

5 Kinetische Untersuchungen zur Solubilisierung

In den vorangehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, inwieweit die physiko-chemischen und die mechanischen Eigenschaften von Vesikeln vom Verhältnis Amphiphil und lipophilem Solubilisat abhängen. Die Untersuchungen erfolgten im wesentlichen unter Gleichgewichtsbedingungen. Im folgenden soll der Schwerpunkt auf Nichtgleichgewichtsbedingungen gelegt werden, die für zahlreiche technische Anwendungen von Bedeutung sind. Die Kenntnis der Kinetik der Solubilisierung beispielsweise ist bei bekanntem Solubilisationsvermögen für eine Vielzahl von Waschprozessen [131], der tertiären Erdölförderung [12] bis hin zu Problemen der Sanierung kontaminierter Böden [13] essentiell.

Die Untersuchungen beruhen auf videomikroskopischen Methoden und gliedern sich in zwei Bereiche. Im ersten erfolgt die Untersuchung der Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in einzelne unilamellare Vesikel und die Analyse der damit verbundenen strukturellen Veränderungen des Assoziationskolloids aufgrund des diffusiv eingetragenen lipophilen Solubilisats. Im zweiten Bereich wird der Fokus auf die eigentliche Solubilisierung im Sinne der Erhöhung der Löslichkeit schwer- oder unlöslicher Substanzen gelegt. Hierzu erfolgten Untersuchungen der Solubilisierungsrate von wasserunlöslichen Ölen in einem Überschuß einer homogenen Vesikeldispersion. In beiden Teilen wurden ausschließlich passive, d.h. auf der Brown'schen Molekularbewegung beruhende Transportprozesse betrachtet.

5.1 Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Vesikelmembran

Die Untersuchung der Dynamik des Einbaus lipophiler Solubilisate in die Doppelschicht einzelner unilamellarer Vesikel erfolgte in Form von Diffusionsexperimenten unter Verwendung von Toluol als lipophilem Solubilisat. Die noch signifikante Wasserlöslichkeit von Toluol ($515 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 20°C [132]) erlaubt den diffusiven Transport über die Wasserphase in den lipophilen Doppelschichtbereich von Vesikeln in einem für die Beobachtung angemessenen Zeitrahmen. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden in einer in Abbildung 5-1 dargestellten, geschlossenen Küvette unter Verwendung einzelner, zunächst unbelasteter DMPC-Vesikel über einen Zeitraum von mehreren Stunden durchgeführt.

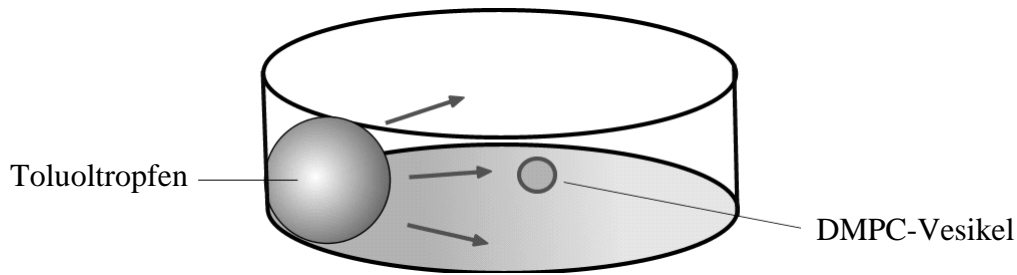


Abbildung 5-1: Schematische Versuchsanordnung des Diffusionsexperimentes. Die dargestellte Mikroküvette enthält eine verdünnte wässrige Vesikeldispersion ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), in die ein Toluoltropfen eingebracht wird. Anschließend wird der diffusive Eintrag in ein einzelnes unilamellares DMPC-Vesikel mikroskopisch als Funktion der Beobachtungszeit analysiert.

Mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung ist eine zeitgleiche Analyse der elastischen Konstanten k_c und \bar{s} sowie geometrischer Parameter wie der Vesikelfläche A , der Überschußfläche Δ und des Äquivalentradius r_0 möglich. Weiterhin wurden visualisierbare strukturelle Veränderungen im Membranbereich der Vesikel untersucht. Der typische Verlauf des Moduls der Biegesteifigkeit k_c eines einzelnen Vesikels ist als Funktion der Beobachtungszeit in Abbildung 5-2 dargestellt. Die deutliche Abnahme von k_c zeigt unter Berücksichtigung der Ergebnisse der statischen Experimente aus Kapitel 4, daß ein diffusiver Eintrag von Toluol in den Membranbereich erfolgt ist. Nach etwa zwei Stunden wird ein Plateauwert erreicht. Der zeitliche Verlauf beruht im wesentlichen auf der Diffusionsgeschwindigkeit von Toluol in Wasser ($D = 0.92 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [133]).

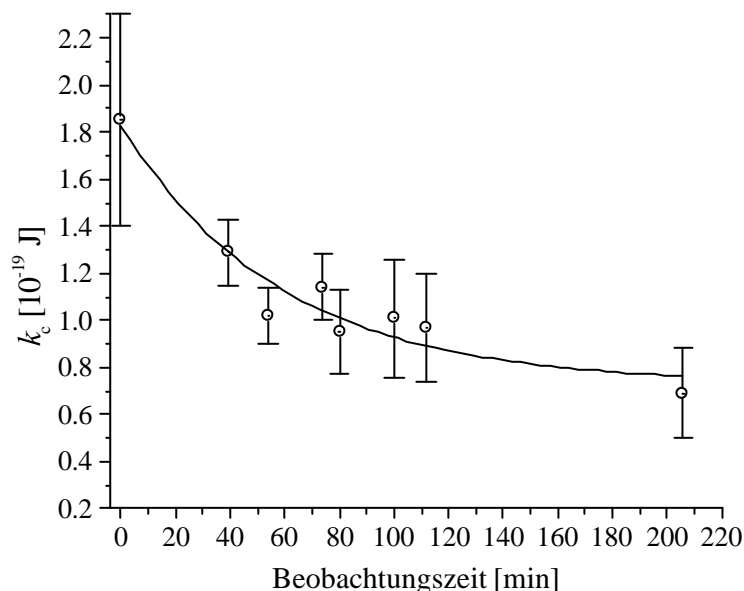


Abbildung 5-2: Zeitliche Abnahme der Biegesteifigkeit k_c durch Diffusion von Toluol in den lipophilen Membranbereich eines riesigen unilamellaren DMPC-Vesikels bei konstanter Temperatur von $31.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Die Biegesteifigkeit zur Zeit $t < 0$ entspricht der zum Zeitpunkt $t = 0$. Die jeweilige Meßzeit betrug etwa 3 Minuten pro Meßpunkt.

Die Analyse der Vesikelgeometrie während des Diffusionsprozesses zeigt, daß der äquivalente Radius r_0 einer entsprechenden Sphäre gleichen Volumens V im Beobachtungszeitraum im Rahmen des Meßfehlers mit $r_0 = 9.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ konstant bleibt. Gemäß

$$V = \frac{4}{3}\pi r_0^3 \quad (5.1)$$

ist somit eine Volumenkonstanz des Vesikels gewährleistet. Hierbei ist anzumerken, daß dennoch eine Diffusion von Toluol in das innere wäßrige Vesikelvolumen zu erwarten ist. Die entsprechende Volumenänderung ist jedoch klein und mit der hier vorgestellten Methodik nicht auflösbar. Die Permeation lipophiler Substanzen durch die Lipiddoppelschicht ist ein vergleichsweise schneller Prozeß. Entsprechend sollten sich auftretende Konzentrationsgradienten von Toluol zwischen der äußeren Bulkphase und dem inneren Vesikelvolumen unverzüglich ausgleichen. Ein Einfluß osmotischer Effekte sowie ein resultierendes Druckgefälle zwischen dem Vesikelinneren und der äußeren Phase kann somit vernachlässigt werden, so daß der zeitliche Verlauf der Biegesteifigkeit vermutlich einzig auf der Solubilisierung von Toluol beruht.

Neben der Volumenkonstanz ist ein deutlicher Anstieg der Vesikelfläche A um $\Delta A / A \approx 10\%$ mit steigender Diffusionszeit und eine hierdurch bedingte zunehmende Entfernung von der Geometrie einer Sphäre zu beobachten. Letzteres spiegelt sich ebenfalls im Abfall der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ (vgl. Abbildung 5-3) wieder.

