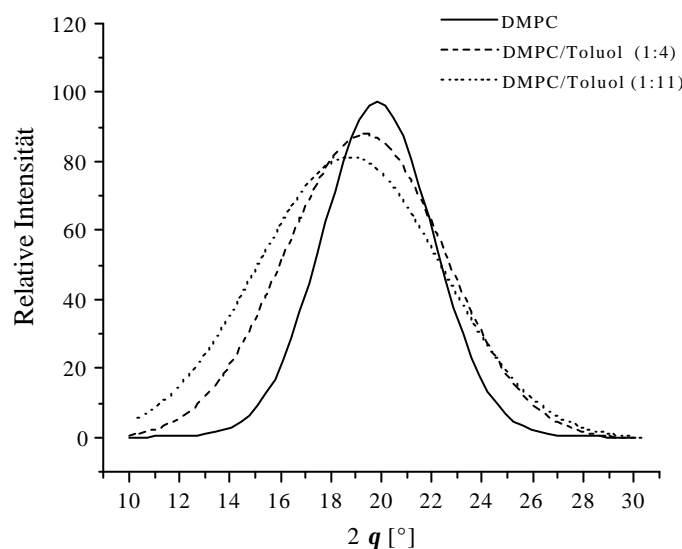


Abbildung 2-12: Intensität und Gestalt der Weitwinkelreflexe lamellarer Phasen von DMPC mit unterschiedlichen Konzentrationen an solubiliertem Toluol (Angabe entsprechend den Molverhältnissen) bei konstantem DMPC/Wasser-Verhältnis.

Die Bandenverbreiterung ist vermutlich eine direkte Folge der Zunahme der Fluktuationen der  $L_a$ -Phase infolge thermisch angeregter Undulationen. Dieses Phänomen ist typisch für Phasen geringer Dimensionalität, wobei die Intensität der gestreuten Strahlung durch ein Potenzgesetz beschrieben werden kann.

Für Wellenvektoren parallel ( $\parallel$ ) und senkrecht ( $\perp$ ) zu den Doppelschichten gilt [55]

$$I(q_{\perp} = 0, q_{\parallel}) \propto \frac{1}{|q_{\parallel} - q_o|^{2-h_c}} \quad (2.4)$$

sowie

$$I(q_{\perp}, q_{\parallel} = 0) \propto \frac{1}{q_{\perp}^{4-2h_c}}. \quad (2.5)$$

Hierbei bezeichnet  $q_o$  den Wellenvektor der entsprechenden Modulation. Der Exponent  $h_c$  berücksichtigt den Einfluß der elastischen Konstanten der Kompression  $B$  und der Krümmung  $k_c$  der Membran gemäß [56]

$$h_c \propto \frac{1}{\sqrt{Bk_c}}. \quad (2.6)$$

Dieses Potenzgesetz konnte für verschiedene lamellare Systeme bestätigt werden [57,56].

Die in Abbildung 2-12 dargestellte Verschiebung der Maxima der Banden zu kleinen Bragg-Winkeln weist auf die laterale Ausdehnung der Doppelschicht hin und kann ferner als eine Zunahme des lateralen Abstandes der Ketten der Amphiphile innerhalb der Doppelschicht interpretiert werden. Abbildung 2-13 zeigt die Zunahme der Bragg-Abstände des Weitwinkelbereichs als Funktion der Toluolkonzentration. Da die Interaktion des Solubilisats im lipophilen Bereich des Amphiphils erfolgt, sollte ebenfalls ein Anstieg des Packungsparameters  $P$  stattfinden. Oberhalb eines Molverhältnisses Toluol/DMPC von etwa 7 bleibt der Abstand konstant und es ist keinerlei signifikante Veränderung der Membrangeometrie in Form einer lateralen Ausdehnung detektierbar. Eine weitere laterale Ausdehnung führt vermutlich zum Auftreten hoher Grenzflächenspannungen im Bereich der Phasengrenze Öl/Wasser, so daß eine Solubilisierung nur noch im Kernbereich zwischen den beiden Monoschichten möglich ist. Das maximale Solubilisierungsvermögen der Doppelschicht sollte jedoch in diesem Bereich nahezu erreicht sein.



