

Charakterisierung und Beurteilung von natürlichen Phospholipiden als Emulgatoren



zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät I –
Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Pharmazeut Felix Otto

Geboren am 14.06.1986 in Werdau

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerald Brezesinski

Drittgutachter: Prof. Dr. Rolf Daniels

Datum der öffentlichen Verteidigung: Halle (Saale), 30.05.2022

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Reinhard H. H. Neubert für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Überlassung dieses interessanten Themas. Weiterhin möchte ich mich für die Unterstützung bei teilweise auch heiklen Themen, das stets offene Ohr und die Freiheiten während der Bearbeitung des Themas und das gewährte Vertrauen bedanken.

Dem gesamten An-Institut für angewandte Dermatopharmazie (IADP) gilt mein Dank für die nette Unterstützung nicht zuletzt durch eine tolle Atmosphäre und viele vergnügte Stunden. Eure stete Hilfsbereitschaft und die positive Lebenseinstellung werden mir in Erinnerung bleiben.

Bei Professor Dr. Gerald Brezesinski und seinem Team am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung möchte ich mich für die Untersuchungen mittels SAXS, Langmuir-Blodgett-Trog und der BAM-Mikroskopie ebenso bedanken wie für seinen

Bei Frank Syrowatka und dem Inter-disziplinären Zentrum für Materialwissenschaften möchte ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die begeisterte Teilnahme an meiner Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich mich für die interessanten Diskussionen und Erkenntnisse auf dem Gebiet der physikalischen Chemie bedanken.

Bei Dr. Helmut Podhaisky vom möchte ich mich für die anregenden Diskussionen und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Tröpfchengrößenverteilungen bedanken.

Bei Frau Veronika Heini möchte ich mich explizit für die herausragende Arbeit und Unterstützung bei der Entwicklung Charakterisierung der HLB-Werte der Phospholipide bedanken, ebenso wie für die tolle Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Bei Erik Lehner, Tom Wersig und Dr. Henrik Metz von der Abteilung pharmazeutische Technologie möchte ich mich für die Bereitstellung von Messzeit am Zeta-Sizer und den vielen Austausch über alle Herausforderungen und Probleme einer Promotion danken.

Allen Vier- und Sechs-Wochen-Praktikanten danke ich für ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Sie haben alle ihren Anteil an dem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Als das wäre ohne die Unterstützung meiner Familie, meiner Freunde und meiner Freundin nicht möglich gewesen, die mich immer wieder aufgebaut und vorangebracht haben, und die klaglos über Aspekte meiner Arbeit nachgedacht und sich eingebracht haben. Ich danke euch von Herzen.

Bereits veröffentlichte Teile der Arbeit

Publikationen:

F. Otto, P. van Hoogevest, F. Syrowatka, V. Heini, R. H.H. Neubert

Assessment of the applicability of HLB values for natural phospholipid emulsifiers for preparation of stable emulsions

Die Pharmazie, vol. 75, pp. 365–370, 2020.

F. Otto, G. Brezesinski, P. van Hoogevest, R. H. H. Neubert

Physicochemical Characterization of Natural Phospholipid Excipients with varying PC content

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 558, pp. 291-296, 2018

Tagungsbeiträge:

F. Otto, G. Brezesinski, R.H.H. Neubert

5th Symposium "Phospholipids in Pharmaceutical Research", Heidelberg, 2017

Influence of Lecithin Composition on Bilayer Properties

F. Otto, V. Heini, J. Wohlrab

Jahrestagung der Norddeutsche Dermatologische Gesellschaft, Hamburg, 2016

Nutzung von Lecithinen verschiedenen Gehaltes und Ursprungs für halbfeste Formulierungen

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung (deutsch)	1
Summary (english)	2
1 Einleitung	3
2 Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Phospholipide	5
2.1.1 Definition und Struktur	5
2.1.2 Rohmaterialien und Gewinnung natürlicher PLs	9
2.1.3 Anwendungsgebiete der Phospholipide	9
2.2 HLB-Wert	11
2.2.1 HLB-Wert nach Griffin	11
2.2.2 Theorien und Methodenentwicklung zur HLB-Wert-Bestimmung	13
2.2.3 Methodenwahl zur HLB-Wert-Bestimmung (Blender-Centrifuge- Method)	14
2.3 Zeta-Potential	14
2.4 Monolayer (Monoschichten) und Langmuir-Blodgett-Filme	16
2.5 Kleinwinkelröntgenstrahlung (SAXS)	18
2.6 Mikroskopie	20
2.6.1 Grundlagen der Mikroskopie	20
2.6.2 Dunkelfeldmikroskopie	21
2.6.3 Polarisationsmikroskopie	21
2.6.4 Brewster-Angle-Mikroskopie	22
2.6.5 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)	23
3 Ergebnisse	25
3.1 Entwicklung der HLB-Analysemethode	25
3.1.1 Anpassung der Gleichung nach Griffin	25
3.1.2 Auswahl der Parameter zur HLB-Wert-Bestimmung	25
3.1.3 Bestimmung des hydrophilen Partneremulgators zur HLB-Wert- Bestimmung	27
3.1.4 Auswahl der Öle geeigneten eHLB-Wertes	28
3.2 Verifizierung der experimentellen Methodik	31

3.3	HLB-Wert-Bestimmung der natürlichen PLs	33
3.3.1	Einfluss der PL-Zusammensetzung und der Quelle des Rohmaterials auf den HLB-Wert	35
3.3.2	Reinheitsgrad der PLs.....	38
3.3.3	Phasentrennlinien der PLs	41
3.4	Physiko-chemische Untersuchungen der PLs.....	44
3.4.1	Zeta-Potential-Untersuchungen.....	44
3.4.2	Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS).....	45
3.4.3	Langmuir-Isothermen	50
3.4.4	Brewster Angle Mikroskopie (BAM).....	54
3.5	Entwicklung von Methoden zur mikroskopischen Untersuchung von Phospholipid Emulsionen	55
3.5.1	Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)	56
3.5.2	Polarisationsmikroskopie.....	57
3.5.3	Hellfeldmikroskopie mit gefärbtem Präparat.....	58
3.5.4	Dunkelfeldmikroskopie	61
3.6	Entwicklung der automatisierten Prozessierung der mikroskopischen Aufnahmen	64
3.7	Statistische Auswertung der Tröpfchengrößenverteilung.....	67
4	Diskussion	74
4.1	Charakterisierung physikalisch-chemischer Eigenschaften der Phospholipide durch HLB-Werte.....	74
4.2	Physiko-chemische Untersuchungen.....	80
4.3	Mikroskopische Stabilitätsuntersuchungen	82
4.4	Partikelgröße und Statistische Auswertung	84
5	Material und Methoden.....	87
5.1	Material	87
5.2	Methoden	87
5.2.1	HLB Bestimmung	87
5.3	Vorversuche im Rahmen der HLB-Wert-Bestimmung.....	89
5.3.1	Löslichkeit der PLs	89
5.3.2	Auswahl des Partneremulgators.....	90
5.3.3	Auswahl der Öle und deren eHLB-Rückbestimmung.....	90
5.4	Zeta-Potential	90
5.4.1	Herstellung von Liposomen.....	90
5.4.2	Zeta-Potential Messung	91
5.5	Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS).....	91
5.6	Langmuir Isothermen.....	91
5.7	Brewster-Winkel-Mikroskopie (BAM)	92

5.8	Herstellung der Emulsionen.....	92
5.9	Lichtmikroskopie.....	92
5.10	Bildauswertung.....	93
6	Fazit / Ausblick	94
7	Literaturverzeichnis.....	97

Abkürzungsverzeichnis

PL	Phospholipid
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PG	Phosphatidyl-Glycerol
PI	Phosphatidyl-Inositol
PC	Phosphatidyl-Cholin
LC	Liquid-condensed
LE	Liquid-Expanded
FS	Fettsäure
BAM	Brewster-Angle-Mikroskopie
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
DPPC	Di-Palmitoyl-Phosphatidylcholin
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HLD	Hydrophilic-Lipophilic Deviation
SDS	Natriumlaurylsulfat
CPP	Critical Packaging Parameter
PIT	Phaseninversionstemperatur
DLS	Dynamische Lichtstreuung
HBB	Wasserstoff-Brücken-Bindung
AB	Alkylbenzoat
eHLB	Erforderliche Hydrophile-Lipophile Balance des Öls
HLB	Hydrophile-Lipophile Balance des Tensids
ICS	Isocetylstearat

MCT	Mittelkettige Triglyceride
IPP	Isopropylplamitat
ISIS	Isostearylisostearat
pKA	Säurekonstante
CCD	Charge-Coupled Device (spezieller Sensor einer Kamera)
FWHM	Full width at half maximum (Halbwertsbreite)
O/W	Öl-in-Wasser
W/O	Wasser-in-Öl
SPAN[®]	Sorbitanmonolaurat
TWEEN[®]	Polysorbat
SD	Standardabweichung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Phospholipide.....	6
Abbildung 2: Struktur der FSs.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Liposoms.....	10
Abbildung 4: HLB-Werte der Lecithinfraktionen	11
Abbildung 5: Elektrische Potentiale in Entfernung zur Partikeloberfläche (modifiziert nach Glawdel [16]).....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Oberflächendruck-Flächen-Isotherme	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kleinwinkelröntgenstreuung (modifiziert nach de-Vela [17]).....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Strahlengangs	20
Abbildung 9: Phasentrennlinie SPAN [®] 20 (n=3).....	32
Abbildung 10: Phasentrennlinie von TWEEN [®] 80 (n=3).....	32
Abbildung 11: Ergebnis der HLB-Wert-Bestimmungen der 14 PLs (n=3).....	34
Abbildung 12: Vergleich der HLB-Werte von PLs aus tierischen und pflanzlichen Quellen gleichen PC-Gehaltes (n=3)	35
Abbildung 13: PLs aus Sonnenblume, Raps und Non-GMO-Soja mit ca. 50% PC-Gehalt....	37
Abbildung 14: HLB-Werte der PLs aus Soja und Non-GMO-Soja geordnet nach zunehmendem PC-Gehalt (n=3).....	39
Abbildung 15: HLB-Werte der PLs aus Ei geordnet nach zunehmendem PC-Gehalt (n=3) ..	40
Abbildung 16: Phasentrennlinienverlauf für LIPOID S 75 (n=3)	42
Abbildung 17: Vergleich der Phasentrennlinien in Abhängigkeit vom Reinheitsgrad am Beispiel der PLs LIPOID S 45 und S 100 (n=3)	43
Abbildung 18: Kleinwinkelröntgenaufnahme im Vergleich (— LIPOID S 45 und — LIPOID E).....	46
Abbildung 19: Streuintensität gegen den Steruvektor Q bei der Probe LIPOID S LPC 80.....	47
Abbildung 20: Die optische Transparenz der Dispersionen: Links LIPOID S 45 und rechts S LPC 80 (jeweils 20% (w/w) des PLs in 80% Puffer).....	47
Abbildung 21: Korrelation von Zeta-Potential und der Bilayer-Dicke	48
Abbildung 22: π -A Isothermen von Soja-PL mit variierendem PC-Gehalt (S 100, S 80, S 75, S 45) auf Reinstwasser bei 20 °C	50

Abbildung 23: π - A Isothermen von S45 (schwarz), R50 (magenta), und H50 (oliv) auf Reinstwasser (durchgehende Linie) und auf Phosphatpuffer, pH 7.4, (gepunktet/gestrichelte Linie) bei 20 °C.	51
Abbildung 24: π -A Isothermen von LIPOID S 45 (schwarz) und LIPOID S 100 (Rot) auf Reinstwasser (durchgehende Linie) und auf Phosphatpuffer pH 7,4 (gestrichelte Linie).....	52
Abbildung 25: π -A Isothermen von LIPOID S 45 auf Reinstwasser (schwarz), auf Wasser mit 10 mM CaCl ₂ (grün), auf Wasser mit 50 mM CaCl ₂ (blau), und auf Wasser mit 150 mM NaCl (rote Kreise) bei 20 °C.	53
Abbildung 26: Brewstermikroskopaufnahme von LIPOID S 45 auf Phosphatpuffer, pH 7,4 bei 5 mN/m und 20°C	54
Abbildung 27: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45).....	56
Abbildung 28: ESEM-Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 75)	57
Abbildung 29: Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 75).....	58
Abbildung 30: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45)	59
Abbildung 31: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlsliffobjektträger	60
Abbildung 32: Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlsliffobjektträger	61
Abbildung 33: Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlsliffobjektträger.....	62
Abbildung 34: Prozessierte Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45)	64
Abbildung 35: Prozessierte Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlsliffobjektträger (der Maßstab ist nicht eingezeichnet, um Fehler bei der automatisierten Erkennung der Strukturen zu vermeiden)	65
Abbildung 36: Methodenvergleich individuelle und automatisierte Auswertung von Emulsionen (Kumuliertes Histogramm aus 3 Aufnahmen).....	67
Abbildung 37: Vergleich der kumulierten Tröpfchengrößen für 3 verschiedene Herstellungsarten (n=3).....	70
Abbildung 38: Vergleich der kumulierten Tröpfchengröße für LIPOID S 45, LIPOID E und LIPOID P 100 (n=3).....	71
Abbildung 39: Vergleich der kumulierten Tröpfchengrößen für Reinstwasser und 150 mM NaCl-Lsg.	72
Abbildung 40: HLB-Bereiche der untersuchten PLs.....	77

Abbildung 41: Phasenseparationsverlauf am Beispiel PHOSPHOLIPON 50 IP in ISIS.....	88
Abbildung 42: Phasenseparationsverlauf am Beispiel PHOSPHOLIPON 50 IP in ISIS.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FS Zusammensetzung der verwendeten PLs.....	7
Tabelle 2: Zusammensetzung der PLs gemäß Analysenzertifikat.....	8
Tabelle 3: HLB-Werte und deren Anwendungsbereiche	12
Tabelle 4: Mischungsverhältnis der Emulsionen und daraus resultierende HLB-Werte am Beispiel von TWEEN® 20.....	26
Tabelle 5: HLB-Werte für PLs laut Literatur	27
Tabelle 6: Lösungsvermögen von LIPOID P 100 und LIPOID H 50 in verschiedenen Ölen	29
Tabelle 7: eHLB-Werte der Öle (n=3)	31
Tabelle 8: HLB-Werte von PLs aus tierischen und pflanzlichen Quellen gleichen PC- Gehaltes (n=3)	36
Tabelle 9: HLB-Werte der PLs aus Sonnenblume, Raps und non-GMO-Soja.....	37
Tabelle 10: HLB-Werte von PLs mit unterschiedlichen Aufreinigungsstufen	38
Tabelle 11: HLB-Werte der Ei-PLs.....	41
Tabelle 12: Zeta-Potentiale der PLs bei 50°C und bei Raumtemperatur (RT) (n=3).....	45
Tabelle 13: Zeta-Potentiale und d-Werte von ausgewählten natürlichen PLs	49
Tabelle 14: Berechnete Doppelschichten aufgrund von Korrelationslängen	49
Tabelle 15: Übersicht der Vor- und Nachteile der Mikroskopietechniken	63
Tabelle 16: Vergleich der Häufigkeiten der evaluierten Tröpfchengröße (n= 3 Einzelaufnahmen)	68

Zusammenfassung (deutsch)

Natürliche Phospholipide (PL) sind eine native, biokompatible und relativ kostengünstige Alternative zu synthetischen Emulgatoren. Ein bekannter PL-haltiger Emulgator ist Lecithin, das hauptsächlich Phosphatidylcholin (PC) enthält und (abhängig vom Reinheitsgrad) zusätzlich eine Mischung anderer PLs mit einer entsprechenden Fettsäurezusammensetzung in Abhängigkeit von der Ausgangssubstanz enthält. Trotz der Vielfalt der Phospholipide wird hauptsächlich (fast) reines Phosphatidylcholin als Emulgator für kosmetische bzw. pharmazeutische Zwecke verwendet. Da alle enthaltenen Lipidspezies Emulgatoren sind, können natürliche PLs als eine Mischung von (Co-) Emulgatoren betrachtet werden.