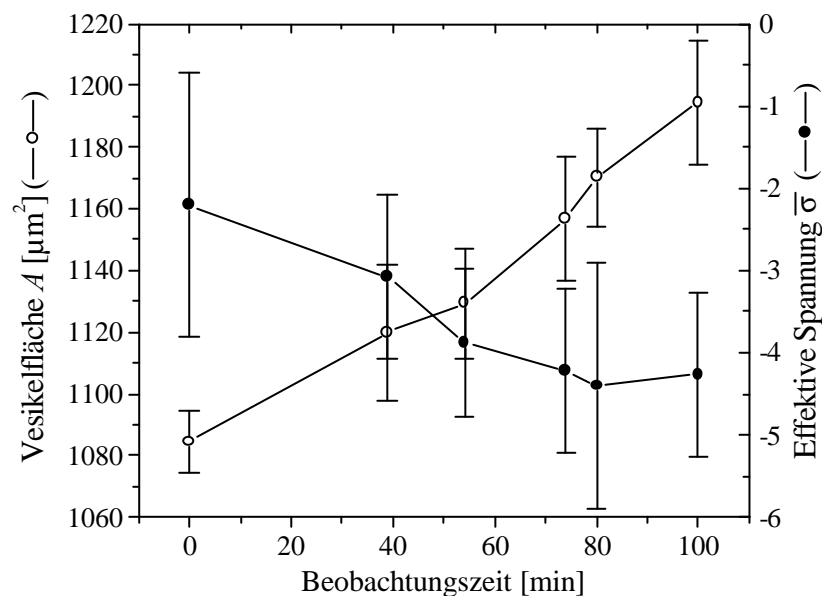


Abbildung 5-3: Änderung der Vesikelfläche A und der effektiven Spannung $\bar{\sigma}$ eines unilamellaren DMPC-Vesikels durch Diffusion von Toluol in den lipophilen Bereich der Doppelschicht.

Der Flächenzuwachs ΔA ist letztendlich eine Folge der Einlagerung von Toluol in den lipophilen Bereich der Doppelschicht. Diesbezüglich stellt sich jedoch die Frage, ob die Solubilisierung einzig auf der beobachteten lateralen Ausdehnung der Membran beruht oder ein dreidimensionales Problem unter gleichzeitiger Variation der Dicke der Doppelschicht darstellt. Da entsprechende Dickenänderungen der Membran weit unterhalb des Auflösungsvermögens der verwendeten Methode liegen, kann ein Nachweis nur auf indirektem Wege erfolgen. Hierzu wird zunächst eine Abschätzung der maximal solubilisierbaren Toluolmenge entsprechend dem Flächenzuwachs ΔA unter Annahme einer konstanten Dicke d der Doppelschicht von 3.5 nm während des gesamten Solubilisierungsprozesses vorgenommen. Das maximal verfügbare Membranvolumen resultiert näherungsweise aus dem freien Volumen innerhalb der lipophilen Doppelschicht und dem zusätzlichen Volumen $\Delta V = \Delta A \cdot d$, welches aus dem Flächenzuwachs ΔA folgt. Das freie Volumen ist insbesondere im fluiden Zustand nicht vernachlässigbar, da die Acylketten eine Vielzahl von gauche-Konformeren aufweisen.

Die Stoffmenge Phospholipid n_{DMPC} des Vesikels ist bei Annahme eines Platzbedarfs a von 0.65 nm^2 pro DMPC-Molekül [23] mit der Avogadro-Zahl N_A gegeben durch

$$n_{DMPC} = \frac{2A_0}{a} \cdot N_A \cdot \quad (5.2)$$

Hierbei entspricht A_0 der Vesikelfläche der solubilisatfreien Doppelschicht zum Zeitpunkt $t = 0$. Das gesamte für die Solubilisierung zur Verfügung stehende Volumen V_s innerhalb der Doppelschicht folgt mit dem Volumen der Doppelschicht V_t zu einem Zeitpunkt t

$$V_s = V_t - (n_{DMPC} \cdot M_{DMPC} \cdot \bar{v}_{DMPC}), \quad (5.3)$$

mit \bar{v}_{DMPC} dem spezifischen Volumen von DMPC mit $0.970 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ [134].

Die solubilierte Stoffmenge n_{Toluol} ist durch das Molvolumen V_m von Toluol gegeben, gemäß

$$n_{Toluol} = \frac{V_s}{V_m}. \quad (5.4)$$

Somit kann bei gegebener Dicke der Doppelschicht d die eingelagerte Toluolmenge und das Molverhältnis Toluol/DMPC abgeschätzt werden.

Zwischen der Biegesteifigkeit der Vesikelmembran und dem Molverhältnis Toluol/DMPC besteht gemäß den experimentellen Ergebnissen aus Kapitel 4 ein direkter Zusammenhang. Aus diesem Grunde ist das reale Molverhältnis zum Zeitpunkt t aus der Biegesteifigkeit in Abbildung 5-2 bestimmbar. In der Folge können diese experimentellen Ergebnissen mit den theoretischen Abschätzungen aus den geometrischen Veränderungen verglichen werden. Das Resultat ist in Abbildung 5-4 dargestellt.

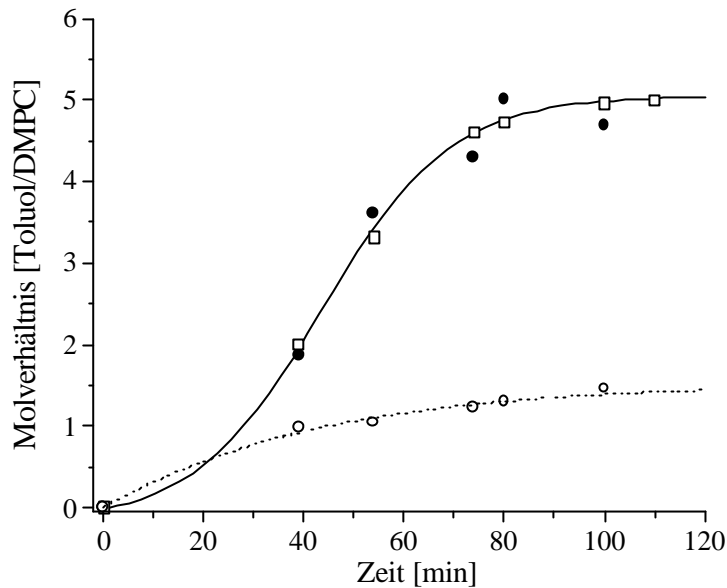


Abbildung 5-4: Vergleich der Molverhältnisse Toluol/DMPC innerhalb der Doppelschicht eines DMPC-Vesikels als Funktion der Diffusionszeit: Experimentelle Werte bestimmt aus den Biegesteifigkeiten (●), theoretische Abschätzung aus den geometrischen Änderungen unter Annahme konstanter Dicke $d = 3.5$ nm (○), sowie unter Berücksichtigung des Anstiegs der Dicke der Doppelschicht (□) (Erläuterungen im Text).

Der Vergleich zeigt, daß die theoretischen Molverhältnisse in Abbildung 5-4 unter der Annahme konstanter Dicke der Doppelschicht von 3.5 nm deutlich niedriger als die experimentell ermittelten sind. Diese Diskrepanz läßt sich folglich nur durch eine dreidimensionale Veränderung der Membrangeometrie unter gleichzeitiger Zunahme der Dicke der Doppelschicht erklären. Hierbei kann eine Erhöhung der effektiven Kettenlänge des Amphiphils angenommen werden, ein Effekt, der ebenfalls bei der Solubilisierung kurzkettiger n -Alkane diskutiert wird [135]. Die Vergrößerung der Dicke d der Doppelschicht von 3.5 nm auf 5 nm liefert eine gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten (vgl. Abbildung 5-4). Diese Dickenzunahme entspricht den Ergebnissen der Röntgenbeugungsexperimente nach Einlagerung von Toluol in lamellare DMPC-Phasen (vgl. Kapitel 2.3). Folglich führen theoretische Abschätzungen der Solubilisierung lipophiler Substanzen in DMPC-Vesikeln bei Annahme einer konstanten Dicke der Doppelschicht [134] zu einer Unterbestimmung des möglichen Solubilisierungsvermögens.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Solubilisierung von Toluol in Form einer palisadenartigen Einlagerung (vgl. Abbildung 5-5 (b)) unter lateraler Ausdehnung der Doppelschicht erfolgt. Gleichzeitig steigt die effektive Länge der Acylketten und entsprechend die Dicke der Doppelschicht bei konstantem inneren wäßrigen Volumen des Vesikels an.