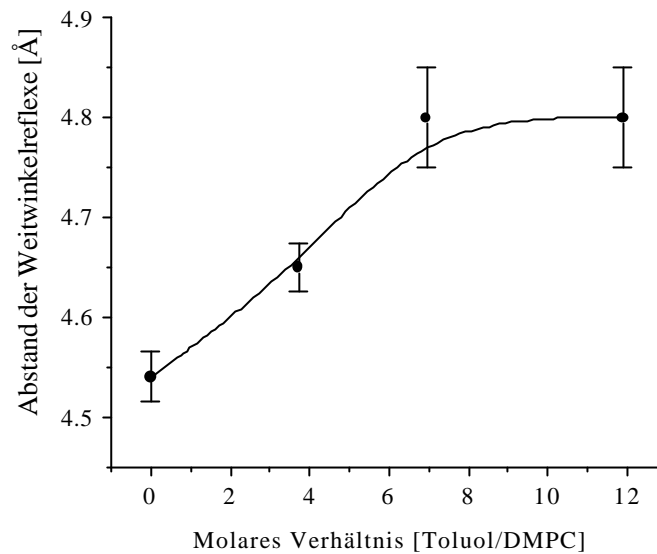


Abbildung 2-13: Verlauf des mittleren Kettenabstandes der Acylreste vollständig hydratisierter lamellarer Phasen von DMPC in Abhängigkeit von der eingelagerten Toluolmenge bei 25°C.

### 2.3.2 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Untersuchung lamellarer DMPC-Phasen mit Hilfe der Röntgenbeugung, daß die Membrangeometrie nach Solubilisierung von Toluol im lipophilen Membranbereich deutlich beeinflußt wird. Die Einlagerung bewirkt eine Quellung der Membran. Diese erfolgt lateral durch Wechselwirkung des Aromaten mit dem unpolaren Bereich der Acylreste. Die Interkalation des Solubilisats führt effektiv zu einer Erhöhung der inter- sowie intramolekularen Acyl-Acyl-Abstände. Weiterhin ist ein vertikales Ausweichen der Membran in die dritte Dimension im Bereich hoher Toluolkonzentration zu beobachten. Die Membrandicke  $d_1$  nimmt um etwa 1 nm (30 %) zu, wobei gleichzeitig eine laterale Ausdehnung der Doppelschicht zu beobachten ist. Dieses Ergebnis zeigt quantitativ eine gute Übereinstimmung mit Untersuchungen der Solubilisierung von Benzol in flüssig-kristallinen DLPC-Doppelschichten mit einem konstanten Wasseranteil von 70 Gew.-% [39].

## 2.4 Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der inneren Eigenschaften der Doppelschicht

Das Studium der Eigenschaften des lipophilen Bereichs der Doppelschicht von Vesikeln wird mit Hilfe hydrophober „Sondenmoleküle“ möglich, die entsprechende spektroskopische Aktivitäten aufweisen. Hierbei sollten die Wechselwirkungen der Sonden mit dem Amphiphil, wie auch die Konzentration an benötigter Reagenz möglichst klein und die Empfindlichkeit des Nachweises entsprechend groß sein. Zur Untersuchung verschiedener Eigenschaften der Doppelschicht von Vesikeln kommen aus diesem Grunde oftmals zur Fluoreszenz befähigte Chromophore zum Einsatz, die in geringer Konzentration in die Membran eingelagert werden können. Die Reagenzien zeigen ein spezifisches, von der jeweiligen Umgebung abhängiges charakteristisches Emissionsspektrum, das mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie in hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise können Informationen über die innere Struktur der Doppelschicht gewonnen werden. Ein häufig verwendetes Chromophor ist Pyren und die entsprechenden Pyrenderivate des Amphiphils [58]. Unter Verwendung dieser Fluoreszenzsonden lassen sich Permeabilitäten, Phasenumwandlungstemperaturen [59], Mikropolaritäten [60,61] sowie Mikroviskositäten [62] von Mizellen und Vesikeln bestimmen.