Der HLB-Wert ist der am häufigsten genutzte Parameter, für die Klassifizierung und damit für den Anwendungsbereich von amphiphilen Substanzen. Amphiphile Substanzen werden aufgrund ihrer Fähigkeit die Oberflächenspannung zu reduzieren auch Tenside genannt. Durch die weite Verbreitung des HLB-Wertes sind die Bewertungen von Tensiden durch industrielle Anwender stark von ihm beeinflusst. In der Literatur werden allerdings viele verschiedene HLB-Werte für PLs angegeben [1]–[3], weshalb einige Unklarheiten für die kommerzielle und vielfältige Anwendung von natürlichen PLs bestehen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb eine systematische Charakterisierung von natürlichen Phospholipiden unterschiedlicher Aufreinigungsstufen und unterschiedlicher pflanzlicher und tierischer Quellen mit dem Ziel den Einsatzbereich der entsprechenden PLs für O/W- bzw. W/O Emulsionen zu beleuchten.

Um dies zu bewerten, wurden HLB-Werte von vierzehn verschiedenen pflanzlichen PLs mit unterschiedlichem PC-Gehalt unter Verwendung eines Zentrifugationsverfahrens bestimmt, um die relative Stabilität einer Emulsion mit dem jeweiligen Emulgator und verschiedenen Ölphasen zu bestimmen. Die erhaltenen Ergebnisse werden durch umfangreiche physiko-chemische Charakterisierung von repräsentativen PLs in Kontext gesetzt. Per Kleinwinkelröntgenbeugung und Oberflächen-Druck Isothermen soll die Struktur der sich an der Grenzfläche bildenden PL-Membranen analysiert werden. Die so erhaltenen Ergebnisse werden mithilfe der Bestimmung des elektrostatischen Potentials per Zeta-Potential Analyse interpretiert.

Um die erfolgte Grundlagen-wissenschaftliche Charakterisierung zudem auf ihre praktische Übertragbarkeit zu verifizieren werden unterschiedliche mikroskopische Methoden angewandt, um aus natürlichen PLs präparierte Emulsionen zu untersuchen. Für die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wird eine geeignete Bild-Analyse Methode entwickelt, um eine statistische Signifikanz zwischen den Einzelnen Aufnahmen zu gewährleisten. Die so gewonnenen Daten werden mittels einer Histogramm-Darstellung miteinander verglichen und ausgewertet.

Summary (english)

Natural phospholipids (PL) are a native, biocompatible and relatively inexpensive alternative to synthetic emulsifiers. A known PL-containing emulsifier is lecithin, which mainly contains phosphatidylcholine (PC) and (depending on the degree of purity) additionally contains a mixture of other PLs with a corresponding fatty acid composition depending on the natural source. Despite the variety of phospholipids, mainly (almost) pure phosphatidylcholine is used as emulsifier for cosmetic or pharmaceutical purposes. Since all included lipid species are emulsifiers, natural PLs can be considered as a mixture of (co-)emulsifiers.

The HLB value is the most frequently used parameter for the classification and thus for the application of amphiphilic substances as emulsifiers. Amphiphilic substances are also called surfactants because of their ability to reduce surface tension. Due to the widespread use of the HLB value, the evaluation of surfactants by industrial users are strongly influenced by it. In the literature, however, many different HLB values are attributed to lecithins [1]-[3], which leads to a level of uncertainty regarding the commercial use of natural PLs. Therefore, the aim of the present work is a systematic characterization of natural phospholipids of different purification levels and different plant and animal sources with the aim to shed light on the field of application of the corresponding PLs for O/W or W/O emulsions.

To evaluate this, HLB values of fourteen different natural PLs with varying PC content were determined using a centrifugation procedure to determine the relative stability of an emulsion with the respective emulsifier and different used oil phases. The results obtained are put into context by extensive physicochemical characterization of representative PLs. The structure of the PL membranes forming at the interface will be analyzed by small angle X-ray diffraction and surface pressure isotherms. The obtained results will be interpreted by determining the electrostatic potential via zeta-potential analysis.

In order to verify the basic scientific characterization and its practical applicability, different microscopic methods will be applied to study emulsions prepared from natural PLs. For the evaluation of the microscopic images a suitable image analysis method is developed to ensure statistical significance between the individual images. The data obtained in this way are compared and evaluated by means of a histogram representation.

1 Einleitung

Phospholipide (PLs) sind eine Klasse von Molekülen, welche ubiquitär in den Membranen aller Organismen (Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere) sowie in Viren vorkommen. Durch ihre hydrophile Kopfgruppe und den lipophilen Schwanz bilden sie ein amphiphiles Molekül, welches vielseitige Eigenschaften aufweist und ein breites Anwendungsspektrum zulässt.

Zuerst entdeckt wurden PLs im Jahre 1847 durch den französischen Chemiker und Pharmazeuten Theodore Nicolas Gobley (1811 – 1876). Er stieß auf diese Verbindungen bei der Analyse von Eigelb, welches ihm als Modellmatrix bei der Suche nach dem chemischen Aufbau des Gehirns diente. Eine Reihe von französischen Chemikern versuchte in jener Zeit, die chemischen Komponenten des Gehirns zu entschlüsseln. Dabei stießen sie auf eine Lipidsubstanz, welche sich im Alkohol lösen ließ und Phosphor enthielt. Das entdeckte PL nannte Gobley in Anlehnung an das griechische Wort *lekhitos* für Eigelb. Später wurden vergleichbare Substanzen in allen daraufhin untersuchten Lebewesen nachgewiesen und als Stoffgruppe anerkannt – die Lecithine.

Seit Entdeckung der PLs bzw. Lecithine wurden die Anwendungsgebiete dieser ubiquitär in Lebewesen vorkommenden Stoffklasse stetig erweitert. Die ersten Nutzungsversuche begannen ab 1925, getrieben durch die Entwicklung des Bollmannschen Extraktionsverfahrens. Mit dessen Hilfe konnte Lecithin aus dem Öl der Sojabohne in industriellem Maßstab extrahiert werden. Zunächst wurden PLs als Emulgator in der Pharmazie und Kosmetik verwendet, ab 1948 fanden sie dann als Hilfs- und Wirkstoff in den Bereichen Lebensmittel-, Futterindustrie und Technik weite Verbreitung. In neuerer Zeit kommen PLs bzw. Lecithine in der Pharmazie vor allem als Liposomen, also als (Transport-)Vesikel für Arzneistoffe, zu breiter Anwendung und sind dort weiterhin Fokus intensiver Forschung.

Es dauerte nur vergleichsweise kurze Zeit, bis die natürlich vorkommenden PLs durch synthetische ergänzt wurden. Im Jahre 1945 traten die Sorbitanfettsäureester TWEEN und SPAN ihren Siegeszug als universell einsetzbare Emulgatoren an. Sie sind im typischen Fall aus Erdölraffinaten über diverse Zwischenstufen synthetisierbar. Ihr Vorteil bestand in einer kostengünstigen Synthese gepaart mit der Möglichkeit sie durch unterschiedliche Substitutionsmuster ihrem konkreten Einsatzzweck anzupassen. Außerdem waren sie durch ihre relativ homogene Zusammensetzung nach Aufreinigung leicht und zuverlässig zu charakterisieren. Potentielle Interaktionen und Unverträglichkeiten konnten so sicherer vorhergesagt bzw. vermieden werden. Durch diese neue, mit den Anforderungen des Marktes konforme Qualität wurden die vormals als Emulgatoren geschätzten Lecithine weitestgehend aus ihren Einsatzgebieten verdrängt.

Etwa seit der Jahrtausendwende gibt es in der Bevölkerung Deutschlands, der EU und darüber hinaus ein besseres Verständnis und eine stetig wachsende Nachfrage für umweltfreundliche und ökologisch nachhaltig erzeugte Produkte. Dieser Trend zeigt sich bei allen Produkten und schließt somit auch die Pharmazie- und Kosmetikbranche mit ein. Innerhalb der letzten 10 Jahre verdoppelte sich zum Beispiel der Umsatz von Naturkosmetika in den USA, Frankreich und Deutschland, die als führende Absatzmärkte für Kosmetika besonders beachtet und trendbestimmend sind [4], [5]. Dabei blieb der Gesamtumsatz in etwa gleich, allein das Verhältnis klassische Kosmetik zu Naturkosmetik veränderte sich. Generell ist dieser Trend auch in sich entwickelten Absatzmärkten wie China und Brasilien zu beobachten. Native pflanzliche Produkte werden also auch global betrachtet immer mehr geschätzt, wohingegen die Skepsis gegenüber dem industriell-synthetischen Produkten weiter zunimmt.

. Auf die veränderten Wertevorstellungen und das neue Kaufverhalten ist mit neuen Anstrengungen in Forschung und deren Anwendung zu reagieren. Da die Industrie über Jahrzehnte hinweg den Fokus auf die synthetischen PLs und deren Charakterisierung gelegt hat, fehlen heute wissenschaftlich gut fundierte und damit valide Aussagen zur Anwendbarkeit der natürlichen Vertreter dieser Stoffklasse. Sie werden unter anderem als Emulgatoren in der pharmazeutischen und kosmetischen Branche stark nachgefragt. Diese geschilderte Diskrepanz zwischen Kenntnisstand und Einsatzanforderungen soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit verringert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es daher natürliche PLs aus unterschiedlichen Ursprüngen gemäß dem verbreiteten Konzept des HLB-Wertes auf ihre Anwendungsmöglichkeiten als Emulgator zu untersuchen. Folgend sollen die aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung gefundenen Unterschiede genauer untersucht werden durch Analyse der von den PLs gebildeten Membranen an der Grenzfläche zwischen den Phasen einer Emulsion.

Anschließend soll eine mikroskopische Methode zur Bestimmung der Tröpfchengrößenverteilung von Emulsionen entwickelt werden. Durch diese Methode sollen dann etwaige Unterschiede zwischen als Emulgator verwendeten PLs auf ihre Auswirkung bei der Herstellung von Emulsionen untersucht werden. Dadurch sollen die Einsatzgebiete von natürlichen PLs als Emulgatoren entsprechend ihrer Herkunft und Aufreinigungsstufe dargelegt werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Phospholipide

2.1.1 Definition und Struktur

Natürliche Phospholipide (PLs), gewonnen aus z.B. Sojabohnen und Eigelb, sind weit verbreitete Hilfsstoffe in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie [6]. Sie haben amphiphile Eigenschaften und werden daher in vielen Arten von Formulierungen, wie Fettemulsionen, gemischten Mizellen, Suspensionen und liposomalen Präparaten, verwendet. Ihr natürlicher Ursprung ist ein Vorteil gegenüber synthetischen und aggressiveren Emulgatoren bzw. Tensiden wie Polysorbaten oder Polyoxyethylen Derivaten. Ebenso zeichnen sie sich durch Verfügbarkeit, niedrige Produktionskosten und ökologische Nachhaltigkeit aus.

Phospholipide (PL) sind phosphorhaltige, amphiphile Moleküle und maßgeblich am Aufbau von zellulären Membranen sowie an Transport- und Regelmechanismen des Stoffwechsels beteiligt. Sie bestehen aus einer hydrophilen Phosphorsäureester-Kopfgruppe und lipophilen Fettsäureketten an einem Diacylglycerid-Grundgerüst. Aufgrund ihrer Diversität an Kopfgruppe und am Grundgerüst veresterter Fettsäuren in Bezug auf Kettenlänge und Sättigungsgrad sind sie eine heterogene Substanzklasse mit unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften

In der Literatur gibt es einige Unstimmigkeiten über die Verwendung der Begriffe Lecithin und Phosphatidylcholin. Dies liegt daran, dass in der amerikanischen Literatur Lecithin als Synonym für Phosphatidylcholin verwendet wird, wohingegen Lecithin gemäß den pharmazeutischen Definitionen ein komplexes Gemisch von in Aceton unlöslichen Phosphatiden (d. h. Phospholipiden) aus pflanzlichen Quellen ist [6]. Um zwischen Lecithin und Phosphatidylcholin zu unterscheiden, wird vorgeschlagen, "Lecithin" zu verwenden, um Stoffe zu beschreiben, bei denen weniger als 80% des Gesamtgewichts Phospholipide (und hauptsächlich Phosphatidylcholin) sind und "Phosphatidylcholin", wenn die Substanz mehr als 90 % (m/m) Phosphatidylcholin enthält [7].

Das Phospholipidmolekül umfasst ein Glyceringerüst, das in den Positionen 1 und 2 mit Fettsäuren und in Position 3 mit Phosphat verestert ist. Die systematische Bezeichnung von z.B. Phosphatidsäure (PA) ist 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphat (wobei sn "stereospezifische Nummerierung" bedeutet). In typischen Membranphospholipiden wird die Phosphatgruppe weiter mit einem zusätzlichen Alkohol verestert, beispielsweise in Phosphatidylcholin (PC) mit Cholin, in Phosphatidylethanolamin (PE) mit Ethanolamin, in Phosphatidylglycerol (PG) mit Glycerin und in Phosphatidylinositol (PI) mit Inositol. Ein Phospholipid ohne veresterten Alkohol wird Phosphatidsäure genannt. Abhängig von der Struktur der polaren Region und dem pH-Wert des Mediums sind PE und PC zwitterionisch und haben eine neutrale Ladung bei pH-

Werten von etwa 7, während z. B. PG negativ geladen ist. Abbildung 1 zeigt die Struktur der am häufigsten vorkommenden Phospholipide.