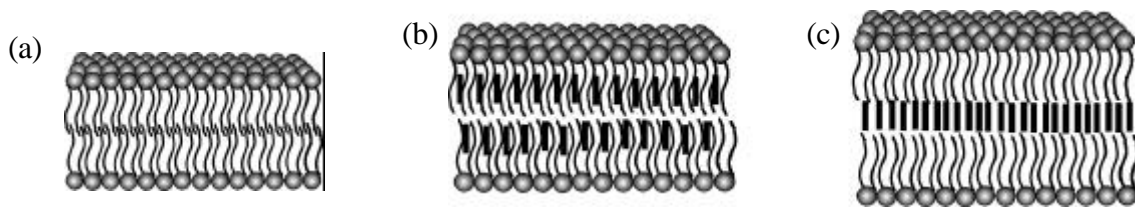


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung der möglichen Lokalisierung eines lipophilen Solubilisats (dunkle Balken) in DMPC-Doppelschichten [136]: (a) unbeladene Doppelschicht, (b) Palisaden-Typ und (c) Kern-Typ.

Die Integrität der Doppelschicht bleibt während dieses Aufquellprozesses erhalten, wobei der effektive Platzbedarf des Amphiphils im Kopfgruppenbereich entsprechend dem Zuwachs der Gesamtfläche ebenfalls um etwa 10 % zunimmt. Eine weitere Zunahme sollte aufgrund des möglichen Eindringens von Wasser in den lipophilen Bereich zu erhöhten Grenzflächenspannungen führen.

Eine Einlagerung des Solubilisats zwischen den Monoschichten der Doppelschicht gemäß Abbildung 5-5 (c) wird vermutlich erst für Solubilisatkonzentrationen nahe des maximalen Solubilisierungsvermögens der Vesikel beobachtet. Hierdurch kommt es zu der beschriebenen mikroskopisch visualisierbaren Dickenzunahme der Membran (vgl. Abbildung 4-24).

Die laterale Ausdehnung der Membranfläche ΔA erfolgt im wesentlichen bei konstantem inneren Volumen V . Aus diesem Grunde steigt die Überschußfläche Δ an. Die geometrischen Parameter Δ und V können durch das reduzierte Volumen V_{red} in Beziehung gesetzt werden. Dieses kennzeichnet das Verhältnis des tatsächlich eingeschlossenen Volumens zu dem einer Sphäre des Radius r_0 gemäß

$$V_{red} = \frac{V}{\frac{4}{3}\pi r_0^3} = (1 + \Delta)^{\frac{3}{2}}. \quad (5.5)$$

Das Vesikel gewinnt Überschußfläche unter Abnahme des reduzierten Volumens (Abbildung 5-6). Hierdurch bedingt erfolgt demnach die Änderung der Vesikelgestalt.

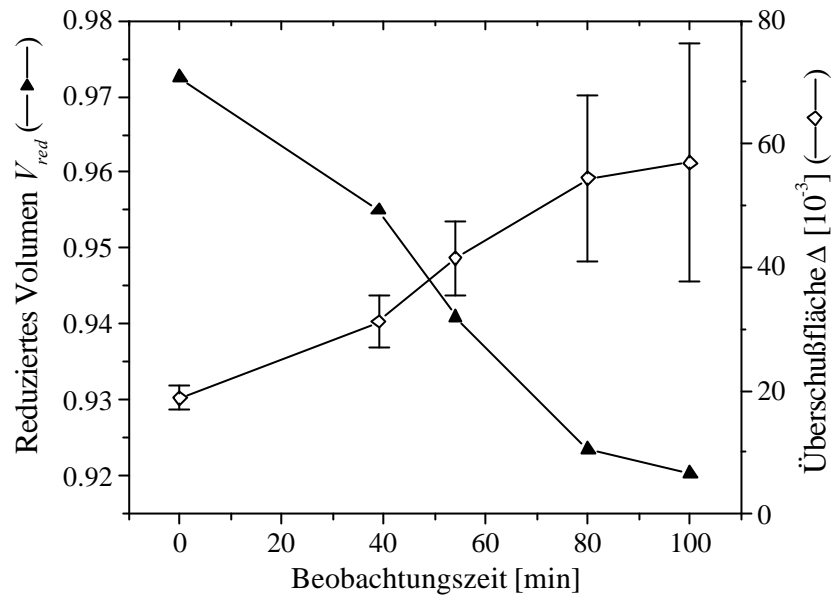


Abbildung 5-6: Verlauf der geometrischen Parameter als Funktion der Beobachtungszeit eines unilamellaren DMPC-Vesikels nach Diffusion von Toluol in den lipophilen Membranbereich.

5.1.1 Gestaltänderungen während der Solubilisierung

Die Vesikelmorphologie wird ferner durch Unterschiede der Flächen der inneren und der äußeren Monoschicht der Doppelschicht bestimmt. Aus diesem Grunde sollte eine Analyse der Vesikelgestalt während der Diffusion weiterhin Informationen über die bevorzugte Solubilisierung in den einzelnen Monoschichten liefern. Abbildung 5-7 zeigt eine typische Gestaltänderung. Diese erfolgt zunächst in Form einer elliptischen Deformation. Nach etwa 140 Minuten wird ein Übergang in eine in Bezug auf die horizontale Achse nicht-achsensymmetrische Gestalt beobachtet. Die resultierende „seesternförmige“ Struktur weist Bereiche unterschiedlicher Krümmung auf, so daß eine unsymmetrische Einlagerung des Solubilisats in den einzelnen Monoschichten zu erwarten ist.

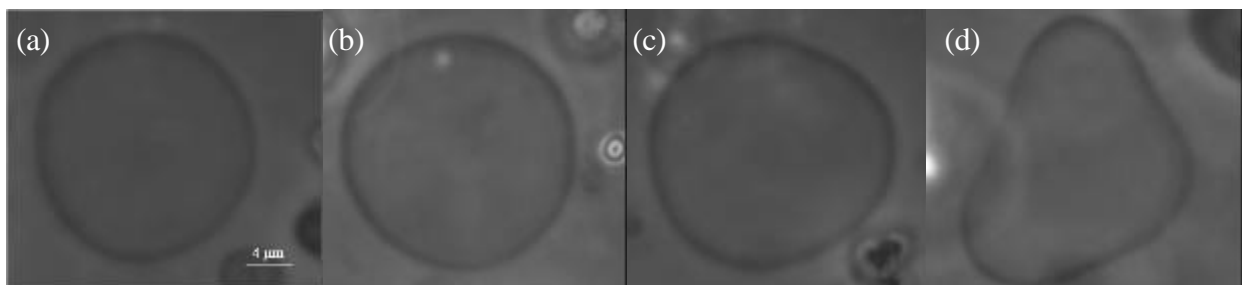


Abbildung 5-7: Unilamellares DMPC-Vesikel mit steigendem Anteil an Toluol innerhalb der lipophilen Doppelschicht. Die Bilder entsprechen einer zeitlichen Abfolge von jeweils 70 Minuten bei konstanter Temperatur von 31.5°C.

5.1.2 Domänenbildung und Knospung der Vesikelmembran

Der Eintrag von Toluol in unilamellare Vesikel führt nicht ausschließlich zur Bildung seesternförmiger Strukturen. Es konnten durchaus Unterschiede in den resultierenden Formen beobachtet werden, so daß angenommen werden kann, daß letztendlich die Vesikelstruktur vor der Solubilisierung prägend ist.

In dem in Abbildung 5-8 dargestellten Beispiel eines Diffusionsexperimentes deutet die Gestaltänderung zunächst auf eine homogene Einlagerung von Toluol hin. Aufgrund der lateralen Ausdehnung der Doppelschicht kommt es zu einer elliptischen Deformation der sphärischen Vesikelstruktur. Im Verlauf der Diffusion von Toluol in die Doppelschicht erfolgt jedoch eine Knospung eines kleinen Vesikels in das Innere der Struktur. Bei diesem Knospungsphänomen handelt es sich vermutlich um ein „domäneninduziertes Knospen“, dessen Ursache in der Bildung einer toluolreichen Phase innerhalb der Doppelschicht zu suchen ist.