### 2.4.1 Monomerfluoreszenz von Pyren als Indikator für die Mikropolarität

Pyren dringt als unpolares Molekül in den lipophilen Bereich der Doppelschicht von Vesikeln ein und liegt dort unterhalb des Glycerinrückgrats in senkrechter Orientierung zur Membranebene vor [41]. Es weist eine im Vergleich zur Phospholipidmatrix hohe laterale Diffusionsgeschwindigkeit ( $D = 1.4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [63]), aber auch eine transversale Beweglichkeit auf. Nach Anregung mit Licht des ultravioletten Bereiches zeigt Pyren ein Emissionsspektrum mit einer charakteristischen Feinstruktur bestehend aus fünf Schwingungsbanden (I-V). Die relativen Intensitäten dieser Banden werden stark von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels beeinflusst [64]. Grund hierfür ist der „Ham-Effekt“ [65], die Verstärkung wenig wahrscheinlicher Übergänge im Bereich symmetrischer, aromatischer Moleküle durch polare Lösungsmittel unter Stabilisierung des angeregten Zustandes. Polare Lösungsmittel verstärken die Intensität des 0-0 Übergangs des Pyren bei  $\lambda = 373 \text{ nm}$  (Peak I), während der Übergang bei  $\lambda = 383 \text{ nm}$  (Peak III) nahezu unbeeinflusst bleibt [66] (vgl. Abbildung 2-14).

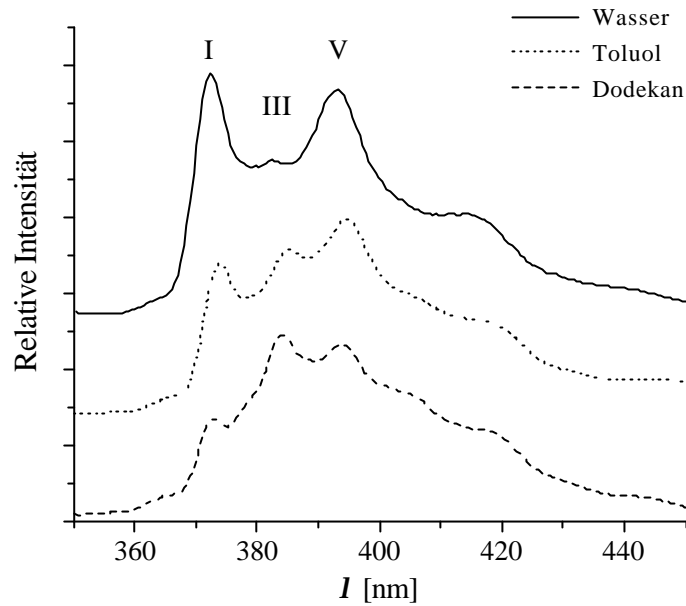


Abbildung 2-14: Vergleich der Monomerfluoreszenz von Pyren ( $c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  nach Anregung bei  $I_{\text{Anr.}} = 338 \text{ nm}$ . Das Verhältnis der Peaks I und III dient als Maß für die Polarität des Lösungsmittels. Die Peaks II und IV sind nicht aufgelöst.

Das Intensitätsverhältnis von Peak I zu Peak III dient somit zu qualitativen Abschätzung der Polarität des umgebenden Mediums (vgl. Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4: Intensitätsverhältnis  $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$  der Monomerfluoreszenz von Pyren in verschiedenen Lösungsmitteln und in der Doppelschicht von Vesikeln.