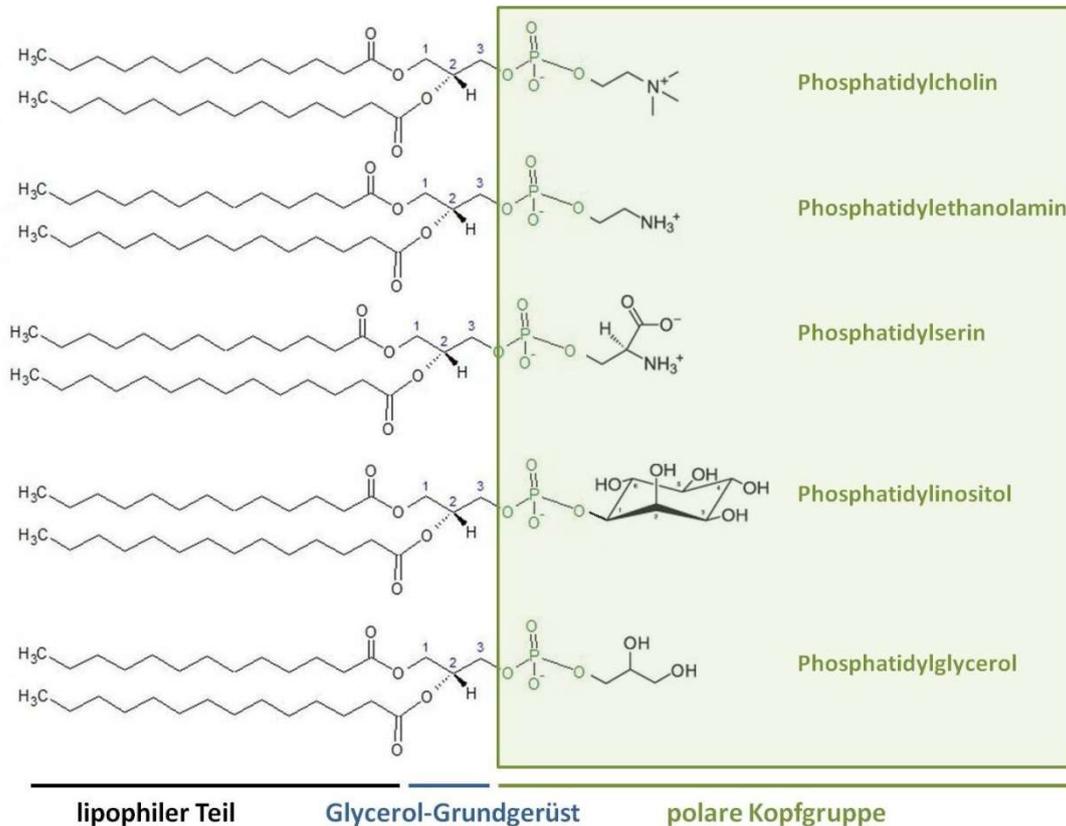


Abbildung 1: Struktur der Phospholipide

Als lipophiler Anteil sind Fettsäuren (FS), darunter Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure und vor allem Linolsäure, an Position 1 und 2 des Glycerin-Grundgerüsts der Pflanzen-PLs verestert. Ei-PLs enthalten zu dem mehrfach ungesättigte FS, wie Arachidonsäure. Dies wiederum hat Auswirkungen auf die lipophilen Eigenschaften, wie z.B. die Phasenübergangstemperatur der PL (ungesättigte FS besitzen eine höhere Phasenübergangstemperatur). In Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen der PLs in Abhängigkeit ihres Ursprungs aufgelistet und die Systematik ihrer Nomenklatur verdeutlicht (LIPOID S für Soja und LIPOID P für non-GMO Soja).

Abhängig von Art und Kettenlänge bzw. Konformation der FS ergeben sich andere Anordnungen der PL aufgrund Unterschiede in der Lipophilie und dem benötigten Platz. Die Strukturen der am häufigsten vorkommenden Fettsäureester sind in Abbildung 2 aufgeführt.

Tabelle 1: FS Zusammensetzung der verwendeten PLs

Ausgangsstoff	Eigenname der PLs	Fettsäure	Anteil [%]
Raps	LIPOID R 50	Palmitinsäure	5 – 8
		Stearinsäure	0 – 1
		Ölsäure	60 – 72
		Linolsäure	23 – 28
		Linolensäure	1 – 3
Sonnenblume	LIPOID H 50	Palmitinsäure	9 – 12
		Stearinsäure	2 – 4
		Ölsäure	14 – 25
		Linolsäure	60 – 72
		Linolensäure	0 – 1
Soja	LIPOID S 45,75,80,100	Palmitinsäure	12 – 17
	LIPOID S LPC 80	Stearinsäure	2 – 5
	LIPOID P 75,100,100-3	Ölsäure	8 – 12
	PHOSPHOLIPON IP 50	Linolsäure	58 – 65
		Linolensäure	5 – 9
Ei	LIPOID E, E 80, E 80 S	Palmitinsäure	27 – 33
		Stearinsäure	11 – 18
		Ölsäure	24 – 30
		Linolsäure	14 – 18
		Linolensäure	1

Eine Modifizierung der Polarität der PLs ist durch den Einsatz verschiedener Enzyme möglich, durch die die PL partiell hydrolysiert werden. Mittels enzymatischer Esterspaltung durch Phospholipase A1 und A2 können natürliche PL in ihrer Acylierung an Position 1 und 2 moduliert werden. Es entstehen Monoacyl-PL, sogenannte Lysolecithine, die aufgrund der fehlenden FS-Kette hydrophileren Charakter erhalten.

Daneben können in den natürlichen PLs auch weitere Substanzen enthalten sein, die aufgrund ihrer polaren Eigenschaften und ihrer Ladungsverhältnisse Auswirkungen auf deren Charakter haben. Weitere, in geringen Anteilen enthaltene Bestandteile der natürlichen Phospholipide sind Sphingomyeline, Triglyceride, freie FS, Cholesterin und Tocopherole.

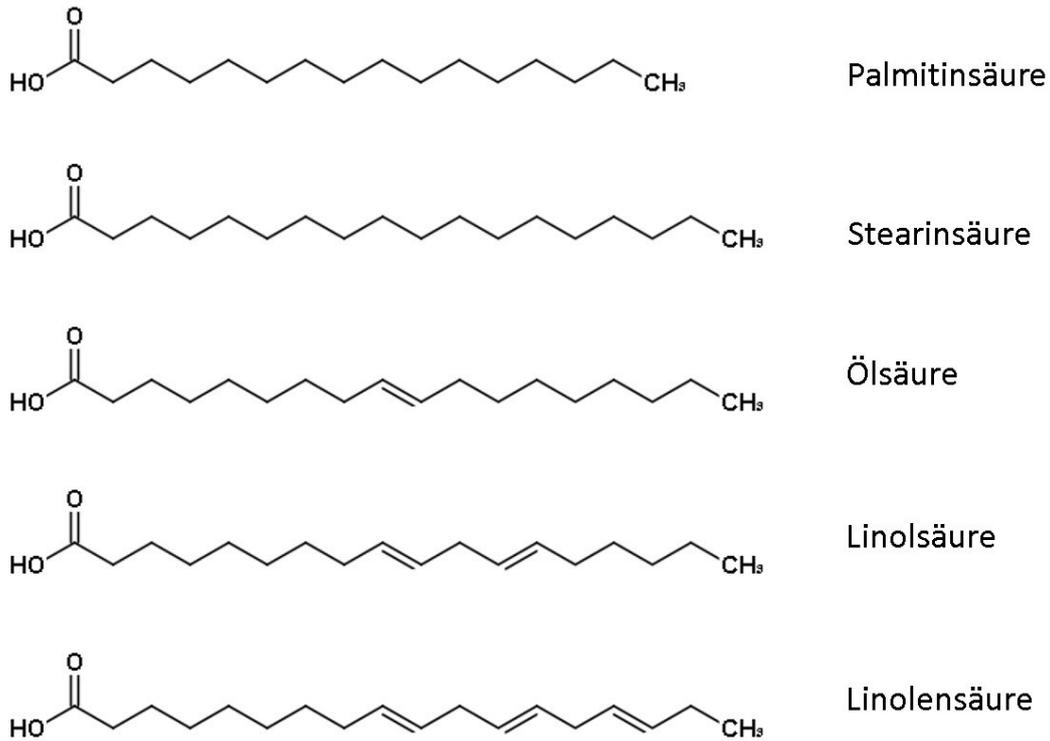


Abbildung 2: Struktur der FFS

Eine Aufstellung der bekannten und dominierenden Bestandteile der verwendeten natürlichen Phospholipide zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung der PLs gemäß Analysenzertifikat

Phospholipid	Anteil PC [%]	Anteil PE [%]	Anteil Lyso-PC [%]
LIPOID S 45	57,4	16	1,5
LIPOID S 75	70,6	7,5	2,5
LIPOID S 80	77	3,9	5
LIPOID S 100	96,7	0,1	0,7
LIPOID S LPC 80	12,8	0	82,7
PHOSPHOLIPON 50 IP	54,1	0	0
LIPOID P 75	69,2	0	3
LIPOID P 100	97,4	0,1	0,3
LIPOID P 100-3	96,4	0	1,1
LIPOID E	70	12,8	2,6
LIPOID E 80 S	70,1	9,5	3
LIPOID E 80	85	15	2
LIPOID H 50	50,7	4,3	0
LIPOID R 50	52,4	11,9	0

2.1.2 Rohmaterialien und Gewinnung natürlicher PLs

Als wichtigster Bestandteil der Lecithine gelten die verschiedenen PL, allen voran das PC, das in allen pflanzlichen und tierischen Zellen präsent ist. Besonders ölige Samen von Pflanzen, wie Soja, Raps und Sonnenblume, eignen sich zur Gewinnung der PL, da sie dort als natürliche Stabilisatoren der in den Öltropfen der Pflanzen gespeicherten Reservestoffe dienen. Als tierischer Ursprung für PLs eignet sich besonders das Eigelb von Hühnereiern.

Bei der Ölextraktion von Pflanzensamen geht ein Teil der PL in das Öl über und ist daher ein wichtiger Ausgangsstoff in der Lecithingewinnung [8]. Nach Extraktion können die PL vom begleitenden Öl leicht abgetrennt werden, da sie in Gegenwart von Wasser quellen und Mizellen ausbilden, die eine höhere Dichte als das Öl aufweisen. Nach Entfernung der Restfeuchte des geklärten Öls folgen Extraktionsschritte in nicht-toxischen Solventien, wie Aceton und Ethanol. Daran schließen sich Reinigungsschritte mittels Chromatographie (HPLC) und geeigneter Verfahren zur Rückgewinnung des Lösungsmittels an. Durch die Wahl eines geeigneten Extraktions- und Aufreinigungsprozesses sind Lecithinfraktionen unterschiedlichen PC-Gehaltes (20 – 98 %) möglich, ebenso wie spezielle Verhältnisse von PL zu unpolaren Lipiden. Die ursprüngliche FS-Komposition der PL bleibt dabei erhalten und ist abhängig vom Rohmaterial. (siehe Tabelle 1)

PL aus Eigelb werden in ähnlicher Weise wie pflanzliche PL durch Extraktion und chromatographische Prozesse gewonnen. Es ist ebenso möglich synthetische PL aus Mannitol mit einer gezielten FS-Komposition zu designen und zu synthetisieren. Dies ist allerdings mit erheblichem Aufwand verbunden im Vergleich zu natürlichen PLs und dadurch für die industrielle Anwendung weniger geeignet.

2.1.3 Anwendungsgebiete der Phospholipide

PL sind als Bestandteil der Zellmembran für den lebenden Organismus unentbehrlich. Aufgrund ihrer Eigenschaften und unterschiedlichen Funktionen können sie u.a. in der Arzneimittel- und Kosmetikproduktion, der Lebensmittelindustrie und bei der Produktion von Pflanzenschutzmitteln eingesetzt werden. Aufgrund ihres natürlichen Ursprungs sind sie besser verträglich als (partiell) synthetische Stoffe. Dies spiegelt sich auch in ihrem Status als GRAS (Generally recognized as safe) Substanzen wider [9].

In der pharmazeutischen Industrie werden Lecithine in vielen Arten von Formulierungen, wie Fettemulsionen, gemischten Mizellen, Suspensionen und liposomalen Präparaten, verwendet. Haupteinsatzgebiete sind dermale und intravenöse Applikationen. Dabei wird besonders die Amphiphilie der PLs genutzt.

Kosmetische Präparate sind überwiegend Emulsionen vom Typ Wasser-in-Öl (W/O) bzw. Öl-in-Wasser (O/W), mit dem Ziel, erweichende, glättende, kühlende und rückfettende

Wirkung zu erreichen. Aufgrund der ausgeprägten amphiphilen Eigenschaft der natürlichen PLs können diese hierbei als Emulgatoren verschiedener Phasenlagen dienen

In der Nahrungsmittelindustrie unter der Zusatzstoffnummer *E 322* gelistet, wird es in großen Mengen als Lebensmittel-Emulgator, z.B. bei der Verarbeitung von Mayonnaise oder Margarine (hier als W/O-Emulgator), beigefügt. Ebenso dient es als Backhilfsmittel und verbessert beispielsweise die Fließeigenschaften bei der Schokoladenherstellung.

Ebenfalls eingesetzt wird Lecithin in Nahrungsergänzungsmitteln mit dem Versprechen auf positive Effekte auf den Cholesterin- und Fettstoffwechsel und der Stärkung von Gehirn- und Nervenzellen. Die Wirksamkeit konnte allerdings bisher in keiner Studie ausreichend belegt werden.

Eine Besonderheit der PL ist die Fähigkeit Liposomen auszubilden. Im Gegensatz zu Mizellen, wie sie viele oberflächenaktive Substanzen ausbilden, bestehen Liposomen aus einer Doppelschicht (Abbildung 3). Es handelt sich hierbei um sphärische Körper mit Durchmessern im Nanometerbereich, die aus einer (unilamellar Vesikel, ULVs) oder mehreren (multilamellare Vesikel, MLVs) Lipiddoppelschichten aufgebaut sind. Sie sind so in der Lage hydrophile Wirkstoffe im Inneren bzw. lipophile Substanzen in der Doppelschicht einzuschließen. Der Vorteil von Liposomen-Membranen ist zudem, dass sie dem Aufbau von natürlichen Zellmembranen nahekommen. Deshalb sind sie gut verträglich und besitzen penetrationsverbessernde Eigenschaften. Auf epikutaner Ebene können sie zusätzlich die Barrierefunktion von geschädigter Haut regenerieren. Letzteres ist vor allem für den therapeutischen Erfolg in der topischen Therapie geschädigter Haut von besonderem Interesse. Entscheidend für den Therapieerfolg von dermalen Zubereitungen ist besonders die Phasenlage. Für die Auswahl geeigneter PLs für das Zustandekommen einer bestimmten Phasenlage kann der HLB-Wert zu Rate gezogen werden [10].