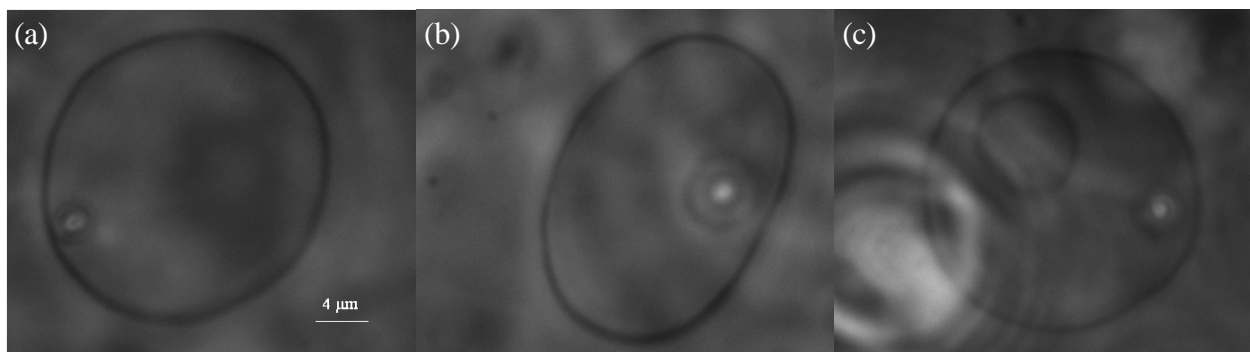


Abbildung 5-8: Änderung der Gestalt eines DMPC-Vesikels unter dem Einfluß von Toluol nach diffusivem Eintrag in die Doppelschicht. Das nahezu sphärische Vesikel (a) zeigt eine elliptische Verformung (b) und eine anschließende Knospung (c). Die Bildung der Knospe erfolgt im Bereich minimaler Membrankrümmung.

Die bereits diskutierte Koexistenz einer toluolreichen neben einer toluolarmen Phase könnte die Ursache derartiger Knospungsphänomene sein. Entmischungsprozesse in zweidimensionalen Systemen reduzieren die Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen auf eine Linienspannungen. Hierdurch wird oftmals eine erniedrigte Triebkraft zur vollständigen Entmischung beobachtet. Ein möglicher Grund für die Stabilisierung sind die unterschiedlichen Krümmungen der Amphiphile im Bereich der Phasengrenze [137]. In einigen Fällen kann eine Koexistenz zweier Phasen auf mikroskopischer Ebene beobachtet werden, wobei Gel-Fluid-Systeme über mehrere Wochen stabil sind [138].

Die Koexistenz unterschiedlicher Phasen innerhalb einzelner Vesikel hat eine Domänenbildung einer Phase B in der umgebenden Phase A zur Folge. Aufgrund des unterschiedlichen Platzbedarfs von Kopfgruppe und lipophilem Bereich kommt es zu unterschiedlichen Packungen innerhalb der Vesikel und zu einer Kopplung zwischen der Zusammensetzung

und der Vesikelgestalt. Die im Bereich der Domänengrenzen auftretenden Linienspannungen können minimiert werden, falls die Domänen knospen und in Form sogenannter „Buds“ separiert werden. Bei wachsender Größe der Domänen steigt somit der Betrag der Linienspannung. Erreicht die Domäne eine kritische Größe, so wird ein „domäneninduziertes Knospen“ ermöglicht (Abbildung 5-9).

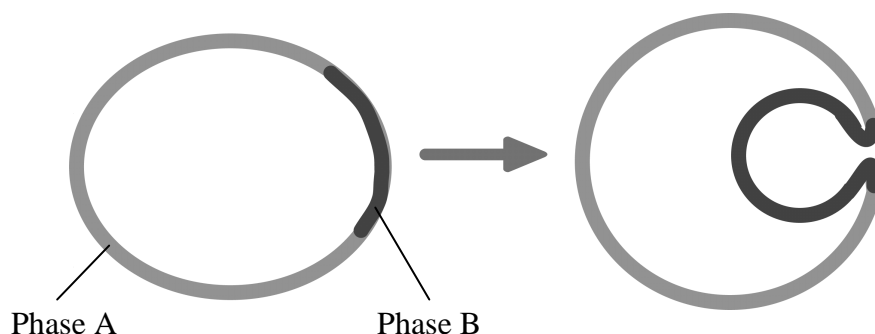


Abbildung 5-9: Prinzip der Erniedrigung der Grenzflächenenergie einer Phase B und einer Phase A eines sphärischen Vesikels. Die Minimierung der Grenzfläche erfolgt durch Knospung („Budding“) unter Ausbildung eines kleinen „B-reichen“ Vesikels, welches über einen schmalen Hals mit dem „Muttermesikel“ verbunden bleibt. Eine Ursache der bevorzugten Abschnürung in Richtung der konkaven Seite kann beispielsweise ein Überschuss an Molekülen in der inneren Monoschicht des Vesikels sein.

Während Phasenseparationen in kristallinen Materialien in Form von Nukleationsprozessen erfolgen, dominiert in Lipiddoppelschichten vermutlich die spinodale Entmischung [137]. Theoretische Berechnungen von Phasendiagrammen ergaben zwei mögliche Arten von stabilen Domänen [139], die experimentell bestätigt werden konnten [140]. Streifenartige Domänen werden für Membranen mit Gel-Fluid-Koexistenzen beobachtet, während kreisförmige Domänen im Falle der Entmischung zweier fluider Phasen auftreten.

Ein weiteres in diesem Zusammenhang interessantes, jedoch nicht reproduzierbares Beispiel ist in Abbildung 5-10 dargestellt. Das beobachtete undulierende Vesikel zeigt eine Vielzahl von Knospen, deren mögliche Ursache in der spinodalen Entmischung und anschließenden Knospung der toluolreichen Bereiche liegen könnte.

Aus Abbildung 5-10 kann die Linienspannung G aus der Größe der Knospen gemäß [141]

$$G = \frac{8k_c}{r_{Bud}} \quad (5.6)$$

abgeschätzt werden. Für das Beispiel in Abbildung 5-10 folgt $G = 3.9 \cdot 10^{-13} \text{ J} \cdot \text{m}^{-1}$. Die ermittelte Linienspannung ist folglich geringfügig niedriger als diejenige von Phospholipid/Cholesterin-Mischungen mit $G \approx 1 \cdot 10^{-12} \text{ J} \cdot \text{m}^{-1}$ [142].

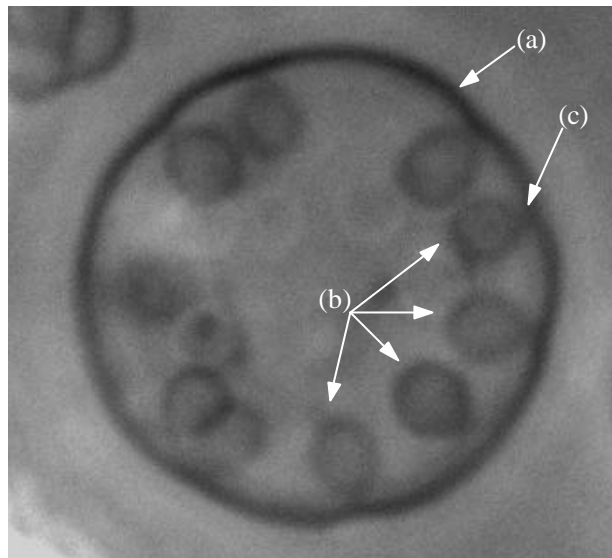


Abbildung 5-10: Unilamellares DMPC-Vesikel ($r_{\text{Vesikel}} = 17.6 \mu\text{m}$) nach Solubilisierung von Toluol (80 Mol-%). Die Membran (a) weist symmetrisch angeordnete Knospen (b) auf, die in das wäßrige innere Kompartiment der Struktur ragen und über die gesamte Vesikelfläche verteilt sind. Die Knospen sind über einen schmalen Hals (c) mit der äußeren Membran verbunden und haben nahezu identische Größen ($r_{\text{Bud}} = 2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Das Vesikel zeigt thermisch angeregte Undulationen mit einer Biegesteifigkeit $k_c = (1.13 \pm 0.15) \text{ J}$ und einer effektiven Spannung von $\bar{\sigma} = 12.5 \pm 4.5$, die den unilamellaren Charakter bestätigen.

5.1.3 Krümmungsinduziertes Domänenwachstum

Die Solubilisierung führt im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen zum Anstieg der effektiven Spannung der Membran. Hierdurch bedingt, werden, wie bereits diskutiert, thermisch bedingte Fluktuationen unterdrückt. Neben Knospungserscheinungen erfolgt eine Phasenseparation des Solubilisats unter Ausbildung mikroskopisch visualisierbarer Toluoldomänen innerhalb der Doppelschicht einzelner Vesikel. Die Phasenseparation tritt bei nahezu toluolgesättigter Wasserphase auf und resultiert allein aus dem molekularen Stofftransport von Toluol über die Wasserphase in den lipophilen Bereich der Doppelschicht. Sie erfolgt bevorzugt im Bereich hoher Membrankrümmungen, welche im Halsbereich von Knospen zu finden sind (vgl. Abbildung 5-11) und sollte somit die Folge eines verminderten Laplace-Drucks in dieser Region sein.