Lösungsmittel	$I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$
Wasser	1.56
Toluol	0.96
Dodekan	0.54
DMPC-Vesikel (MLV) ( $T < T_m$ )	1.13
DMPC-Vesikel (MLV) ( $T > T_m$ )	1.03

Tabelle 2-4 verdeutlicht den Unterschied des  $I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$ -Verhältnisses nach Einlagerung von Pyren in die Doppelschicht von Vesikeln. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß trotz des hohen Verteilungskoeffizienten von Pyren zwischen der Doppelschicht und der Wasserphase [67] ein gewisser Teil des Chromophors in der Wasserphase gelöst vorliegt. Die Pyrenfluoreszenz in der wäßrigen Phase ist jedoch im Vergleich zu der von solubilisiertem Pyren wesentlich stärker gequencht. Aus diesem Grunde kann der Betrag der Fluoreszenz des Pyren-Anteils in der Wasserphase am Spektrum vernachlässigt werden.

Die Solubilisierung in der Doppelschicht von Vesikeln bewirkt eine Änderung der molekularen Umgebung des Pyren. Diese ist jedoch nicht vergleichbar mit der eines entsprechenden Alkans. Grund hierfür ist, daß das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem des hygroskopischen Pyren innerhalb der Doppelschicht oftmals Wasserstoffbrückenbindungen mit eingelagertem Wasser ausbildet [61]. Ferner ist die Affinität von Pyren zum Kopfgruppenbereich in Phospholipidvesikeln im Gelzustand ( $T < T_m$ ) im Vergleich zu fluiden Vesikeln deutlich erhöht, so daß scheinbar höhere  $I_I/I_{III}$ -Verhältnisse ermittelt werden.

Das Intensitätsverhältnis von Peak I zu Peak III von Pyren im lipophilen Bereich der Doppelschicht von Vesikeln liefert Informationen über die Mikropolarität des lipophilen Membranbereichs. Diese sind zumeist qualitativer Natur und nicht ohne weiteres mit Polaritäten von Bulkphasen vergleichbar, liefern jedoch gute Hinweise auf die Struktur der Doppelschicht. Da die Intensität der Fluoreszenz temperaturabhängig ist, müssen vergleichende Messungen bei konstanter Temperatur und zur Vermeidung von Quenchungseffekten in Abwesenheit von Sauerstoff erfolgen.

Mit Hilfe dieser Methode sollte in der Folge der Einfluß eines flüssigen Solubilisats auf die Mikropolarität des lipophilen Bereichs der Doppelschicht von Vesikeln untersucht und qualitativ abgeschätzt werden. Hierzu wurde zunächst die Membran von Phospholipidvesikeln mit kleinen Konzentrationen von Pyren beladen, in Abwesenheit von Sauerstoff mit Toluol titriert und das Intensitätsverhältnis von Peak I zu Peak III der Monomerfluoreszenz ermittelt (vgl. Abbildung 2-15). Bei den Untersuchungen wurden sowohl Phospholipide im Gelzustand (DPPC), als auch im fluiden Zustand (DMPC) verwendet.