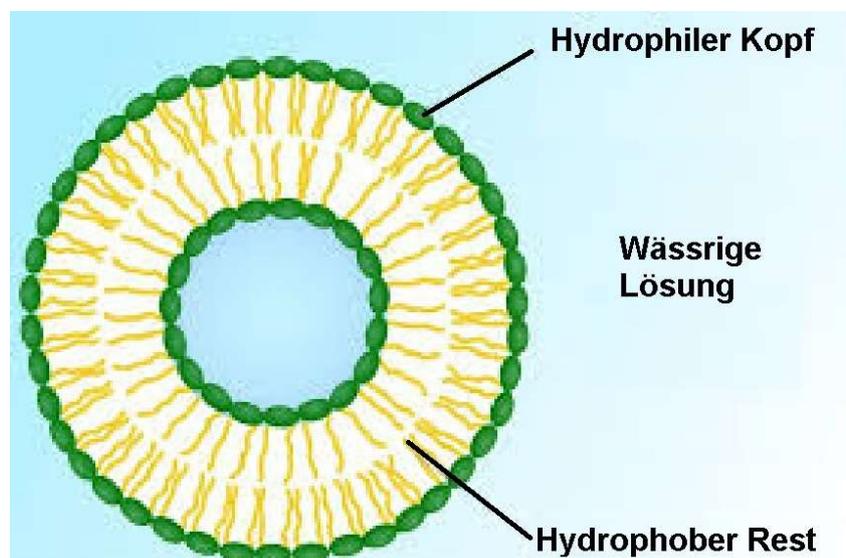


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Liposoms

Lecithin als PL-Gemisch von nicht näher definierten Fraktionen (vgl. 2.1.1), wird in der Literatur mit einem HLB-Wert von ca. 4 angegeben. Der reinen PC-Fraktion wird ein HLB-Wert von ca. 7,4 zugeordnet, während PE einen deutlich geringeren Wert zeigt. Dies kommt durch die deutlich kleinere Kopfgruppe (Ethanolamin) im Vergleich zum Cholin zustande. Grundsätzlich gilt: Je größer der Anteil an polaren Gruppierungen im Gemisch, desto mehr verschiebt sich der HLB-Wert hin zu höheren, hydrophileren Werten, was den PLs ein breites Einsatzgebiet als Emulgatoren ermöglicht (siehe Abbildung 4)

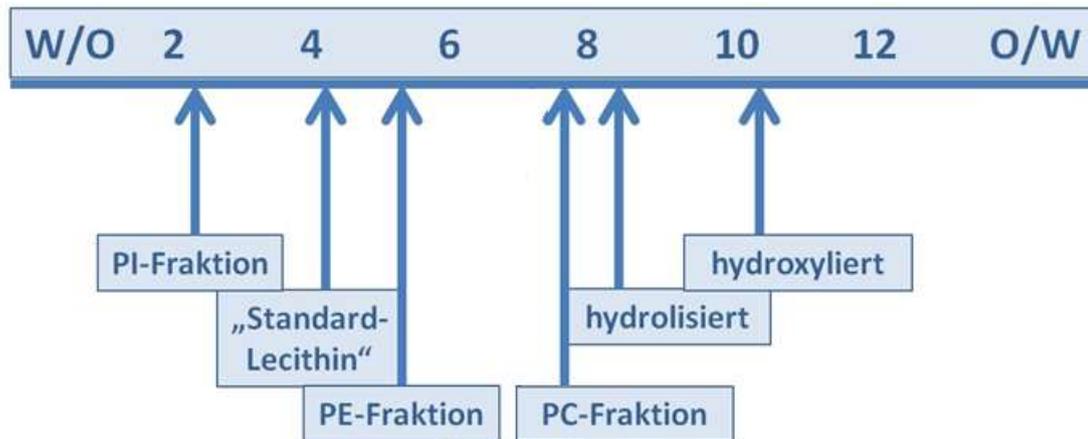


Abbildung 4: HLB-Werte der Lecithinfraktionen

2.2 HLB-Wert

2.2.1 HLB-Wert nach Griffin

Der Begriff der Hydrophilen-Lipophilen Balance (HLB) zur Klassifizierung und Auswahl von Emulgatoren wurde 1949 geprägt[11]. William C. Griffin definierte den Begriff des HLB-Wertes zunächst für nichtionogene Tenside, indem er jeder amphiphilen Substanz einen dimensionslosen Zahlenwert zwischen 0 und 20 zuordnete. Dieser lässt sich sowohl experimentell bestimmen als auch aus dem stöchiometrischen Verhältnis des lipophilen und hydrophilen Anteils des Moleküls errechnen (siehe Gleichung 1)

$$HLB = 20 \left(1 - \frac{M_{lipophil}}{M_{total}} \right) \quad (1)$$

Dabei sind:

$M_{lipophil}$ = Molmasse des lipophilen Teils des Moleküls

M_{total} = Molmasse des gesamten Moleküls

Der HLB-Wert bietet so die Möglichkeit Tenside nach ihren amphiphilen Eigenschaften zu kennzeichnen und sie entsprechend ihrem Verwendungszweck zu klassifizieren (siehe Abbildung 4). Besonders hilfreich ist diese pragmatische Einteilung für die Zubereitungen pharmazeutischer Emulsionen, um Aussagen über Einsatzmöglichkeit, Stabilität und

Inkompatibilitäten treffen zu können. So fand der HLB-Wert große Beachtung in der Kosmetik- und Nahrungsmittelindustrie.

Tabelle 3: HLB-Werte und deren Anwendungsbereiche

HLB-Bereich	Anwendung
4 – 6	W/O-Emulgator
7 – 9	Benetzungsmittel
8 – 18	O/W-Emulgator
13 – 15	Detergenz
15 – 18	Lösungsvermittler

Für die industrielle Nutzung werden meist Emulgator-Mischungen aus lipophilen und hydrophilen Emulgatoren verwendet, um eine bessere Effizienz durch erhöhte Stabilität der Emulsionen bei gleichzeitig niedrigen Einsatzkonzentrationen zu erreichen. Werden zwei Emulgatoren mit bekannten HLB-Werten kombiniert, um ein Öl zu emulgieren, existiert ein Mischungsverhältnis der beiden Emulgatoren, bei dem die Emulsion qualitativ ein Optimum erreicht. Dieser Punkt ist der sogenannte „erforderliche HLB-Wert“ (eHLB-Wert) eines Öls [12]. Dabei sind die Emulgatoren so zu verwenden, dass bestmögliche Stabilität der Emulsionen bei möglichst geringer Phasentrennung über einen bestimmten Zeitraum erlangt wird. Dieser Wert wird durch Gleichung (2) beschrieben.

$$HLB (\text{Öl}) = \frac{w_A HLB_A + w_B HLB_B}{w_A + w_B} \quad (2)$$

Dabei sind:

$eHLB$ = erforderlicher HLB-Wert des Öls

w_x = Anteil des Emulgators x [Dezimale]

HLB_x = HLB-Wert des Emulgators x

In der Original-Methode nach Griffin zur experimentellen Bestimmung des eHLB-Wertes eines Öls werden 2 Emulgatoren bekannten HLB-Wertes in verschiedenen Verhältnissen gemischt und zu einer Emulsion verarbeitet, sodass eine Reihe von Emulsionen mit theoretischen, also errechneten HLB-Werten entsteht, innerhalb derer der eHLB-Wert des zu untersuchenden Öls vermutet wird. Die Emulgator-Kombinationen werden zu gleichen Volumenanteilen mit Wasser und Öl gemischt und geschüttelt. Die daraus resultierenden Emulsionen werden nach Ablauf von 24 Stunden bezüglich ihrer Phasentrennung beurteilt und diejenige

Emulsion der Reihe als die stabilste deklariert, die die geringste Phasenseparation aufweist. Der eHLB-Wert des Öls wird entsprechend der stabilsten Emulsion berechnet.

2.2.2 Theorien und Methodenentwicklung zur HLB-Wert-Bestimmung

In der Literatur sind verschiedene Modifizierungen und Weiterentwicklungen der Originalmethode nach Griffin zur Ermittlung des HLB-Wertes beschrieben. Neben Neuerungen bei der mathematischen Berechnung der „Hydrophile-Lipophile-Balance“ amphiphiler Moleküle sind vor allem Innovationen in der experimentellen Bestimmung festzustellen. Eine Auswahl wird im Folgenden präsentiert:

Davies erkannte bei seinen Koaleszenz-Studien, dass sich der HLB-Wert oberflächenaktiver Substanzen direkt von ihrer chemischen Gleichung ableiten und durch Definition von Gruppennummern berechnen lässt [13]. Dies ermöglichte auch die HLB-Wert-Bestimmung für ionogene Tenside und erweiterte die HLB-Skala durch experimentellen Vergleich der charakteristischen Tensideigenschaften (siehe Gleichung 3). Damit können ionischen Tensiden wesentlich höhere Zahlenwerte als 20 zugeordnet werden.

$$HLB = 7 + m * H_h - n * H_l \quad (3)$$

Dabei sind

<i>HLB</i>	= HLB-Wert des Emulgators
<i>m</i>	= Anzahl hydrophiler Gruppen im Molekül
<i>H_h</i>	= Wert der hydrophilen Gruppe
<i>n</i>	= Anzahl lipophiler Gruppen im Molekül
<i>H_l</i>	= Wert der lipophilen Gruppe

Ebenso wurde nach möglichen Vergleichsparametern zur experimentellen Ermittlung des HLB-Wertes geforscht und dabei vielversprechende Ergebnisse erzielt. Huebner [14] ebenso wie Becher und Birkmeier [15] setzten experimentell ermittelte Retentionszeiten chromatographischer Verfahren in Korrelation zur Hydrophilen-Lipophilen-Balance. Auch fanden Untersuchungen zur linearen Beziehung zwischen HLB-Wert und Dielektrizitätskonstante [16] bzw. der Grenzflächenspannung [17] statt. Aufgrund solcher Korrelationen lässt sich der HLB-Wert präzise bestimmen.

Besonders innovativ sind die Bestimmungen des HLB-Wertes über Endpunkttitrationen nach Greenwald und Middleton [18] und die Weiterentwicklung der Originalmethode nach Griffin von Robbers und Bhatia in Form der „Blender-Centrifuge-Method“ [19], welche im Kapitel 2.2.3 näher beschrieben wird.

2.2.3 Methodenwahl zur HLB-Wert-Bestimmung (Blender-Centrifuge-Method)

Eine rein rechnerische Methode zur HLB-Wert Bestimmung durch Zuteilung von Gruppennummern nach *Davies* ist für natürliche PLs aufgrund deren variabler Zusammensetzung nicht geeignet. Auch bei bekannter und stabiler Zusammensetzung würde die Berechnung an ihre Grenzen stoßen, da nicht allen vorhandenen funktionellen Gruppen entsprechende numerische Werte zugeordnet sind.

Daher verbleiben nur experimentelle Methoden zur Bestimmung der HLB-Werte wie die Blender-Centrifuge-Methode, die eine Weiterentwicklung der Originalmethode nach Griffin darstellt. Die Besonderheit der Methode liegt darin, dass mit Hilfe eines Homogenisators ausreichend stabile Emulsionen zur Erstellung einer Emulsionsreihe hergestellt werden. Diese werden anschließend zentrifugiert, um die sich einstellende Phasenseparation zu beschleunigen. Bei den so gewonnenen Emulsionen wird der Anteil an verbliebener stabiler Emulsion direkt im Zentrifugenröhrchen vermessen. Der Vorteil der beschriebenen Methode liegt in der direkten Ermittlung des bestimmten HLB-Wertes. Dieser Ansatz ist anderen Bestimmungsmethoden, welche sich der Retentionszeiten oder Dielektrizitätskonstanten bedienen, überlegen. Die Vorzüge der „Blender-Centrifuge“-Methode liegen dabei im geringen Zeit-, Kosten- und Materialaufwand. Daher wurde diese Methode als Grundlage der HLB-Wert-Bestimmung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt und wie in Kapitel 3.1 beschrieben modifiziert.

2.3 Zeta-Potential

Das Zeta-Potential beschreibt das elektrokinetische Potential in kolloidalen Dispersionen. Liegen geladene Partikel dispergiert vor, bilden sich elektrische Potentiale an verschiedenen räumlichen Punkten um den Partikel aus. Ausschlaggebend ist hierbei die Nettoladung der dispergierten Partikel und die Ionen des Dispersionsmediums.

Das elektrische Oberflächenpotential ist das Potential direkt auf der Oberfläche des Partikels, welches aufgrund seiner intrinsischen Ladung entsteht. Es ist nur durch direkten Kontakt einer Elektrode mit der Oberfläche des Partikels messbar und erfordert daher eine gewisse Mindestgröße der Probenoberfläche.

Da die elektrostatischen Kräfte mit weiterer Entfernung vom Partikel immer stärker abnehmen, ist nur ein kleiner Teil der Ionen direkt an die Partikeloberfläche gebunden. Diese lagern sich zu einer sogenannten Stern-Doppelschicht fest zusammen. Angrenzend gibt es eine diffuse Schicht locker assoziierter Ionen um den Partikel. Aufgrund von Kompensation durch die Ionen des Mediums erscheinen die dispergierten Partikel nach außen hin neutral[20].

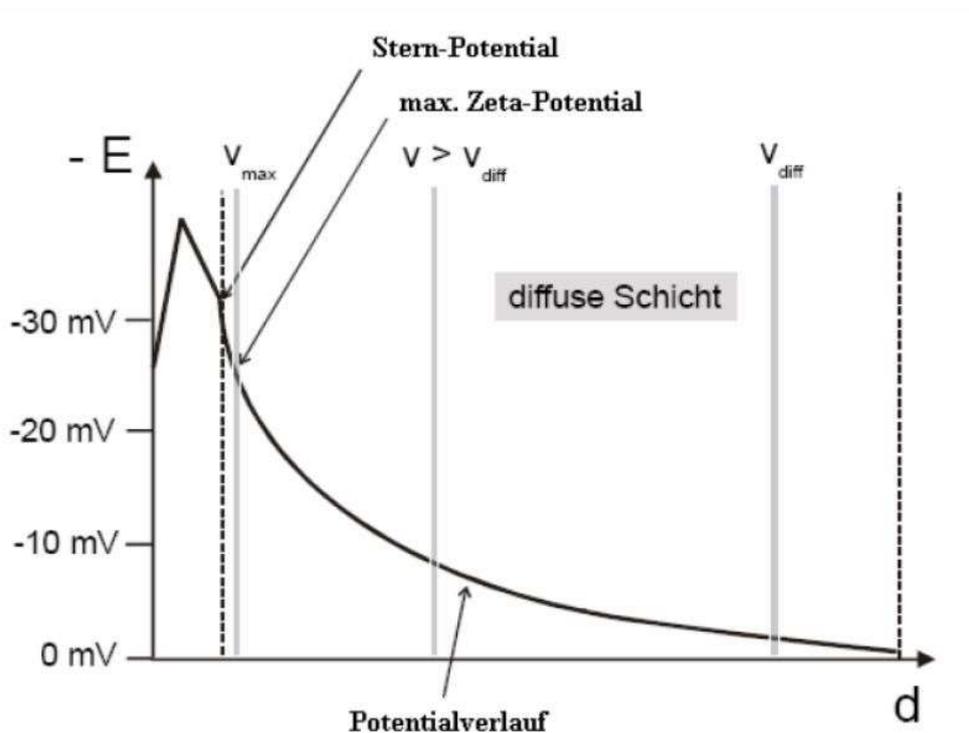


Abbildung 5: Elektrische Potentiale in Entfernung zur Partikeloberfläche (modifiziert nach Glawdel [16])

Das Stern-Potential ist das Potential an der Grenzflächen-Doppelschicht zwischen den an der Oberfläche haftenden Ionen und der diffusen Schicht um sie herum. Es ist zu beachten, dass die diffuse Schicht durch elektrostatische Wechselwirkungen an den Partikeln gebunden ist. Abbildung 5 zeigt die Unterschiede zwischen diesen verschiedenen Potentialtypen und ihrer Lokalisation.

Die Deklaration einer Stern-Doppelschicht ist eine Weiterentwicklung der Theorien von Helmholtz, welcher von einer starren doppelschichtigen Anlagerung von Ionen um einen Partikel ausging, und der Guoy-Chapman-Doppelschicht, welche die thermische Bewegung der Lösungsmittelmoleküle und der Ionen berücksichtigt.