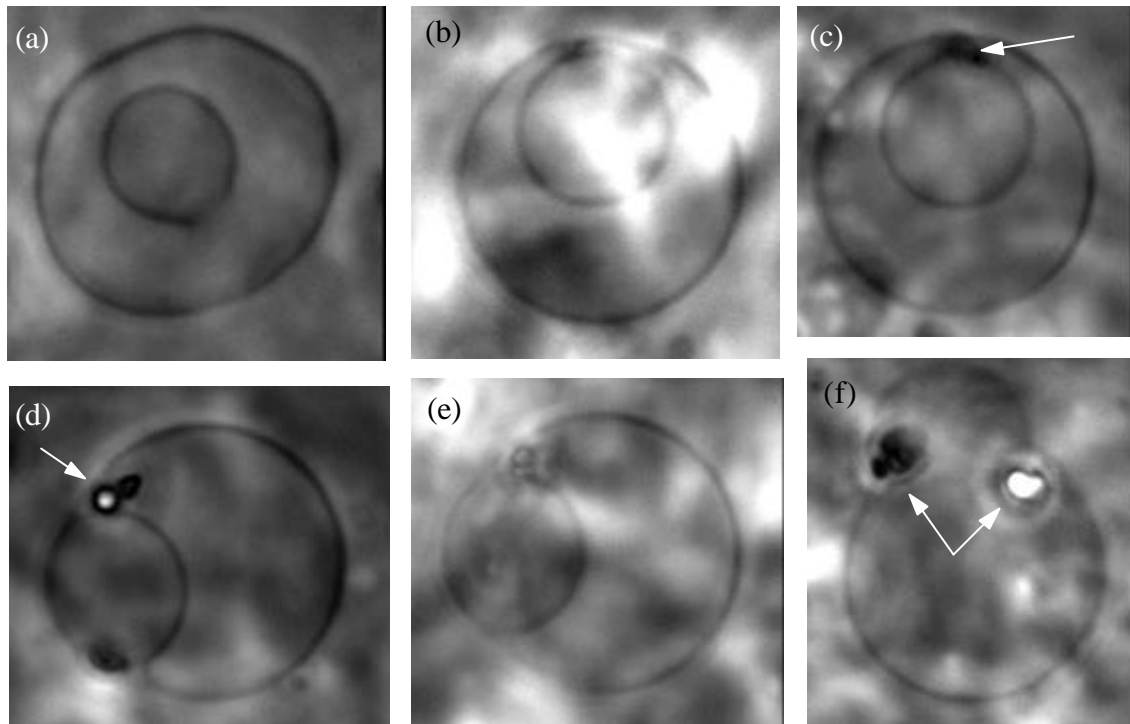


Abbildung 5-11: (a) DMPC-Vesikel mit Knospe nach Solubilisierung von Toluol. Im Verlauf der Diffusion des Solubilisats in die lipophile Doppelschicht kommt es zur tropfenförmigen Phasenseparation von Toluol im Bereich hoher Membrankrümmung (c). Die Toluolphase wächst an und verursacht ungewöhnliche Umlagerungen der Membran (d)-(f). Innerhalb der Vesikelstruktur koexistieren hierbei separate Überschussphasen des Solubilisats (f), Markierung mittels Pfeilen.

Im Halsbereich der Knospe ist die Packung der Lipide aufgrund der hohen Krümmungen stark gestört und weist im lipophilen Bereich eine große Anzahl von Defekten auf. Diese führen zu einer Anreicherung des lipophilen Solubilisats, so daß es hier zu verstärkten Segregationen kommen kann. Die visualisierbare Überschussphase von Toluol in der Membran stört ihrerseits die umgebende Amphiphilpackung und wirkt als Senke für weiteres Toluol; der entstandene Tropfen wächst an.

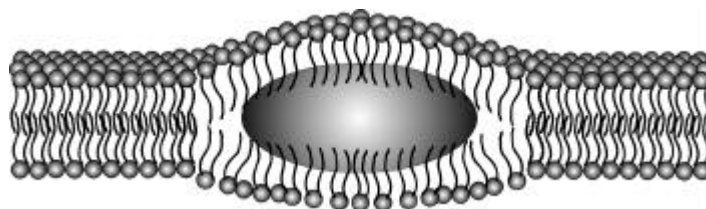


Abbildung 5-12: Schematische Darstellung einer ölreichen Domäne innerhalb der Doppelschicht. Die Ölphase ist umgeben von einem Halo von Amphiphilen mit gestörter Packung, so daß dieser Bereich wiederum als Senke für die Anreicherung weiterer lipophiler Substanzen wirken kann.

Interessanterweise kann die Koexistenz verschiedener ölreicher Domänen innerhalb einzelner Vesikel beobachtet werden, obwohl die erhöhte Linienspannung zu einer Aggregation der einzelnen Domänen führen sollten. Eine mögliche Erklärung ist die von Mountford und Wright postulierte Stabilisierung derartiger Domänen durch Bildung inverser mizellarer Anordnungen des Amphiphils an den Randbereichen [143]. Eine derartige Konstellation sollte ferner aufgrund des stark erhöhten Packungsparameters P unter dem Einfluß des Solubilisats begünstigt werden.

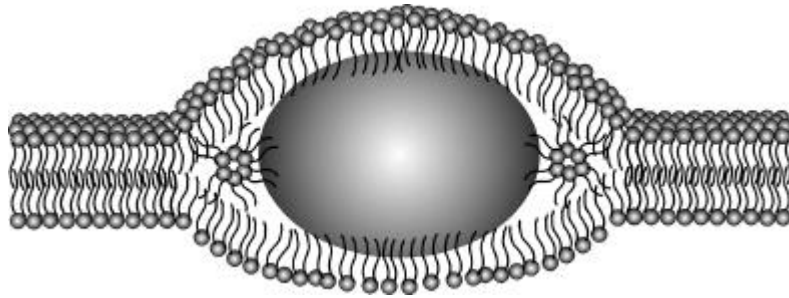


Abbildung 5-13. Mögliche Anordnung der Phospholipide an der Grenzfläche einer Domäne eines lipophilen Solubilisats. Durch die Ausbildung inverser Mizellen erfolgt eine Stabilisierung der Domäne innerhalb der Lipiddoppelschicht.

5.1.4 Zusammenfassung

Die Diffusion einer begrenzt wasserlöslichen Substanz wie Toluol erlaubt den Eintrag in die Doppelschicht von Phospholipidvesikeln. Die Solubilisierung von Toluol in unilamellaren DMPC-Vesikeln erfolgt hierbei zunächst in Form einer palisadenförmigen Einlagerung im Zwischenlipidbereich. Diese bedingt eine laterale Ausdehnung der Membranfläche größer unilamellarer Vesikel um etwa 10 % bei konstantem inneren Volumen. Gleichzeitig steigt die Dicke der Doppelschicht als Folge der Zunahme der effektiven Länge der Acylketten um etwa 1 nm an. Die Solubilisierung erfolgt unter Erhalt der Integrität der Doppelschicht, wobei die Biegesteifigkeit k_c der Doppelschicht trotz Dickenzunahme deutlich absinkt. Das Ausmaß der lateralen wie auch transversalen Ausdehnung zeigt gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der Röntgenbeugung nach Solubilisierung von Toluol in lamellare DMPC-Phasen.

Die Volumenkonstanz des inneren wäßrigen Vesikelvolumens bedingt aufgrund der Flächenzunahme eine Änderung der Vesikelgestalt. Dieser Effekt entspricht der thermisch bedingten Ausdehnung von Vesikeln. Ausgehend von einer Kugel, die bei konstantem Volumen eine minimale Fläche aufweist, entstehen durch die Solubilisierung ellipsoide Vesikelformen.

Im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen lassen sich Formumwandlungen zu Strukturen niedrigerer Symmetrie beobachten. Hierbei kommt es oftmals zu Membranknospungen vergleichbar mit Vorgängen der Endocytose, die vermutlich eine Folge der Minimierung

von Linienspannungen im Bereich toluolreicher Domänen sind. Das hierdurch bedingte Auftreten hoher Krümmung bewirkt in der Folge eine bevorzugte Anreicherung von Toluol und führt ferner zu visualisierbaren, separierten Überschußphasen des Solubilisats im Bereich der Doppelschicht. Die Bildung der Überschußphase tritt in Form einer Interkalation zwischen den Monoschichten gemäß Abbildung 5-5 (c) auf und führt zu stabilen, mikroskopisch visualisierbaren Toluoldomänen. Die Solubilisierung erfolgt letztendlich auf Kosten der Überschußfläche, so daß Vesikel im Bereich maximaler Solubilisierungskapazität hohe effektive Spannungen aufweisen und keinerlei Undulationen detektiert werden können.