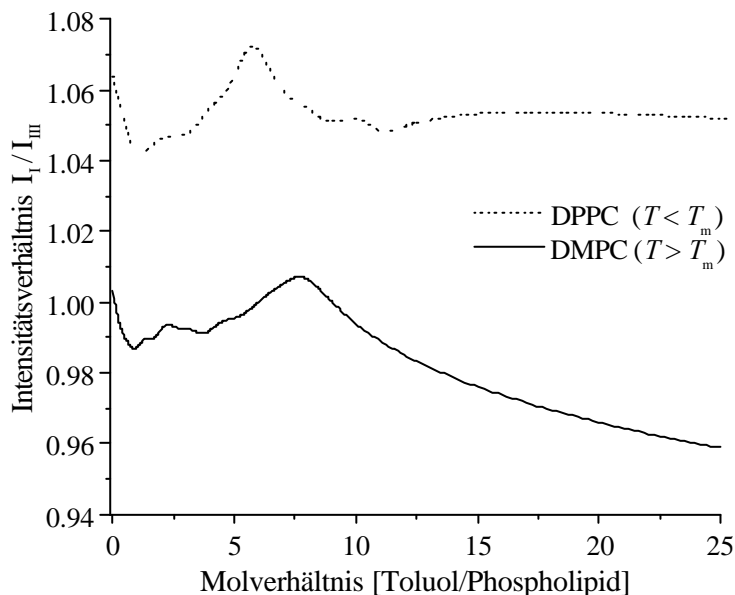


Abbildung 2-15: Verlauf der Intensitätsverhältnisse  $I_I/I_{III}$  der Monomerfluoreszenz von solubiliertem Pyren ( $c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in Phospholipidvesikeln ( $c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in Abhängigkeit von der eingelagerten Toluolmenge ( $I_{\text{Anr.}} = 338 \text{ nm}$  und  $T = 25^\circ\text{C}$ ).

Die Solubilisierung von Toluol im lipophilen Membranbereich bewirkt im Bereich kleiner Konzentrationen eine Abnahme des Intensitätsverhältnisses  $I_I/I_{III}$  und entsprechend der Mikropolarität (Abbildung 2-15). Durch den Einfluß von Toluol wird Wasser vermutlich zunehmend aus der Doppelschicht verdrängt und Pyren erhält eine vornehmlich lipophile Umgebung. Die Mikropolarität bleibt in der Folge bis zu einem Molverhältnis (Toluol/Phospholipid) von 5 nahezu konstant. Das Intensitätsverhältnis  $I_I$  zu  $I_{III}$  fungiert in diesem Fall als Indikator für die Kompaktheit der Kopfgruppe [60]. Bei weiterer Erhöhung der Solubilisatkonzentration kommt es zu einem Quellen der Membran, wobei die Integrität der Kopfgruppen zunehmend verloren geht. Wasser dringt in die Doppelschicht ein und führt zu einem Anstieg der Polarität [66]. Der erneute Abfall des Intensitätsverhältnisses  $I_I/I_{III}$  kennzeichnet den Bereich des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel, entsprechend einem Molverhältnis von etwa 8 bei DMPC (6 bei DPPC). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß es in diesem Konzentrationsbereich zur Phasenseparation von Toluol innerhalb der Doppelschicht der Vesikel kommt. Im Bereich der entstehenden Toluoldomänen kann zudem eine Anreicherung von Pyren beobachtet werden (Abbildung 2-16). Desweiteren konkurriert die Bildung von Emulsionstropfen unter Eintrübung der Dispersion mit der Solubilisierung in Vesikeln. Der Eintrag von Pyren in die Emulsionstropfen konnte ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden.



Abbildung 2-16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines DMPC-Vesikels ( $d = 10.2 \mu\text{m}$ ) nach Anregung im UV-Bereich. Das Bild verdeutlicht die Anreicherung von Pyren im Bereich phasenseparierten Toluols (heller Bereich) in der Doppelschicht.

#### 2.4.2 Excimerfluoreszenz von Pyren als Indikator für die Mikroviskosität

Pyren zeigt wie einige polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Lösung bei Erhöhung der Konzentration eine Abnahme der Intensität (Quantenausbeute) der Monomerfluoreszenz. Dieser Effekt wird als Konzentrationsquenchung bezeichnet. Er beruht auf der Bildung sogenannter Excimere, d.h. angeregter Dimere. Die Excimerbildung ist eine diffusionskontrollierte, bimolekulare Reaktion. Sie resultiert aus der Wahrscheinlichkeit, daß ein angeregtes Pyrenmolekül mit der Lebensdauer  $t$  eine Face-to-Face-Kollision mit einem Pyren im Grundzustand vollzieht. Dieser Prozeß konkurriert mit der Relaxation in

Form der Monomerfluoreszenz (vgl. Abbildung 2-17) sowie der strahlungslosen Desaktivierung.