Bewegt sich der Partikel im Dispersionsmedium, so können nicht alle diffus verteilten Ionen aufgrund von Reibung im gleichen Maße der Bewegung folgen. Es kommt zu einer sogenannten Abscherung von Ionen um den Partikel herum. Aufgrund des Verlustes an kompensierenden Ionen erhält der Partikel ein elektrisches Potential. Dieses Potential an der Abscherebene wird als Zeta-Potential bezeichnet. Es drückt den Potentialunterschied zwischen dem Dispersionsmedium und der Schicht von Fluidteilchen aus, die stationär an den dispergierte Partikel gebunden sind. Diese Lokalisation ist der Unterschied des Zeta-Potentials zu dem elektrischen Oberflächenpotential oder dem Stern-Potential. Das Zeta-Potential wird häufig zur Quantifizierung der Ladungsgröße von Partikeln verwendet. Das Oberflächenpotential

oder das Stern-Potential beschreiben die elektrostatischen Eigenschaften eines Partikels genauer als das Zeta-Potential, ließen sich aber nur durch direkte Messung mit einer Elektrode bestimmen. Daher ist das Zeta-Potential häufig der einzige verfügbare Weg zur Charakterisierung von Doppelschichteigenschaften.

Für die experimentelle Bestimmung des Zeta-Potentials wird häufig die elektrophoretische Mobilität der Partikel genutzt, welche direkt proportional zum Zeta-Potential ist (siehe Gleichung (4)).

$$\mu_e = \frac{2}{3} * \frac{\varepsilon * \zeta * f(\kappa\alpha)}{\eta} \quad (4)$$

Dabei sind:

μ_e	=	<i>elektrophoretische Mobilität</i>
ε	=	<i>Dielektrizitätskonstante der Probe</i>
ζ	=	<i>Zeta-Potential</i>
$f(\kappa\alpha)$	=	<i>Henry-Funktion</i>
η	=	<i>dynamische Viskosität der Flüssigkeit</i>

Die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität erfolgt häufig mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und einer speziellen Messzelle, welche ein elektrisches Feld innerhalb der Küvette entstehen lässt. Durch dieses Feld werden die geladenen Partikel beschleunigt. Diese Beschleunigung lässt sich analysieren und unter Voraussetzung der Kenntnis der anderen Parameter in die elektrophoretische Mobilität umrechnen.

Das Zeta-Potential ist ein Schlüsselindikator für die Stabilität kolloidaler Dispersionen respektive Emulsionen. Die Größe des Zeta-Potentials gibt den Grad der elektrostatischen Abstoßung zwischen benachbarten, ähnlich geladenen Teilchen in einer Dispersion an. Für Moleküle und Partikel, in einem entsprechenden Größenbereich, verleiht ein hohes Zeta-Potential Stabilität, d.h. die Lösung oder Dispersion widersteht der Aggregation. Wenn das Potential klein ist, können Anziehungskräfte diese Abstoßung überschreiten, die Dispersion kann also brechen und ausflocken. So werden Kolloide mit hohem Zeta-Potential (negativ oder positiv) elektrisch stabilisiert, während Kolloide mit niedrigem Zeta-Potential dazu neigen zu koagulieren oder auszuflocken.

2.4 Monolayer (Monoschichten) und Langmuir-Blodgett-Filme

Viele in Wasser nahezu unlösliche Substanzen wie langkettige Fettsäuren, bestimmte Alkohole und amphiphile Moleküle können aus einem Lösungsmittel auf eine Wasseroberfläche aufgebracht werden. Dabei formen sie u.a. eine Monoschicht (Langmuir-Blodgett-Film) auf der Wasseroberfläche, bei dem die hydrophilen Enden zum Wasser hinzeigen und die hydrophoben Ketten den Wasserkontakt möglichst minimieren, indem sie sich zur Luft ausrichten.

Die Untersuchung der Struktur von Monoschichten auf einer Wasseroberfläche erfolgt unter anderem durch Messung der Isotherme im Oberflächendruck–Flächen-Diagramm. Der Oberflächendruck π ist die Verringerung der Oberflächenspannung der Wasseroberfläche durch die Monoschicht. Dieser Druck ist also jener, welcher der normalen Kontraktion der Oberfläche durch die Oberflächenspannung entgegensteht. In sogenannten Langmuir-Blodgett-Trögen (auch Filmwaagen genannt) wird die aufgetragene Monoschicht durch eine bewegliche Barriere kontrolliert zusammengedrückt. Der dabei entstehende Druck auf eine weitere Barriere wird gemessen. Die Form der so erhaltenen Oberflächendruck-Flächen-Isotherme hängt von den internen Wechselwirkungen und der molekularen Ordnung der Monoschicht ab. Dieser wird durch Faktoren wie Größe der Kopfgruppe, mögliche polare Gruppen, Anzahl der Kohlenwasserstoffketten und deren Konformation bestimmt.

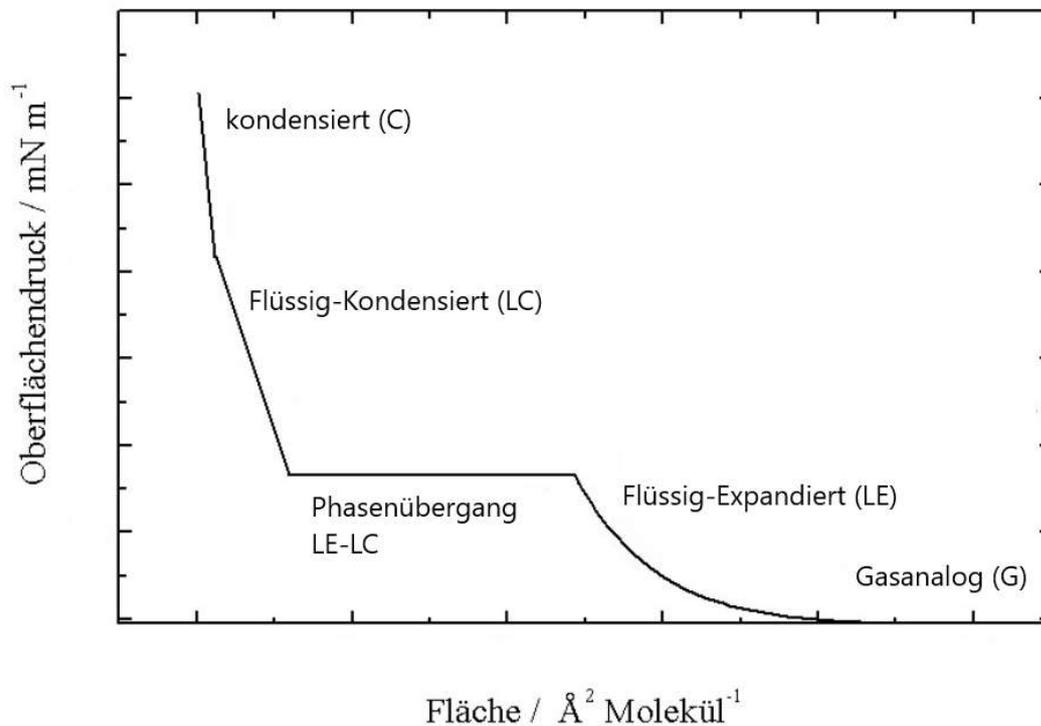


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Oberflächendruck-Flächen-Isotherme

In Abbildung 6 ist der prinzipielle Verlauf einer Oberflächendruck–Flächen-Isotherme dargestellt. Da die Moleküle nach Auftragen auf das Wasser eine relativ große Fläche je Molekül einnehmen, lässt sich die Isotherme entsprechend eines zweidimensionalen idealen Gases annehmen. Wird der Film komprimiert findet ein Übergang von der angenommenen Gasphase in eine so genannte flüssig-kondensierte („Liquid-Condensed“) LC-Phase statt. Dieser erste Punkt der Registrierung von Druck auf die Messbarriere wird als „Lift-Off“-Punkt bezeichnet. Hierbei sind die Moleküle relativ dicht gepackt, aber eine thermische Beweglichkeit der hydrophoben Ketten ist noch gegeben. Hierbei können sich zunächst einzelne Inseln der LC-

Phase ausbilden, die sich bei weiterer Flächenreduktion zunächst zu größeren Aggregaten und dann zu einem geschlossenen Film kondensieren.

In einigen Monoschichten (u.a. bei kürzeren Fettsäuren) findet sich vor der LC-Phase oder anstelle dieser eine sogenannte flüssig-expandierten („Liquid-Expanded“) LE-Phase, in der die Molekülkonzentration je Flächeneinheit noch deutlich geringer ist als in der LC-Phase. In dieser Phase sind die aliphatischen Ketten noch wie in flüssigem Zustand.

Eine weitere Zunahme der Dichte innerhalb der geordneten Monoschicht und damit eine steigende repulsive Wechselwirkung der Moleküle untereinander führt zu einer Umorientierung der Kohlenstoffketten und damit zu einer Änderung der Konformation. Das Erreichen dieser dichtesten möglichen Anordnung charakterisiert einen neuerlichen Phasenübergang hin zu einem zweidimensionalen Kristall, der so genannten kondensierten („Condensed“) C-Phase.

Der Vergleich von Molekülen oder Substanzgemischen und deren Verhalten bzw. Ausbleiben von Phasenübergängen lässt Rückschlüsse auf die Anordnung und die Interaktionen in der gebildeten Monoschicht zu. Dabei ist die Betrachtung der Langmuir-Isothermen alleine meist nicht ausreichend für die Charakterisierung der Strukturen.

2.5 Kleinwinkelröntgenstrahlung (SAXS)

Bei der Bestrahlung von kristallinen Festkörpern mit dreidimensionalen Gittern mit Röntgenstrahlung kommt es zu konstruktiver Interferenz von gestreuter Strahlung. Montiert man hinter der zu bestrahlenden Probe einen geeigneten Detektor, um die abgelenkten Strahlungsanteile sichtbar zu machen, entstehen darauf charakteristische Muster (siehe Abbildung 7)[21].

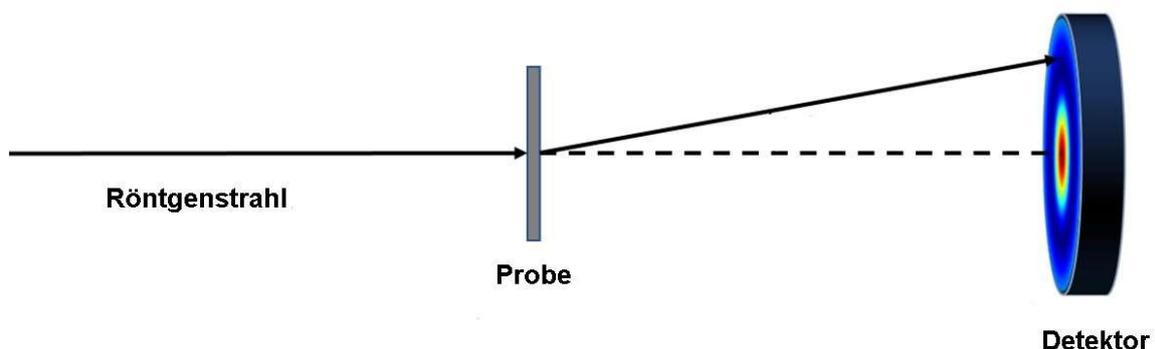


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der Kleinwinkelröntgenstreuung (modifiziert nach de-Vela [17])

Diese Wellenmuster entstehen aufgrund des periodischen Abstands der Gitterebenen und werden durch die Braggsche Gleichung (Gleichung 5) beschrieben.

$$n * \lambda = 2d \sin(\theta) \quad (5)$$

Dabei sind:

n = Beugungsordnung
λ = Wellenlänge der Röntgenstrahlung
θ = Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene
d = Abstand zwischen den Gitterebenen

Aus der Braggschen Gleichung geht hervor, dass mit abnehmendem Streuwinkel immer größere Strukturmerkmale erfasst werden. Die Messungen bei der Kleinwinkelröntgenstreuung erfolgen bei sehr kleinen Winkeln, in der Regel im Bereich von 0,1° bis 5°. Ein SAXS-Signal wird immer dann beobachtet, wenn eine Probe Strukturmerkmale in der Größenordnung von wenigen Nanometern aufweist.

Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die untersuchten Kristalle eine bestimmte Dicke haben und somit eine ausreichende Anzahl paralleler Gitterebenen mit entsprechendem Abstand vorhanden sind. Wenn, wie im vorliegenden Fall, die Untersuchung der Kristallstruktur an einer pulverartigen Substanz vorzunehmen ist, hat das eine Verbreiterung der Röntgenreflexe zur Folge. Diese kann bei sehr kleinen Kristallen (< 200 nm) durch die Scherrer-Gleichung (Gleichung 6) beschrieben werden.

$$L = \frac{K * \lambda}{\Delta(2\theta) * \cos \theta_0} \quad (6)$$

Dabei sind:

Δ(2θ) = Die Halbwertsbreite des Reflexes im Bogenmaß
λ = Wellenlänge der Röntgenstrahlung
K = der Scherrer-Formfaktor
L = Ausdehnung des Kristalls senkrecht zu den Ebenen des Reflexes
θ₀ = Braggscher Winkel

Bei der SAXS-Messung wird ein monochromatischer Röntgenstrahl auf eine Probe gebracht, von der ein Teil der Röntgenstrahlen gestreut wird, während die meisten Strahlen durch die Probe gehen, ohne mit ihr zu interagieren. Deshalb muss ein sehr dünner und dennoch hochintensiver Röntgenstrahl erzeugt werden, um das vergleichsweise schwache Streusignal der Probe in unmittelbarer Nähe des direkten Strahls messen zu können. Außerdem ist es wichtig, einen Detektor mit einer hohen Linearität, einem hohen Dynamikbereich und einem vernachlässigbaren Eigenrauschen zu verwenden.

Das Hauptproblem, das bei SAXS-Messinstrumenten überwunden werden muss, ist die Trennung der schwachen Streuintensität vom starken Hauptstrahl. Je kleiner der gewünschte Winkel ist, desto schwieriger wird dies. Das Problem ist vergleichbar mit dem Versuch, ein schwach strahlendes Objekt wie die Sonnenkorona zu beobachten. Nur wenn der Mond die Sonne bedeckt, wird die Korona sichtbar. Ebenso muss bei SAXS der nicht gestreute Strahl, der sich lediglich durch die Probe bewegt, blockiert werden, ohne die eng benachbarte gestreute Strahlung zu beeinträchtigen. Dies wird häufig durch eine Fokussierung der ausgehenden Röntgenstrahlung erreicht.

SAXS ist eines der vielseitigsten Verfahren für die strukturelle Charakterisierung von Materialien im Nano-Bereich. Die Methode ist akkurat, nicht-destruktiv und benötigt nur ein Minimum an Probenvorbereitung. Mögliche Proben können dabei Feststoffe, Pulver, Gele oder flüssige Dispersionen in amorphen, kristallinen oder halbkristallinen Zustand sein. Als Kollektivverfahren werden bei SAXS strukturelle Merkmale über ein großes Probenvolumen gemittelt.

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Grundlagen der Mikroskopie

Das Wort Mikroskopie leitet sich von den griechischen Begriffen „mikros“ (dt. klein) und „skopein“ (dt. betrachten) ab. Demzufolge liegt der Nutzen eines Mikroskops in der Vergrößerung von Objekten, die vom menschlichen Auge nicht hinreichend erfasst bzw. aufgelöst werden können.