5.2 Kinetik der Solubilisierung lipophiler Substanzen

In Wasch- und Reinigungsprozessen wird die Löslichkeit wasserunlöslicher Substanzen durch den Zusatz lösungsvermittelnder Stoffe erhöht. Liegt die Konzentration des Amphiphils oberhalb der kritischen Mizell- bzw. Vesikelbildungskonzentration, erfolgt im allgemeinen eine Solubilisierung in Form des Einbaus der unlöslichen Substanz in den lipophilen Bereich der Assoziationsaggregate. Während mizellare Systeme in Bezug auf Solubilisierungskapazitäten und Solubilisierungsraten lipophiler Substanzen recht gut charakterisiert sind, ist diesbezüglich über Vesikel nur wenig bekannt. Dies war Motivation für die folgenden Untersuchungen, die einen Einblick in den Mechanismus der Solubilisierung durch unilamellare Vesikel geben sollen.

5.2.1 Methoden zur Bestimmung von Solubilisierungsraten

Untersuchungen der Solubilisierungsrate lipophiler Substanzen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen dienen oftmals der mechanistischen Aufklärung von Solubilisierungsprozessen. Hierzu ist eine simultane Analyse der Größe der Phasengrenzfläche sowie des Volumens als Funktion der Zeit erforderlich. Es existieren einige zumeist optische Methoden, die zur Untersuchung des Solubilisierungsverhaltens mizellbildender Amphiphile angewendet werden. Die „Drop-on-fiber“-Technik beruht auf der mikroskopischen Analyse des zeitlichen Größenabnahme eines auf einer zylindrischen Faser adsorbierten Tropfens in einer Tensidlösung [144]. Durch Ermittlung des Tropfenvolumens V und der Grenzfläche A ist es möglich, die grenzflächenbezogene Solubilisierungsrate $[-A^{-1} (dV dt^{-1})]$ zu bestimmen.

Eine abgewandelte Methode beruht auf der Injektion der zu solubilisierenden Flüssigkeit in die Tensidlösung unter Analyse des frei schwebenden Tropfens [145]. Zur Untersuchung der Solubilisierungsrate von Feststoffen dient die Technik der rotierende Scheibe [146]. Der Feststoff wird auf eine Scheibe aufgebracht und diese nach Einfüllen der Tensidlösung im Reaktionsraum in Rotation versetzt. Der Vorteil dieser Methode ist die Berücksichtigung unterschiedlicher Strömungseinflüsse während des Solubilisierungsprozesses.

5.2.2 Solubilisierungsraten lipophiler Substanzen in Vesikeln

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Solubilisierungsrate erfolgten mit Hilfe der Videomikroskopie unter Verwendung der Injektionsmethode [145]. Hierbei wird ein Tropfen einer lipophilen Substanz mit Hilfe einer Spritze in die mit der Vesikeldispersion gefüllte Reaktionskammer gefüllt und die Tropfengröße als Funktion der Zeit unter Verwendung der Videomikroskopie analysiert (Abbildung 5-14). Das Phospholipid liegt im Vergleich zur verwendeten lipophilen Substanz im Überschuß vor, so daß eine Interaktion ölbeladener Vesikel mit dem Tropfen vernachlässigbar ist.

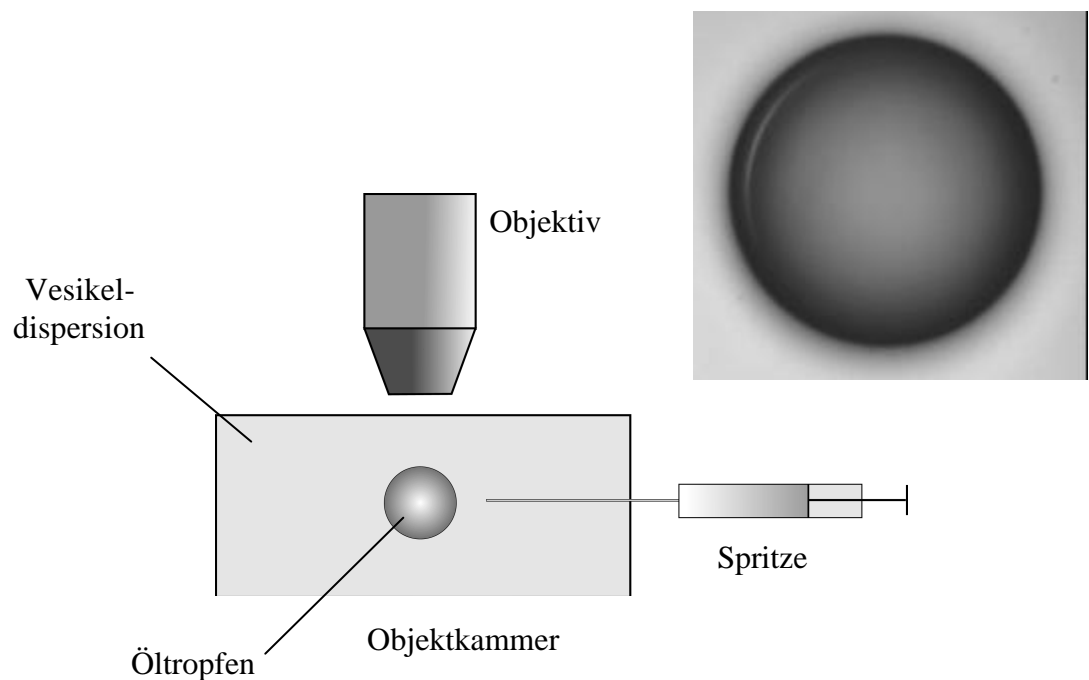


Abbildung 5-14: Schematischer Versuchsaufbau der Objektkammer der Injektionsmethode zur Bestimmung der Solubilisierungsrate mit Hilfe der Videomikroskopie sowie videomikroskopische Aufnahme eines Hexadekantropfens (oben rechts).

Die Untersuchungen erfolgten bei konstanter Temperatur unter Verwendung nahezu wasserunlöslicher lipophiler Substanzen. Abbildung 5-15 zeigt exemplarisch die zeitliche Entwicklung der Tropfenradien einzelner Chlorcyclohexantropfen zur Ermittlung der grenzflächenbezogenen Solubilisierungsrate [$-A^{-1} (dV dt^{-1})$].

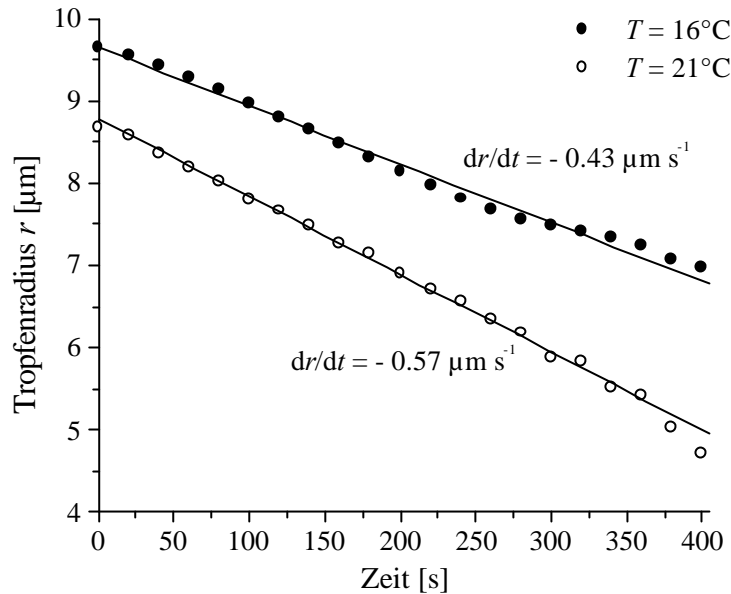


Abbildung 5-15: Zeitliche Entwicklung der Radien einzelner Chlorcyclohexantropfen ($r = 1.00 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in einer Dispersion unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei einer Temperatur von 16°C (—●—) sowie 21°C (—○—).

Aus dem nahezu linearen Verlauf der Daten können die Solubilisierungsraten $-dr \cdot dt^{-1}$ ermittelt werden (Tabelle 5-1). Für den beobachteten Bereich von Tropfendurchmessern zwischen $5 \mu\text{m}$ und $30 \mu\text{m}$ zeigte sich keinerlei Abhängigkeit von der Tropfengröße jedoch von der Amphiphilkonzentration. Die Solubilisierungsraten unlöslicher Substanzen sinken im allgemeinen mit steigendem Molvolumen des Solubilisats.

Tabelle 5-1: Ermittelte Solubilisierungsraten $-dr dt^{-1}$ lipophiler Substanzen unterschiedlicher Wasserlöslichkeit unter Verwendung unilamellarer Phospholipidvesikel ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) konstanter Vesikelgröße.