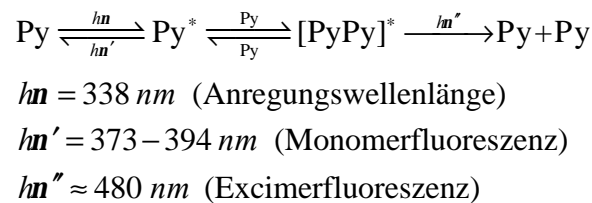


Abbildung 2-17: Fluoreszenzschema der Anregung von Pyren (Py) zum angeregten Molekül  $\text{Py}^*$  und anschließender Monomer- bzw. Excimerfluoreszenz nach Förster und Kasper [ 68]. Strahlungslose Desaktivierungen sind unberücksichtigt.

Die Excimerbildung hängt neben der Konzentration im wesentlichen vom Diffusionskoeffizienten  $D$  von Pyren und der Viskosität  $\eta$  des Lösungsmittels ab. Das Fluoreszenzspektrum weist ein charakteristisches strukturloses Band auf, welches im Vergleich zur violetten Monomerfluoreszenz bathochrom zu Wellenlängen von 450 nm bis 500 nm (blaue Fluoreszenz) verschoben ist.

Die Solubilisierung von Pyren im lipophilen Membranbereich führt zu einer lokal hohen Konzentration an Pyren und daraus folgend zu einer intensiven Excimerfluoreszenz. Das Verhältnis der Intensitäten der Excimer- zur Monomerfluoreszenz von solubiliertem Pyren gibt ferner Auskunft über Fluidität des lipophilen Bereichs der Doppelschicht. Hierbei sind die erhaltenen Werte eher qualitativer Natur, da lokale Anreicherungen von Pyren zu einer verstärkten Excimerfluoreszenz aufgrund statischer Mechanismen führen kann [69].

Die Analyse des Einflusses von Toluol auf die Mikrofluidität der Doppelschicht von DMPC-Vesikeln erfolgte unter sukzessiver Erhöhung der Toluolkonzentration (Abbildung 2-18).

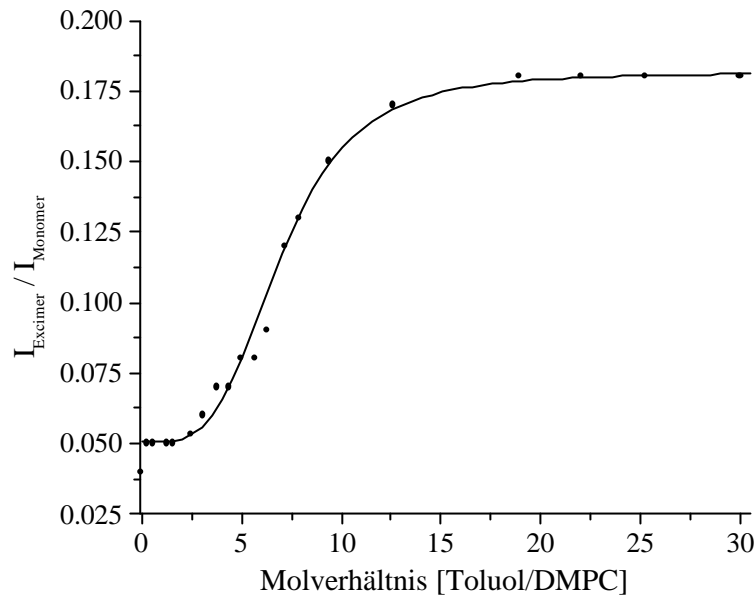


Abbildung 2-18: Intensitätsverhältnis der Excimer- zur Monomerfluoreszenz der Fluoreszenzsonde Pyren ( $c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in DMPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Toluolkonzentration ( $T = 25^\circ\text{C}$ ).