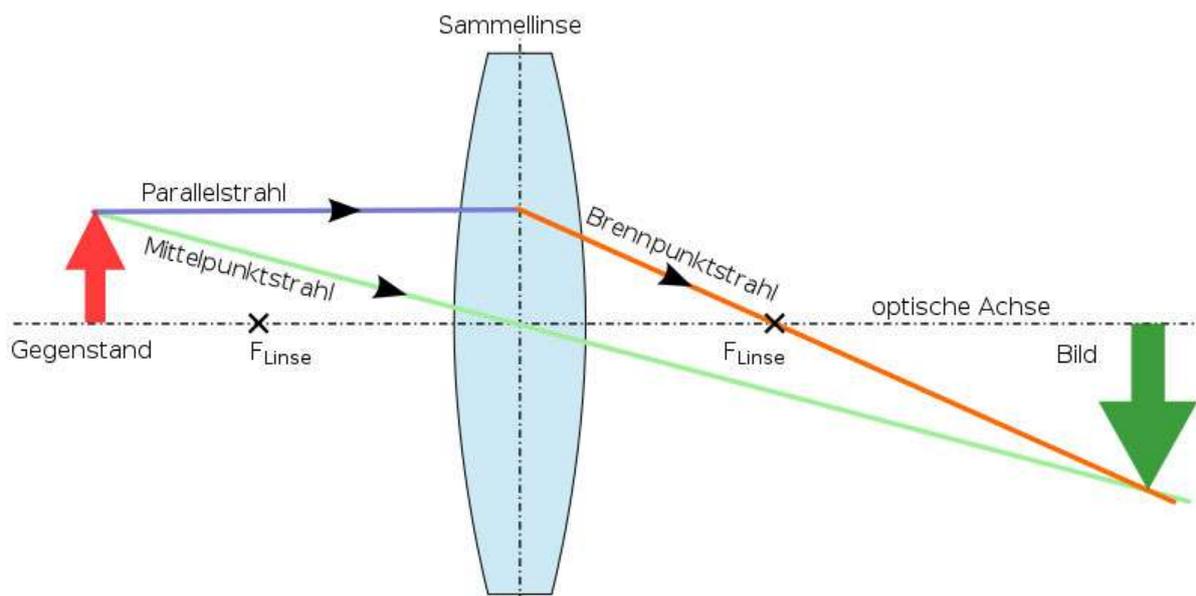


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Strahlengangs

In der optischen Mikroskopie wird die vergrößernde Wirkung durch Abbilden des Objekts mittels Linsen erreicht. Hierdurch unterscheidet sich die Licht- von der Elektronenmikroskopie,

bei der elektrische oder magnetische Felder zum Einsatz kommen. Um die Vergrößerung zu quantifizieren, die sich mit einem Lichtmikroskop erreichen lässt, ist eine geometrische Betrachtung des optischen Strahlengangs zweckmäßig. Wie Abbildung 8 schematisch zeigt, kann bereits mit einer Sammellinse ein Gegenstand vergrößert abgebildet werden. Für zusätzliche Vergrößerungen lassen sich auch zwei oder mehrere Sammellinsen kombinieren.

Im Laufe der Jahrhunderte wurden verschiedene Varianten der Mikroskopie eingeführt, um eine Erhöhung der Vergrößerung und des Kontrasts zu erreichen. Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopiertechniken kurz vorgestellt.

2.6.2 Dunkelfeldmikroskopie

Die Dunkelfeldmikroskopie ist eine seit langem genutzte Variante der Lichtmikroskopie. Sie führt zu einem dunklen Bildhintergrund, vor dem sich die zu beobachtenden Strukturen hell abheben. Dadurch können durchsichtige Objekte mit nur sehr geringem Kontrast sehr gut aufgelöst und kontrastreich abgebildet werden, ohne dass eine vorherige Färbung des Objektes erforderlich ist. In Abgrenzung zur Dunkelfeldmikroskopie wird die Technik der herkömmlichen Lichtmikroskopie als Hellfeldmikroskopie bezeichnet.

Das Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie beruht darauf, dass zu untersuchende Objekte das auftreffende Licht nicht nur absorbieren oder hindurchlassen, sondern auch immer Teile des Lichtstrahls ablenken. Wenn die Beleuchtung so eingestellt ist, dass die direkten Strahlen der Lichtquelle nicht in das Objektiv des Mikroskops gerichtet sind, ist nur das abgelenkte Licht sichtbar [22]. Es gibt dabei unterschiedliche Ursachen für die Ablenkung des Lichtstrahls. Eine der Ablenkungsursachen ist die Streuung von Licht an den Grenzen von Objekten (Tyndall-Effekt). Ebenso lenken Teilchen, die kleiner sind als die Auflösungsgrenze des Mikroskops, das Licht ab und lassen sich daher ebenfalls mit einem Dunkelfeldmikroskop nachweisen.

Die Lichtquelle kann unter dem Präparat angebracht sein (Durchlicht) oder über diesem (Auflicht). Durchlicht- und Auflicht-Beleuchtung ist dabei sowohl für Hellfeld- als auch für Dunkelfeld- Mikroskope möglich.

2.6.3 Polarisationsmikroskopie

Die Verwendung von polarisiertem Licht ist eine weitere kontrastverstärkende Technik. Solche Mikroskope weisen ein hohes Maß an Sensitivität auf und können sowohl für quantitative als auch für qualitative Studien verwendet werden. Die Qualität des mikroskopischen Bildes ist bei Untersuchung von optisch anisotropen (doppelbrechenden) Proben im Vergleich zu anderen Techniken wie Dunkelfeld- und Hellfeldbeleuchtung entscheidend verbessert. Als Beispiele für anisotrope Objekte seien Kristalle oder Mineralien mit entsprechendem Kristallgitteraufbau (Eigendoppelbrechung) genannt oder auch Materialien, die aufgrund ihrer Anordnung und Orientierung doppelbrechende Eigenschaften entwickeln. Auch vormals isotrope

Materialien können durch Einwirkung von mechanischen Kräften eine sogenannte Spannungsdoppelbrechung entwickeln.

Zusätzlich zu einem gewöhnlichen Lichtmikroskop enthält ein Polarisationsmikroskop zwei Polarisationsfilter und einen meist drehbaren Objektisch. Manchmal werden auch sog. Kompensatoren verwendet, um die Effekte (Kontraste) zu verstärken oder die Stärke der Doppelbrechung zu analysieren.

Bei diesem Typ der Mikroskopie befindet sich unterhalb des Objektisches einer der Polarisationsfilter, Polarisator genannt, der das Licht linear polarisiert. Dessen Schwingungsrichtung ist parallel zum Polarisator orientiert. Oberhalb des Objektisches befindet sich ein zweiter Polarisationsfilter, der als Analysator bezeichnet wird und gegenüber dem ersten um 90° versetzt ist. Die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes vom Polarisator ist dadurch so orientiert, dass es vom Analysator vollständig blockiert wird. Daher erscheint das mikroskopische Bild schwarz.

Befindet sich auf dem Objektisch zwischen den beiden Polarisationsfiltern ein Objekt, so können sich die optischen Bedingungen ändern. Durch eine Änderung der Polarisationsebene kommt es nicht mehr zur vollständigen Auslöschung – ein Teil des Lichtes dringt durch den Analysator und entsprechende Strukturen werden sichtbar. Auch ist es möglich, durch Interferenz auftretende Farben zu beobachten. Optisch isotrope Materialien verändern die Schwingungsrichtung nicht, weshalb sie im mikroskopischen Bild dunkel bleiben.

2.6.4 Brewster-Angle-Mikroskopie

Eine weitere mikroskopische Variante ist die Brewster-Angle-Mikroskopie (BAM). Sie nutzt den reflexionsfreien Zustand, der auftritt, wenn polarisiertes Licht unter einem bestimmten Einfallswinkel zu einer Luft-Wasser-Grenzfläche geführt wird. Dieser Winkel wird als Brewster-Winkel bezeichnet und kann durch das Snelliussche Brechungsgesetz bestimmt (Gleichung 7) werden. Er hängt von den Brechungsindizes der Materialien im optischen System ab. Dabei nimmt das Mikroskop jenes Licht auf, das von der Flüssigkeitsoberfläche reflektiert wird.

$$\tan \alpha = \frac{n_1}{n_2} \quad (7)$$

Dabei sind:

α = Brewster Winkel (Bogenmaß)

n_1 = Brechungsindex von Luft (≈ 1)

n_2 = Brechungsindex von Wasser ($\approx 1,33$)

Der Brewster-Winkel für die Luft-Wasser-Grenzfläche beträgt 53° . Unter dieser Bedingung erscheint das mikroskopische Bild einer reinen Wasseroberfläche schwarz. Das

Hinzufügen von Material zur Luft-Wasser-Grenzfläche verändert den lokalen Brechungsindex und bewirkt, dass eine kleine Menge Licht reflektiert und damit sichtbar wird. Das angezeigte Bild enthält Bereiche unterschiedlicher Helligkeit, die durch die jeweiligen Moleküle und Packungsdichten des gesamten Präparates bestimmt werden.

Brewster-Angle-Mikroskope ermöglichen beispielsweise die Visualisierung von Langmuir-Monoschichten oder Adsorbatfilmen an der Luft-Wasser-Grenzfläche, beispielsweise als Funktion der Packungsdichte. Sie können entweder verwendet werden, um die Eigenschaften der Langmuir-Schicht zu untersuchen oder um einen geeigneten Druck für die Abscheidung von Langmuir-Blodgett-Filmen anzuzeigen.

2.6.5 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Elektronenmikroskope unterscheiden sich von den klassischen Lichtmikroskopen in einigen Punkten. Doch auch hier ist das Auflösungsvermögen von der verwendeten Wellenlänge abhängig. Da beschleunigte Elektronen eine sehr viel kürzere Wellenlänge als sichtbares Licht haben, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (etwa 0,1 nm) erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop (etwa 200 nm).

Für das ESEM-Verfahren dient ein Rasterelektronenmikroskop, welches mit einem elektronenoptischen System elektromagnetischer und elektrostatischer Linsen einen feinen Elektronenstrahl erzeugt. Dieser wird anschließend zeilenweise über den zu untersuchenden Objektbereich geführt (es wird „gerastert“). Das Bild entsteht dabei durch die synchrone Registrierung eines vom Elektronenstrahl ausgelösten oder beeinflussten Signals. Die durch diese Wechselwirkung erzeugten Bilder weisen eine hohe Tiefenschärfe der Oberflächen der untersuchten Objekte auf.

Im Gegensatz zur konventionellen Rasterelektronenmikroskopie befindet sich die Probenkammer nicht im Hochvakuum, sondern sie enthält ein Gas mit einem Gasdruck von typischerweise 130 bis 1300 Pascal. Als Gase eignen sich unter anderem Wasserdampf, Stickstoff oder Luft. Dabei wird das Gas in der Probenkammer zur Signalverstärkung genutzt. Durch eine angelegte Spannung von einigen hundert Volt zwischen Probe und Detektor werden die Sekundärelektronen zum Detektor hin beschleunigt. Auf dem Weg zum Detektor kommt es zu Stößen zwischen den Elektronen und den Gasatomen, welche neue Elektronen entstehen lassen. Diese Elektronen werden registriert und aus den Signalen ein Bild konstruiert.

Durch die Verwendung von Gasen besitzt diese Variante der Rasterelektronenmikroskopie einige Vorteile gegenüber dem klassischen Aufbau. Es können unter anderem nicht vakuumstabile Proben bei erhöhtem Restgasdruck in der Probenkammer untersucht werden. Auch müssen keine speziellen Präparationstechniken für nichtleitende Proben verwendet werden, um die entsprechenden Oberflächen leitfähig zu machen. Das Gas selbst wird als

Detektionsmedium verwendet, wodurch im Gegensatz zu Vakuum-Detektoren neue Bildgebungsmöglichkeiten entstehen. Außerdem können Proben schneller und einfacher untersucht werden. Diese Eigenschaft ergibt sich durch das Entfallen von komplexen und zeitaufwändigen Vorbereitungsmethoden. Oberflächen werden deshalb nicht mehr verändert und signifikant weniger Artefakte erzeugt. Gas-, Flüssigkeit- oder Feststoff-Wechselwirkungen können dynamisch in situ und in Echtzeit untersucht oder für eine Nachbearbeitung aufgezeichnet werden. Ein Temperaturbereich von unter 0° C bis über 1000° C und die Analyse von frischen oder sogar lebenden biologischen Proben ist per ESEM möglich.

Nachteile der Methode sind die schlechte Realisierbarkeit von kleinen Vergrößerungen (< 50-fach) sowie geringere Bildaufbauzeiten aufgrund langsamerer Rastergeschwindigkeiten. Außerdem sind die Mikroskop-Modelle mit ESEM-Funktion durch den komplizierten Aufbau verhältnismäßig teuer und wartungsaufwendig.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der HLB-Analysemethode

Die zu Grunde liegende HLB-Bestimmungsmethode mit Zentrifugation der Emulsion nach *Robbers und Bhatia* zielt auf eine Bestimmung des e-HLB-Wertes der verwendeten Ölphase ab. In der Original-Publikation konnte gezeigt werden, dass eine beschleunigte Entmischung der Phasen und eine anschließende semiquantitative Bewertung der erfolgten Entmischung für eine valide Bestimmung des HLB-Wertes genutzt werden kann. Die Methode liefert vergleichbare Ergebnisse für die Bestimmung des HLB-Wertes wie die ursprünglich von *Griffin* entwickelte Methode zur HLB-Charakterisierung.

Da im Rahmen der Arbeit die HLB-Werte von Emulgatoren (PLs), statt der lipophilen Phase bestimmt werden sollten, war eine leichte Adaption der Methodik hinsichtlich Präparation der Stammemulsionen und der verwendeten Mischungsverhältnisse notwendig.

3.1.1 Anpassung der Gleichung nach Griffin

Da die nicht bekannten HLB-Werte der verwendeten PLs bestimmt werden sollten, musste die Gleichung nach *Griffin* zur Berechnung des eHLB-Wertes umgestellt werden. Gleichung 2 (Kap.2.1.1) drückt dabei die Additivität der HLB-Werte von Emulgatoren aus. Bei Mischung verschiedener amphiphiler Substanzen lässt sich der kombinierte HLB-Wert als Summe der mengenmäßigen Anteile der einzelnen Substanzen verstehen.

Im vorliegenden Fall entspricht der unbekannte HLB-Wert des verwendeten natürlichen PLs dem Wert HLB_B in Gleichung 2. Damit entspricht die Gleichung zur Berechnung des unbekanntes HLB-Wertes nach Umstellung der Gleichung 8.

$$HLB_B = \frac{eHLB_{\text{öl}} * (w_A + w_B) - w_A * HLB_A}{w_B} \quad (8)$$

Dabei sind:

- $eHLB_{\text{öl}}$ = erforderlicher HLB-Wert des Öls
- w_x = Anteil des Emulgators x [Dezimale]
- HLB_x = HLB-Wert des Emulgators x

3.1.2 Auswahl der Parameter zur HLB-Wert-Bestimmung

Die Adaption der Methode nach *Robbers und Bhatia* setzt für den experimentellen Teil eine Überprüfung der Versuchsmethodik und des angewendeten Setups voraus. Wichtig für die praktische Anwendung ist, dass die beiden verwendeten Emulgatoren in der lipophilen Phase, in diesem Fall also in dem jeweils verwendeten Öl, löslich sind. Weiterhin müssen beide Emulgatoren hinreichend kompatibel miteinander sein, also keine physikalischen oder chemischen Interaktionen eingehen, welche die Stabilität der herzustellenden Emulsionen beeinträchtigen und damit die Aussage der experimentellen Bestimmung verfälschen würden.