Solubilisat	Molvolumen [mol mL^{-1}]	Wasserlöslichkeit [mg L^{-1}] [132]	Lipid	Temperatur [$^\circ\text{C}$]	$-dr dt^{-1}$ [$\mu\text{m min}^{-1}$]
Toluol	106	470	DMPC	25	1.5
Chlorcyclohexan	119	20	DMPC	25	0.84
Hexadekan	294	$5.6 \cdot 10^{-5}$	DMPC	25	0.60
Hexadekan	294	$5.6 \cdot 10^{-5}$	DPPC	42	0.75

Die Solubilisierungsraten sind unter Verwendung unlöslicher Substanzen wie Chlorcyclohexan und Hexadekan vernachlässigbar bzw. nicht zu beobachten. Für wasserunlösliche Substanzen spielt somit die Diffusion der Substanz in die Wasserphase in Bezug auf die Solubilisierungsrate eine vernachlässigbare Rolle.

Die beobachtbaren zeitlichen Abhängigkeiten der Solubilisierungsraten sind analog der Ergebnisse mizellarer Systeme.

Anhand von Untersuchungen der Solubilisierung unlöslicher Öle (mit Löslichkeiten kleiner als 10^{-6} Gew.-%) konnte unter Verwendung nichtionischer Tenside in Konzentrationen oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration *cmc* gezeigt werden, daß die Solubilisierungsraten vermutlich durch Prozesse an der Tropfenoberfläche dominiert werden [144]. Theoretische Abschätzungen einer Dominanz der Diffusion der Mizellen zur Phasengrenzfläche liefern weitaus höhere Solubilisierungsraten als die beobachteten [147]. Eine detaillierte Aufklärung der letztendlich geschwindigkeitsbestimmenden Mechanismen konnte jedoch nicht im Detail erfolgen.

Abbildung 5-16 zeigt den temperaturabhängigen Verlauf der Solubilisierungsrate verschiedener lipophiler Substanzen in DMPC-Vesikeln. Im Bereich oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel wird eine auffällige Erhöhung der Solubilisierungsrate deutlich. Diese sollte einerseits eine Folge des erhöhten freien Volumens innerhalb der Doppelschicht und die hierdurch bedingte bereits diskutierte größere Solubilisierungskapazität sein. Eine Beeinflussung durch die höhere Flexibilität der Doppelschicht und die damit begünstigte Wechselwirkung mit der Phasengrenzfläche ist jedoch ebenfalls denkbar.

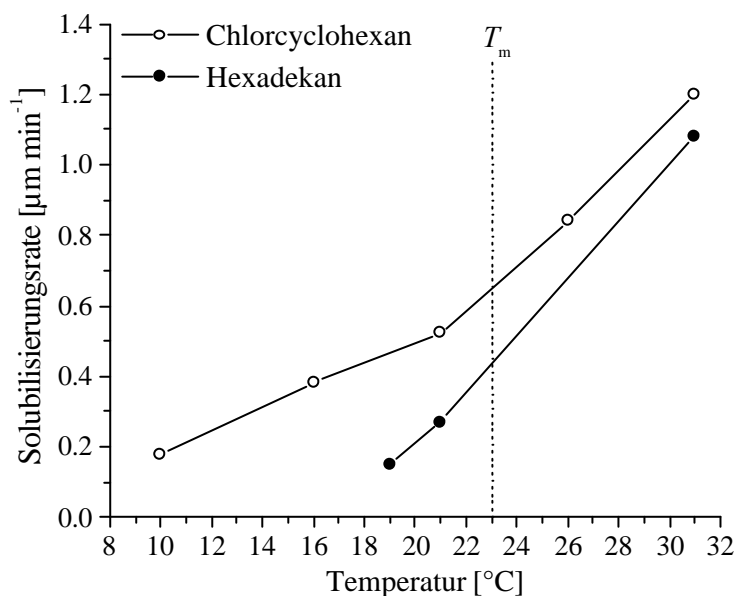


Abbildung 5-16: Temperaturabhängigkeit der Solubilisierungsrate dr/dt^{-1} lipophiler Substanzen durch kleine unilamellare DMPC-Vesikel. Die gepunktete Linie markiert die Phasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel, oberhalb derer sich die Doppelschicht der Vesikel im fluiden Zustand befindet.

Im Hinblick auf die mögliche Dominanz von Prozessen an der Grenzfläche Öl/Wasser wird im folgenden Mechanismen der Interaktionen der Vesikel mit der Phasengrenzfläche detailliert untersucht.

5.2.3 Mechanistische Betrachtung des Solubilisierungsprozesses

Abbildung 5-17 zeigt den zeitlichen Verlauf der Grenzflächenspannung eines Hexadecantropfens in einer stark verdünnten Dispersion kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel. Die Grenzflächenspannung wurde mit Hilfe eines optischen Kontaktwinkelmeßgerätes bestimmt.

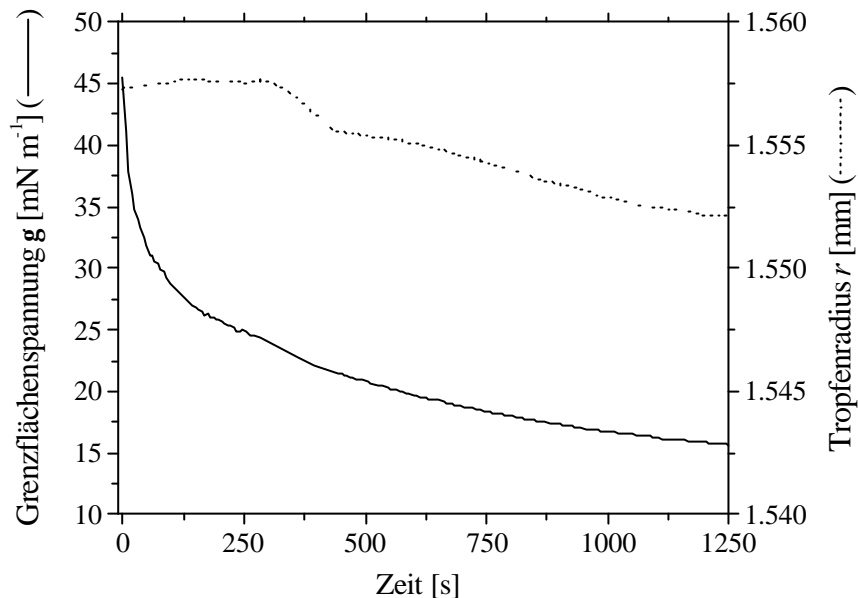


Abbildung 5-17: Verlauf der Grenzflächenspannung g sowie des Radius r eines Hexadecantropfens ($V = 16 \mu\text{L}$) in einer verdünnten Dispersion kleiner unilamellarer DMPC-Vesikel ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei 25°C . Die Ermittlung der Grenzflächenspannung erfolgte mit Hilfe der Tropfengestalts-Analyse eines optischen Kontaktwinkelmeßgerätes.

Hierbei kann zunächst eine Initiierungsphase der Solubilisierung beobachtet werden, die auf einen Prozeß der Diffusion der Vesikel zur Phasengrenzfläche zurückzuführen ist. Die Koaleszenz der Vesikel mit der Grenzfläche Öl/Wasser führt vermutlich zunächst zu einer Monoschichtbelegung durch das Amphiphil unter Erniedrigung der Grenzflächenspannung. Die Solubilisierungsrate ist während dieser Phase entsprechend klein. Erst nach einer deutlichen Erniedrigung der Grenzflächenspannung wird eine signifikante Abnahme des Tropfenradius beobachtbar.

Neben der Koaleszenz der Vesikel unter Ausbildung einer Monoschicht ist die Adsorption der Vesikel an der Phasengrenzfläche Öl/Wasser mit anschließender Solubilisierung des Öls und Diffusion des ölbeladenen Aggregats in die Bulkphase möglich. Bei nahezu vollständiger Monoschichtbelegung sollte letztgenannter Prozeß dominieren. Die einzelnen Schritte der Solubilisierung durch Vesikel sind schematisch in Abbildung 5-18 dargestellt.