Abbildung 2-18 zeigt den Verlauf des Intensitätsverhältnisses der Excimer- zur Monomerfluoreszenz als Funktion des Molverhältnisses Toluol/DMPC. Das Verhältnis steigt bei Zugabe von Toluol an und weist in der Folge einen sigmoidalen Verlauf entsprechend einer nahezu konstanten Membranfluidität im Bereich kleiner Solubilisatkonzentrationen auf. Mit steigender Toluolkonzentration ist im Bereich des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel ein steiler Anstieg der Excimerfluoreszenz zu beobachten, bis sich im Bereich hoher Toluolkonzentration ein konstantes Verhältnis der Excimer- zur Monomerfluoreszenz einstellt. Die erhöhte Wahrscheinlichkeit der Excimerbildung ist ein deutlicher Indikator für die größere Beweglichkeit des Pyren und respektive die Erniedrigung der Mikroviskosität. Diese beruht im wesentlichen auf der Bildung von toluolreichen Bereichen innerhalb der Doppelschicht. Aus diesem Grund entspricht der Plateauwert bei hoher Solubilisatkonzentration dem Excimer- zu Monomerverhältnis einer Toluolemulsion in Abwesenheit von Phospholipidvesikeln (vgl. Abbildung 2-19).

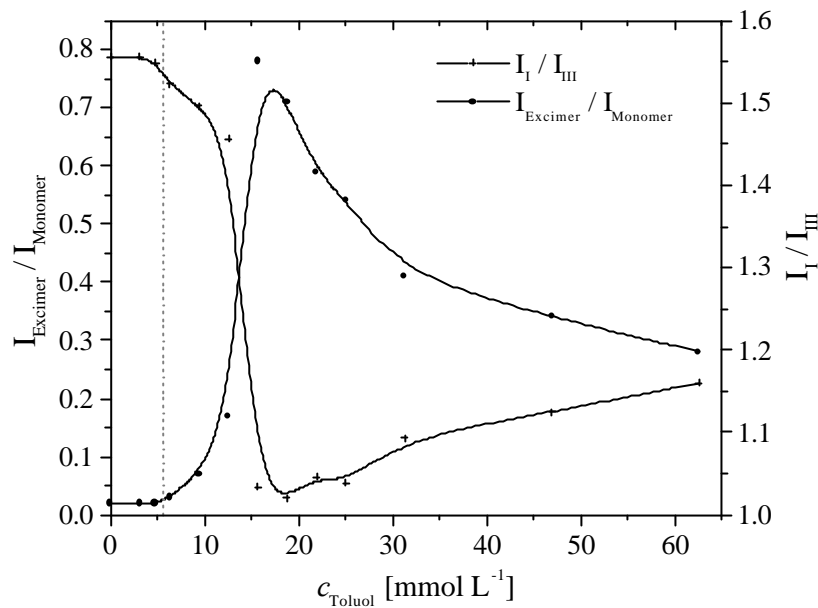


Abbildung 2-19: Intensitätsverhältnisse der Pyrenfluoreszenz nach Titration einer wässrigen Lösung von Pyren ( $c = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) mit Toluol in Abwesenheit eines Amphiphils bei  $I_{\text{Anr.}} = 338 \text{ nm}$  und  $T = 25^\circ\text{C}$ . Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze der Wasserlöslichkeit des Toluol, wobei bei einer Erhöhung der Toluolkonzentrationen die Bildung einer O/W-Emulsion beobachtbar wird.

### 2.4.3 Zusammenfassung

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Solubilisierung von Toluol erfolgten unter Verwendung von Pyren als „Fluoreszenzsonde“. Diese Untersuchungen zeigen eine veränderte Polarität im inneren Membranbereich mit steigender Toluolkonzentration, ein Effekt, der auf das Eindringen von Wasser in den lipophilen Membranbereich hindeutet. Hierdurch wird die abnehmende Kompaktheit der Kopfgruppe unter dem Einfluß des lipophilen Solubilisats bestätigt. Desweiteren führt die Bildung toluolreicher Bereiche innerhalb der Vesikel zu einem deutlichen Anstieg der lateralen Mobilität der „Fluoreszenzsonde“ innerhalb der Doppelschicht. Im Bereich hoher Toluolkonzentration wird die Interpretation der Ergebnisse schwierig, da Phasenseparation innerhalb der Doppelschicht auftreten und die Bildung einer O/W-Emulsion konkurriert.