Deshalb ist für die experimentelle Bestimmung des HLB-Wertes die Auswahl einer geeigneten lipophilen Phase und eines geeigneten Partneremulgators Voraussetzung. Den zu verwendenden Partneremulgatoren und Ölen sind hierbei aufgrund ihrer HLB-Werte bzw. eHLB-Werte Grenzen gesetzt. Besagte Grenzen ergeben sich aus der amphiphilen Natur der PLs und dem dadurch eingeschränkten Bereich des HLB-Wertes, welcher rechnerisch gemäß Gleichung 8 bestimmt werden kann. Ebenso kann es außerhalb eines bestimmten HLB-Bereiches zu nicht mehr untereinander vergleichbaren Mechanismen für die Instabilitäten der hergestellten Emulsionen kommen.

Daher wurde im Rahmen von Vorversuchen ein geeigneter hydrophiler Partneremulgator ermittelt, mit dem der zu erwartende HLB-Wert der PLs errechnet werden kann. Im Anschluss wurde dessen optimale Einsatz-Konzentration in einer Stammemulsion bestimmt, um mit einem identisch konzentrierten PL in einer weiteren Stammemulsion eine gut erkennbare Phasentrennlinie zu bilden. Eine eindeutige Sichtbarkeit der Phasentrennlinien in den hergestellten Emulsionsreihen, die durch Kombination von zwei Stammemulsionen nach Zentrifugation gewonnen werden, ist entscheidend für eine valide Auswertung. Anhand der Phasentrennlinie wird die Stabilität der hergestellten Emulsionen evaluiert, und die stabilste Emulsion wird anschließend für die Berechnung des HLB-Wertes des verwendeten PL herangezogen. Dabei wird innerhalb einer Emulsionsreihe das Mischungsverhältnis zwischen den beiden Stammemulsionen variiert, um verschiedene vorher berechnete theoretische HLB-Werte abzubilden. Dies ist in Tabelle 4 veranschaulicht.

Tabelle 4: Mischungsverhältnis der Emulsionen und daraus resultierende HLB-Werte am Beispiel von TWEEN® 20

Volumen hydrophile TWEEN® 20-Emulsion [ml]	Volumen lipophile PL-Emulsion [ml]	Rechnerisch resultierender HLB-Wert
5,0	5,0	5,00
4,0	6,0	6,67
3,8	6,2	6,94
3,6	6,4	7,19
3,5	6,5	7,31
3,4	6,6	7,42
3,3	6,7	7,54
3,2	6,8	7,65
3,1	6,9	7,75
3,0	7,0	7,86
2,8	7,2	8,06
2,0	8,0	8,75

In der Literatur sind für natürliche PLs verschiedene Angaben zu den HLB-Werten zu finden. Abhängig von der Zusammensetzung der untersuchten PLs hinsichtlich Kopfgruppen und Kettenlängen sind Werte zwischen 4 bis 8 publiziert (Tab. 5). Daher muss der entsprechende Partneremulgator HLB-Werte im Bereich von O/W-Emulgatoren (zwischen 8 und 18) aufweisen, um geeignete Mischungsverhältnisse und Durchführbarkeit im Labormaßstab zu gewährleisten. Für die zu verwendenden Öle werden entsprechend Gleichung 2 eHLB-Werte benötigt, die zwischen den HLB-Werten der beiden verwendeten Emulgatoren liegen.

Tabelle 5: HLB-Werte für PLs laut Literatur

Phospholipid	HLB-Wert	Literatur
Ei-Phosphatidylcholin	Ungefähr 7	Chung et al. 2001
Sonnenblumen-Lecithin	Ungefähr 8	Cabezas et al. 2016
Lysolecithin	6.5 – 8.0	Reddy Jala et al. 2016
Lecithin aufkonzentriert	4.0 – 4.5	Pardun 1982
Lecithin schwach hydrolysiert	5.0 – 5.5	Pardun 1982

3.1.3 Bestimmung des hydrophilen Partneremulgators zur HLB-Wert-Bestimmung

Der HLB-Wert des Partneremulgators wurde anhand des zu untersuchenden HLB-Bereichs und der Verfügbarkeit an industriell genutzten Emulgatoren auf einen Wert von 15 festgelegt. Damit liegt er höher als der in der Originalmethode benutzte Wert. Als mögliche Partneremulgatoren wurden hierbei der hydrophile Emulgator Sucrosetearat sowie der seit Jahren in Kosmetik- und Pharmaindustrie etablierte O/W-Emulgator Polysorbat 80 (Handelsname TWEEN® 80) betrachtet.

Ziel der Voruntersuchung war, eine zu verwendende Konzentration für das experimentelle Setup zu bestimmen, die die Herstellung von Stammemulsionen ermöglicht, die über einen Zeitraum von mindestens 10 Minuten ausreichend stabil waren, um eine Serie von 12 Emulsionen hintereinander herzustellen, ohne dass eine erneute Homogenisierung der Emulsion erforderlich wurde. Ebenso sollte die Konzentration des verwendeten Emulgators eine eindeutig bestimmbare Phasentrennlinie nach Zentrifugation gewährleisten, um eine entsprechend valide Auswertung der HLB-Werte der PLs zu ermöglichen. Die hergestellten Stammemulsionen sollten folglich ein Maß an inhärenter Stabilität besitzen, dass sowohl die Herstellung als auch die folgende Entmischung in zeitlich gesetzten Grenzen gewährleistete.

Um die notwendige Konzentration der zu untersuchenden hydrophilen Partneremulgatoren Sucrosetearat bzw. Polysorbat 80 zu bestimmen, wurden diese gegen zwei im Hinblick auf Kopfgruppen und Kettenlängen komplementäre, natürliche PLs (Lipoid P 100 und H50) getestet. Aus den jeweiligen Emulgatoren wurden wässrige Stammlösungen der Konzentration 25 mg/ml hergestellt, die dann in verschiedenen prozentualen Volumen-Anteilen (0,125% -1,0%) einer Wasser-MCT-Mischung von 50:50 zugegeben wurden.

Dabei entstanden jeweils zwei unterschiedliche Arten von Stammemulsionen: Emulsionen mit einem hydrophilen O/W-Emulgator mit hohem HLB-Wert (HLB_A in Gleichung 8) und Emulsionen mit einem lipophilen W/O-Emulgator (HLB_B in Gleichung 8). Je eine Stammemulsion mit hydrophilem Emulgator wurde mit einer phospholipidhaltigen Stammemulsion gemischt (Volumenverhältnis 1:1) und zentrifugiert, um eine schnelle Phasenseparation herbeizuführen, welche anschließend in Hinblick auf ihr Ausmaß verglichen und bewertet wurde (Kapitel 5).

Das Herstellen der Stammemulsionen benötigte bei Sucrosetearat Wärmezufuhr von ca. 50 °C zum Lösen der Substanz in destilliertem Wasser, wohingegen sich das Polysorbat bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten löste. Weitere Herausforderungen bei der Nutzung des Sucrosetearats ergaben sich durch instabile Stammlösungen und eine schlechte Auswertbarkeit der Phasentrennlinie nach Zentrifugation. Im Gegensatz dazu führten die Testemulsionen aus phospholipidhaltigen Stammemulsionen mit Polysorbat 80 schon bei einer Konzentration von 0,5% (V/V) zu uniformer, eindeutiger Phasenseparation.

Die beschriebenen positiven Eigenschaften bei Anwendung der Originalmethode waren ausschlaggebend für die Wahl von TWEEN® 80 in 0,5%iger Konzentration als Partneremulgator in der zur Anwendung gebrachten Stammemulsion.

3.1.4 Auswahl der Öle geeigneten eHLB-Wertes

Mit dem gewählten HLB-Wert des Partneremulgators ergibt sich für die Auswahl der lipophilen Phase ein möglicher Bereich für die korrespondierenden eHLB-Werte von 8 bis 14. Dabei ist die Voraussetzung zu erfüllen, dass die diversen natürlichen PLs ein ausreichendes Lösungsvermögen in den gewählten Ölen besitzen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der Vorversuche erneut LIPOID P 100 und H 50 aufgrund ihrer unterschiedlichen Kopfgruppen und Kettenlängen in 6 verschiedenen Ölen mit eHLB-Werten zwischen 8 und 12 auf ihre Löslichkeit getestet. Tabelle 6 zeigt die getesteten Öle mit zugehörigem eHLB und den Zeiten (Δt), die zum Lösen der beiden PLs im Ultraschallbad bei Raumtemperatur benötigt wurden. Das Lösungsvermögen wurde dabei visuell beurteilt nach Klarheit der Lösung.

LIPOID P 100 zeigte dabei mit maximal 10 Minuten Lösungszeit eine deutlich schnellere Lösung in Wasser als LIPOID H50. Als ausschlaggebend für diese Beobachtung ist die

unterschiedliche Zusammensetzung der Phospholipide anzunehmen. Während LIPOID P 100 fast ausschließlich aus PC besteht, welches als lipidlöslich beschrieben ist [23], ist LIPOID H50 ein Gemisch aus unterschiedlichen Substanzen (vgl. Tabelle 2), welche zum Teil aufgrund ihrer Ladung und Struktur eher hydrophil sind und sich somit schlechter in einer lipophilen Phase lösen lassen. Untermauert wird dies durch die längeren benötigten Zeiten zum vollständigen Lösen von LIPOID H50 in Korrelation zu der Lipophilie der verwendeten Öle (siehe entsprechende eHLB-Werte). So ist das Öl mit dem niedrigsten eHLB-Wert (ICS mit eHLB von 8) das Öl mit der am längsten benötigten Zeit (bis zu 40 Minuten) bis zum vollständigen Lösen von LIPOID H50.

Tabelle 6: Lösungsvermögen von LIPOID P 100 und LIPOID H 50 in verschiedenen Ölen

Öl	eHLB	Δt LIPOID P 100 [min.]	Δt LIPOID H 50 [min.]
Isocetylstearat (ICS)	8	5-10	35-40
PPG-3 Benzylether Myristat (STS)	9	0-5	15-20
Isopropylpalmitat (IPP)	10	0-5	10-15
Mittelkettige Triglyceride (MCT)	11	0-5	20-25
Isostearylisostearat (ISIS)	11	0-5	5-10
C ₁₂ -C ₁₅ -Alkylbenzoate (AB)	12	0-5	5-10

Eine weitere Anforderung an die zu verwendenden Öle, neben der guten Löslichkeit für die natürlichen PLs, ist die Möglichkeit des rechnerischen Abdeckens einer möglichst große HLB-Spanne in der der HLB-Wert der zu untersuchenden PLs vermutet wird (durch das Zusammenwirken mit dem verwendeten Partneremulgator).

Experimente zur Stabilität der erhaltenen Emulsion mit den Ölen ICS und STS zeigten, dass diese Öle mit eHLB-Werten von 8 und 9 vermutlich zu lipophil waren, um eine hinreichend stabile Emulsionsreihe herzustellen. Dabei war die Zeit bis zur Entmischung der Emulsion zu gering um eine experimentelle HLB-Wert-Bestimmung der PLs zu ermöglichen. Bei der Verwendung von MCT als lipophile Phase konnten trotz variierender Mischungsverhältnisse innerhalb einer Emulsionsreihe kaum Unterschiede in der Stabilität der Emulsionen verzeichnet werden. Die Höhe der Phasentrennlinie unterschied sich demzufolge kaum innerhalb einer solchen Reihe und eine differenzierte Auswertung war deswegen nicht möglich. Die genannten Beobachtungen lassen vermuten, dass MCT zusammen mit den natürlichen PLs und in Kombination mit Polysorbat 80 stabile Emulsionen über einen großen HLB-Bereich, also über eine große Breite an Mischungsverhältnisse zwischen hydrophiler und lipophiler Phase ergeben.

Auch eine Verringerung der Konzentration der Emulgatoren konnte die Unterscheidbarkeit der Phasentrennhöhe nicht signifikant verbessern. Die Ursache der erhöhten Stabilität von MCT-Emulsionen liegt offensichtlich in den strukturellen Eigenschaften und der Zusammensetzung von MCT und den dadurch möglichen Interaktionen an und um die Grenzfläche. MCT stellt ein Gemisch von mittelkettigen Triglyceriden mit variierenden Fettsäure-Kettenlängen zwischen 6 und 12 Kohlenstoff-Atomen dar. Die Struktur selbst bietet nur wenige spezifische Interaktionsmöglichkeiten mit den natürlichen PLs. Eine plausible Erklärung ist eine reguläre Anordnung der unpolaren Kohlenstoffketten aus beiden Substanzgemischen, um eine durch van-der-Waals-Kräfte induzierte Stabilität des Emulgators an der Grenzfläche zu generieren. Generell weisen Gemische von Stoffen häufig eine erhöhte Haltbarkeit von damit produzierten Emulsionen auf.

Das Öl IPP, welches breite Anwendung in Kosmetik- und Pharmaindustrie findet, erwies sich mit seinem eHLB-Wert von 10 als eine geeignete lipophile Grundlage, um den HLB-Wert der PLs bestimmen zu können. Hier resultiert der niedrigere eHLB-Wert allerdings auch in Einschränkungen bei der rechnerischen Darstellbarkeit von breiten HLB-Bereichen. Beschränkend wirkt die in der Gleichung geforderte anteilige Zugabe der Stammemulsionen (siehe Gleichung 8)

Isostearylstearat (ISIS) mit einem eHLB-Wert von 11 ist den mittelkettigen Triglyceriden, die in der Literatur und vom Hersteller mit dem gleichem eHLB-Wert ausgewiesen werden, aufgrund der oben beschriebenen besseren Handhabung und Auswertbarkeit vorzuziehen.

Einen relativ hohen eHLB-Wert besitzen die Alkylbenzoate (AB), konjugiert mit variierender FS-Kettenlänge von C₁₂-C₁₅. Eine Bestimmung von PLs mit hohen HLB-Werten, also mit überwiegend hydrophilem Charakter, kann durch die Verwendung von AB gut ermöglicht werden.

Zusammenfassend sei folgendes herausgestellt: Die experimentelle Bestimmung des HLB-Wertes ist sehr sensitiv im Hinblick auf die Auswahl des Partneremulgators und dessen Konzentration. Auch die Wahl des Öls beeinflusst die Herstellung der Stammemulsionen und Emulsionsreihen maßgeblich ebenso wie deren Entmischung. Die Handhabung der Methode stellt also komplexere Anforderungen an das Setup als die Originalmethode von *Davies* [13].

Um die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der HLB-Bestimmungen zu erhöhen, wurden nach Vorversuchen letztendlich 3 Öle ausgewählt, die im Rahmen der Analyse angewendet werden sollen. Dabei handelt es sich um IPP, ISIS und AB mit eHLB-Werte von 10, 11 bzw. 12. Durch dieses gewählte Setup lassen sich sowohl Unterschiede zwischen den einzelnen natürlichen PLs als auch zwischen den verwendeten lipophilen Phasen untersuchen.

3.2 Verifizierung der experimentellen Methodik

Um die Originalmethode von Robbers und Bhatia [19] zu verifizieren, wurde dünnflüssiges Paraffin, dessen eHLB-Wert nach Griffin in der Literatur mit 10 angegeben wird [11], [12] mit einem etablierten Emulgatorsystem aus Polysorbat 80 (HLB = 15; auch bekannt als TWEEN® 80) und Sorbitanmonolaurat (HLB = 8,6; auch bekannt als SPAN® 20), unter den originalen Bedingungen bestimmt.