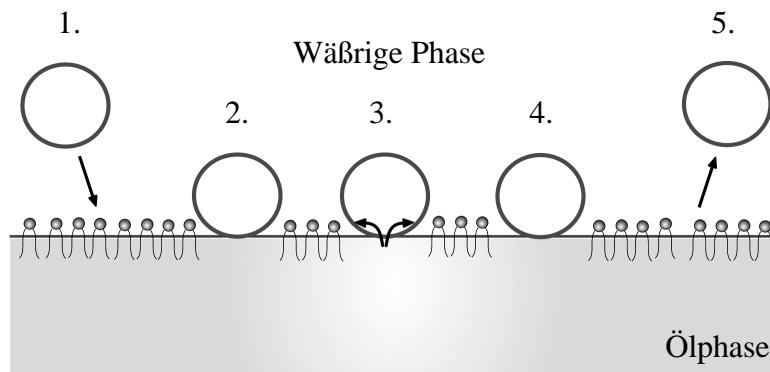


Abbildung 5-18: Modell der Interaktion von Vesikeln (vereinfachte Illustration der Doppelschicht als Liniendarstellung) mit der Grenzfläche Öl/Wasser unter Solubilisierung des Öls. 1. Diffusion zur Grenzfläche, 2. Adsorption, 3. Eintrag des Öls in die Doppelschicht bzw. Austausch von Amphiphilmolekülen, 4. Desorption unter Abspaltung des Vesikels, 5. Diffusion des ölbeladenen Vesikels in die Bulkphase.

Die mikroskopischen Beobachtungen, die in Abbildung 5-19 (a) dargestellt sind, bestätigen die Existenz adsorbierter, vesikulärer Strukturen im Bereich der Phasengrenzen Öl/Wasser. Diese desorbieren im Verlauf des Prozesses vermutlich von der Phasengrenzfläche. Gleichzeitig ist ein Anwachsen der ölbeladenen Doppelschichtstrukturen im Bereich der Grenzfläche (Abbildung 5-19 (b)) unter anschließender Desorption zu beobachten.

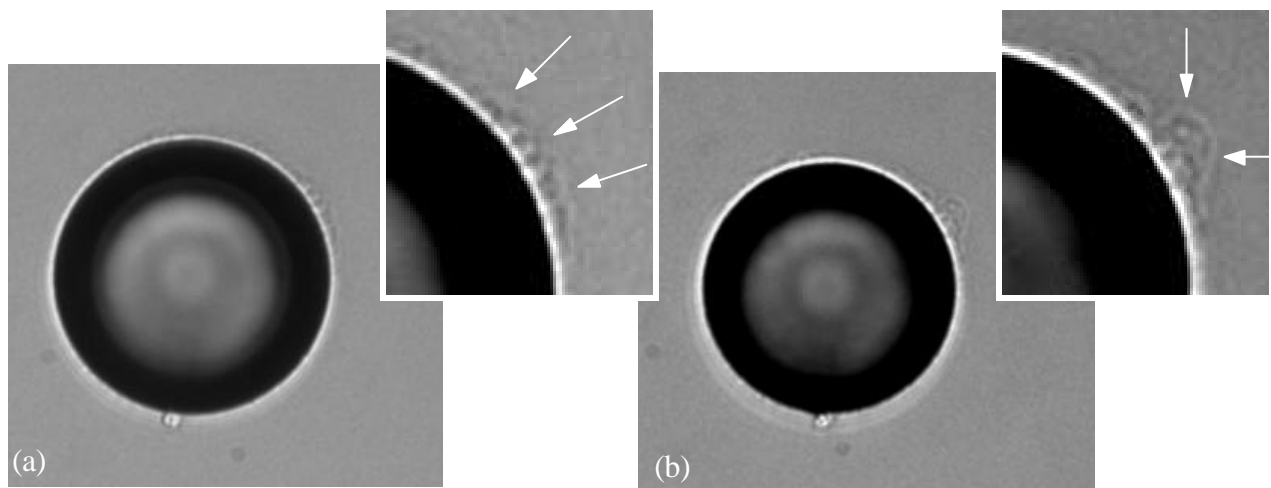


Abbildung 5-19: Videomikroskopisch beobachtbare Prozesse an der Grenzfläche Chlorcyclohexan/Wasser bei 30°C. (a) Adsorbierte vesikuläre Strukturen von DMPC an der Grenzfläche (Markierung mittels Pfeilen im vergrößerten Bildausschnitt), die im zeitlichen Verlauf zu größeren Aggregaten anwachsen und desorbieren (b).

Die beschriebenen Grenzflächenphänomene und insbesondere die in Abbildung 5-19 (b) dargestellten Prozesse der Desorption der ölbeladenen Doppelschichtstrukturen sind mit lokalen Deformationen der vesikulären Strukturen verbunden. Aus diesem Grunde sollten die elastischen Eigenschaften des Amphiphils und insbesondere die Biegesteifigkeit k_c die Desorptionsprozesse signifikant beeinflussen. Niedrige Elastizitätsmoduln, aber auch flexible Grenzflächen begünstigen somit den Solubilisierungsprozeß des Öls.

Da die Tropfenfläche im Verlauf der Solubilisierung sinkt, sollte sich der Amphiphilfilm auf der Grenzfläche verdichten und in der Folge kollabieren. Derartige Beobachtungen zeigen sich im Bereich kleiner Tröpfchen (Abbildung 5-20), die jedoch oftmals auf der Glasfläche der Beobachtungszelle spreiten, so daß ein Einfluß auf die Solubilisierungsrate nicht ermittelt werden kann.

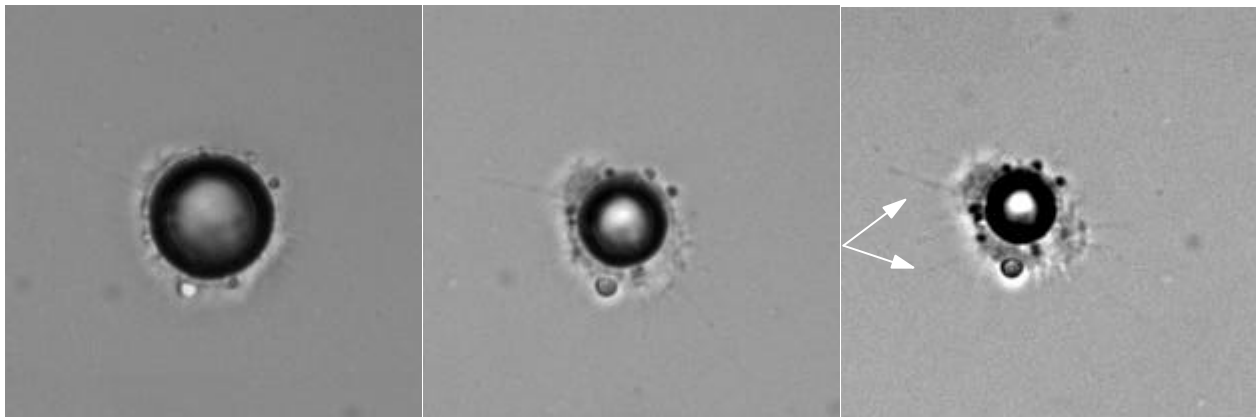


Abbildung 5-20: Ausbildung flüssigkristalliner Strukturen von DMPC sowie kleine tropfenförmige Aggregate an der Öl/Wasser Grenzfläche eines Hexadekan-Tropfens ($r_0 = 4.5 \mu\text{m}$) als Folge der kollabierenden Monoschicht. Die Pfeile markieren tubusförmige Doppelschichtstrukturen, die zum Teil an der Glasoberfläche der Beobachtungszelle adsorbieren.

5.2.4 Zusammenfassung

Die Untersuchung der Kinetik der Solubilisierung wasserunlöslicher lipophiler Substanzen durch unilamellare Vesikel mit Durchmessern unterhalb von 200 nm liefert deutliche Analogien zu Ergebnissen der Untersuchung mizellarer Systeme [144,148].

Im Verlauf des Solubilisierungsprozesses erfolgt zunächst eine Monoschichtbelegung der Grenzfläche mit dem Phospholipid unter signifikanter Erniedrigung der Grenzflächenspannung. Nach einer kurzen Initiierungsphase zeigt sich somit eine konstante grenzflächenbezogene Solubilisierungsrate $[-A^{-1} (dV/dt)]$. Diese ist sowohl von der Temperatur, als auch von der Natur des Solubilisats abhängig. Die Solubilisierungsraten werden vermutlich entsprechend mizellaren Systemen durch Prozesse an der Öl/Wasser-Grenzfläche domi-

niert. Mikroskopische Untersuchungen weisen darauf hin, daß Krümmungsänderungen der ölbeladenen Doppelschichtstrukturen im Bereich der Phasengrenzfläche auftreten, wobei die elastischen Eigenschaften des Amphiphils und insbesondere die Biegesteifigkeit k_c einen Einfluß auf diese Prozesse aufweisen sollten. Niedrige Elastizitätsmoduln begünstigen den Solubilisierungsprozeß des Öls und tragen vermutlich zu einer erhöhten Solubilisierungsrate bei Temperaturen oberhalb der Phasenumwandlung in die flüssig-kristalline Phase der Vesikel bei.