Die Untersuchung zeigte, dass der experimentell bestimmte eHLB-Wert des dünnflüssigen Paraffins mit 10,1 nur geringfügig von dem in der Literatur ausgewiesenen HLB-Wert abwich. Die Genauigkeit und Aussagekraft der HLB-Bestimmung mit einer Nachkommastelle werden in Kapitel 4.1 ausführlich diskutiert.

Mit gleicher Methodik wurden der bekannte HLB-Wert der drei ausgewählten Öle (IPP, ISIS, AB) mit dem Co-Emulgator-System aus TWEEN® 80 (HLB = 15) und SPAN® 20 (HLB = 8,6) bestimmt. Wie in Tabelle 7 ersichtlich, sind für diese Öle und damit alle verwendeten lipophilen Phasen die experimentell errechneten HLB-Werte nicht signifikant von den in der angegebenen Literatur angegebenen Werten verschieden. Damit wurde die Methode von Robbers und Bhatia für die gewählten Bedingungen verifiziert.

Tabelle 7: eHLB-Werte der Öle (n=3)

Öl	HLB-Wert gemäß Datenblatt des Herstellers	Experimentell bestimmter HLB-Wert	Relative Standardabweichung [%]
Isopropylpalmitat (IPP)	10	9,9	0,1
Isostearylisostearat (ISIS)	11	10,9	1,7
Alkylbenzoate (C ₁₂₋₁₅) (AB)	12	12,0	0,25

Um die Anwendbarkeit der Methode zur Bestimmung unbekannter HLB-Werte von Emulgatoren zu verifizieren, wurde eine Bestimmung von SPAN® 20 mit TWEEN® 80 als Co-Emulgator und IPP als lipophiler Phase durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

Dabei waren sowohl die Richtigkeit (die Abweichung vom wahren Wert) als auch die Genauigkeit (die Abweichung innerhalb der ermittelten Werte) der Methode mit der in der Literatur beschriebenen Methode vergleichbar. Für SPAN® 20 wurde bei allen drei analysierten lipophilen Phasen ein eindeutiges Minimum der Phasenseparation bei entsprechend bekanntem HLB-Wert von $8,6 \pm 0,1$ beobachtet [24].

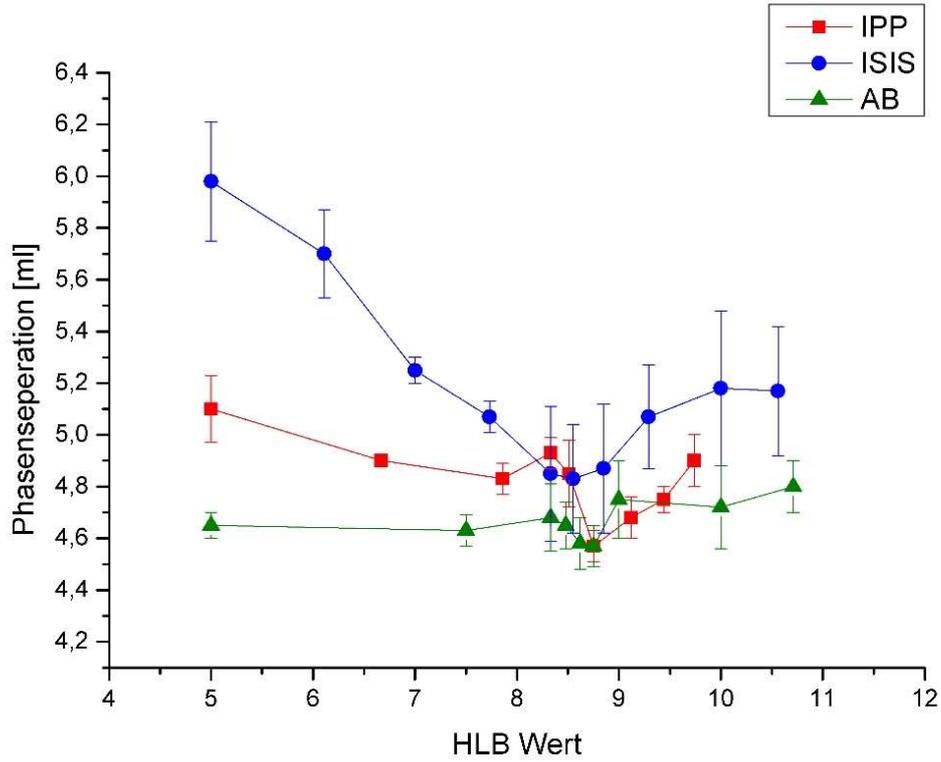


Abbildung 9: Phasentrennlinie SPAN® 20 (n=3)

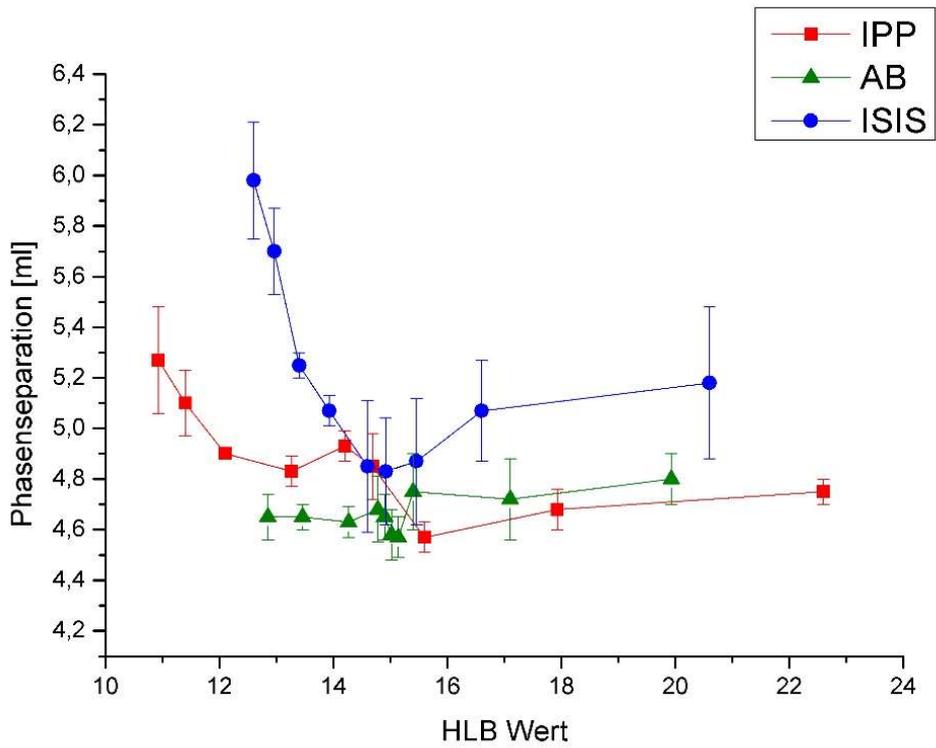


Abbildung 10: Phasentrennlinie von TWEEN® 80 (n=3)

Bei Anwendung der Methode auf TWEEN® 80 mit drei verschiedenen Ölphasen wurde ein HLB-Wert von $15,2 \pm 0,3$ in Übereinstimmung mit den Literaturwerten von *Needs* erhalten (Abbildung 10).

Generell zeigte sich die angepasste Methode hinsichtlich der Richtigkeit und Genauigkeit vergleichbar mit der Originalmethode. Mit der dargestellten Verifizierung der adaptierten Methode für die HLB-Werte der Emulgatoren als auch für die eHLB-Werte der verwendeten lipophilen Phasen wurde der Nachweis einer stabilen und hinreichend genauen Methode für die Bestimmung der HLB-Werte von natürlichen PLs erbracht.

3.3 HLB-Wert-Bestimmung der natürlichen PLs

Anhand der modifizierten Methode von *Robbers und Bhatia* zur experimentellen Bestimmung des HLB-Wertes wurden 14 PLs natürlichen Ursprungs analysiert. Für Details zur Probenvorbereitung, Zentrifugation und Auswertung der erhaltenen Emulsionen wird auf den experimentellen Abschnitt dieser Arbeit (Kap. 5) verwiesen.

Wie in Kapitel 2.1 ausführlich beschrieben, unterscheiden sich PLs vor allem in ihrer Zusammensetzung bezüglich der Kopfgruppen und Kettenlängen. Die zwei Sonderfälle LIPOID S LPC 80 (zu etwa 80% Lysolecithin) und LIPOID S 90-3 (nach Aufreinigung hydriert) sind stellvertretend für mögliche Modifikationen analysiert worden.

Der Großteil der PLs lag in dem in der Literatur [1], [2], [25] beschriebenen HLB-Wert-Bereich, also zwischen 7,5 und 10,5 und zeigte damit eine Präferenz für den Einsatz als O/W-Emulgatoren. Abbildung 11 zeigt die entsprechend ermittelten HLB-Werte in graphischer Form.

Beim Vergleich der HLB-Werte der untersuchten natürlichen PLs liegen die meisten im Bereich der Emulgatoren für O/W-Emulsionen. Eine Ausnahme bildet LIPOID E, das eher ein W/O-Emulgator mit HLB-Werten von 5,2 bis 7,5 ist. Dies lässt sich mit der höheren Menge an PE in LIPOID E im Vergleich zu den anderen untersuchten Vertretern der natürlichen PLs erklären. PE weist im Gegensatz zu PC eine kleinere hydrophile Kopfgruppe und ein verringertes Quellvermögen auf, wodurch es sich besser zur Herstellung von W/O-Emulsionen eignet [23]. Darüber hinaus besitzen PE-Moleküle mit ungesättigten Fettsäureketten eine „umgekehrte Kegelform“ im Vergleich zu PC-Molekülen und passen sich daher besser der Krümmung der Grenzfläche von W/O-Emulsionen an [26].

Im Allgemeinen weisen natürliche PLs mit einer höheren PE-Konzentration einen niedrigeren HLB-Bereich auf und können daher möglicherweise bevorzugt für beide Emulsionsarten verwendet werden. LIPOID S LPC 80, ein aus Sojabohnen gewonnenes PL mit einem hohen Anteil an Lyso-PC weist erwartungsgemäß den höchsten HLB-Wert auf und eignet sich daher am besten zur Herstellung von O / W-Emulsionen.

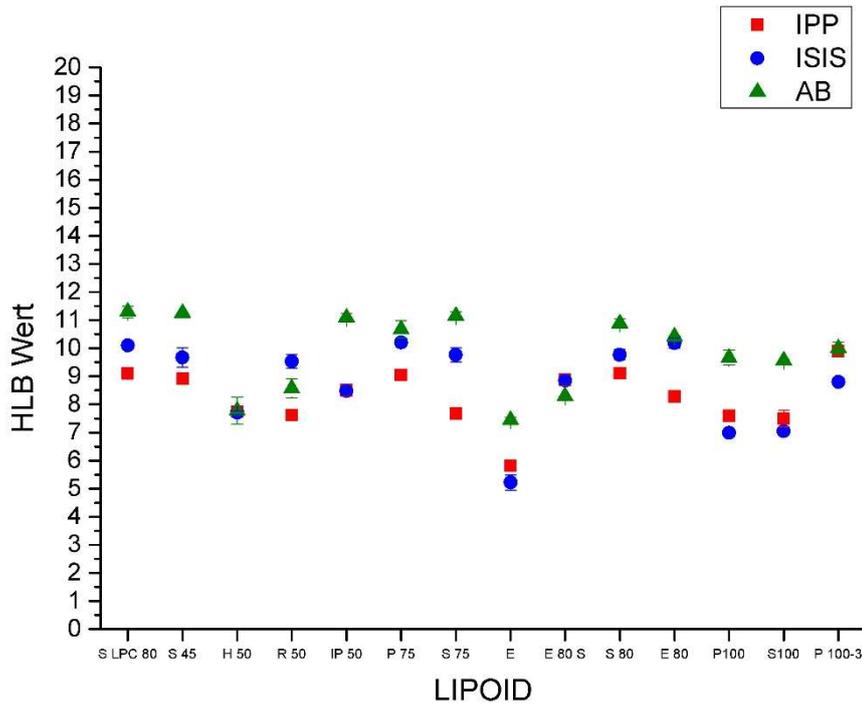


Abbildung 11: Ergebnis der HLB-Wert-Bestimmungen der 14 PLs (n=3)

Auffällig ist die Abhängigkeit der HLB-Werte natürlicher PLs von der verwendeten lipophilen Phase. Dies lässt sich in Abbildung 11 eindeutig erkennen. Dabei ist der experimentell bestimmte HLB-Wert fast ausnahmslos höher, je höher der eHLB-Wert der verwendeten lipophilen Phase ist. Dies lässt sich am ehesten mit einem systematischen Fehler im HLB-Konzept erklären, wie in Kapitel 4.1 dieser Arbeit dargelegt.

Bei etwa der Hälfte der untersuchten PLs (6 von 14) war der Einfluss der eHLB-Werte der verwendeten Öle etwa um die Hälfte geringer als in Gleichung 8 beschrieben. So war der experimentell bestimmte HLB-Wert eines PLs im Mittel um 0,5 Einheiten erhöht bei einer Bestimmung in IPP statt in ISIS. Experimentelle Bestimmungen der PLs im Öl AB erreichten im Vergleich dazu durchschnittlich um 1,2 Einheiten höhere HLB-Werte als in ISIS bzw. um 1,7 erhöhte Werte verglichen mit IPP. Diese Unterschiede sind deutlich größer als durch die Variabilität der Methode alleine zu erklären wäre.

Hinsichtlich des eHLB-Wertes lässt sich daraus schlussfolgern, dass dieser entweder nur einen geringeren Einfluss auf die Bestimmung des HLB-Wertes von natürlichen PLs hat als bisher angenommen oder sich deutlich anders kalkulieren lässt. In beiden Fällen müssten somit eingehende neue Bestimmungen für die Kombinationen aus lipophiler Phase und verschiedenen natürlichen PLs getätigt werden.

3.3.1 Einfluss der PL-Zusammensetzung und der Quelle des Rohmaterials auf den HLB-Wert

Die verwendeten PL stammen aus unterschiedlichen natürlichen Quellen, wie in Kapitel 2.1 beschrieben. Dabei unterscheiden sich solche aus pflanzlichen Quellen, wie Soja (LIPOID S), non-GMO-Soja (LIPOID P), Raps (LIPOID R) und Sonnenblume (LIPOID H) von den tierischen Ei-PLs (LIPOID E) erheblich.

Aufgrund der unterschiedlichen Basis der PLs resultieren unterschiedliche Substitutionsmuster der Fettsäureketten, welche zu entsprechend charakteristischen Unterschieden in den analysierten HLB-Werte führen können. Einflüsse zusätzlicher, nicht identifizierter Substanzen in den einzelnen Gemischen sollten sich vermehrt in den niedrigeren Aufreinigungsstufen bemerkbar machen, da dort der prozentuale Anteil von Nicht-PLs höher ist.

In Abbildung 12 wurden LIPOID E und E 80 S, die beide tierischen Ursprungs sind, und die aus Pflanzen gewonnenen LIPOID S 75 und P 75 (Soja bzw. Non-GMO-Soja) verglichen. Alle 4 betrachteten PLs besitzen vergleichbare Aufreinigungsstufen mit PC-Gehalten um die 70% (69,2 – 70,6% PC-Gehalt laut Analysezertifikaten) und sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit vergleichbar prozessiert worden.

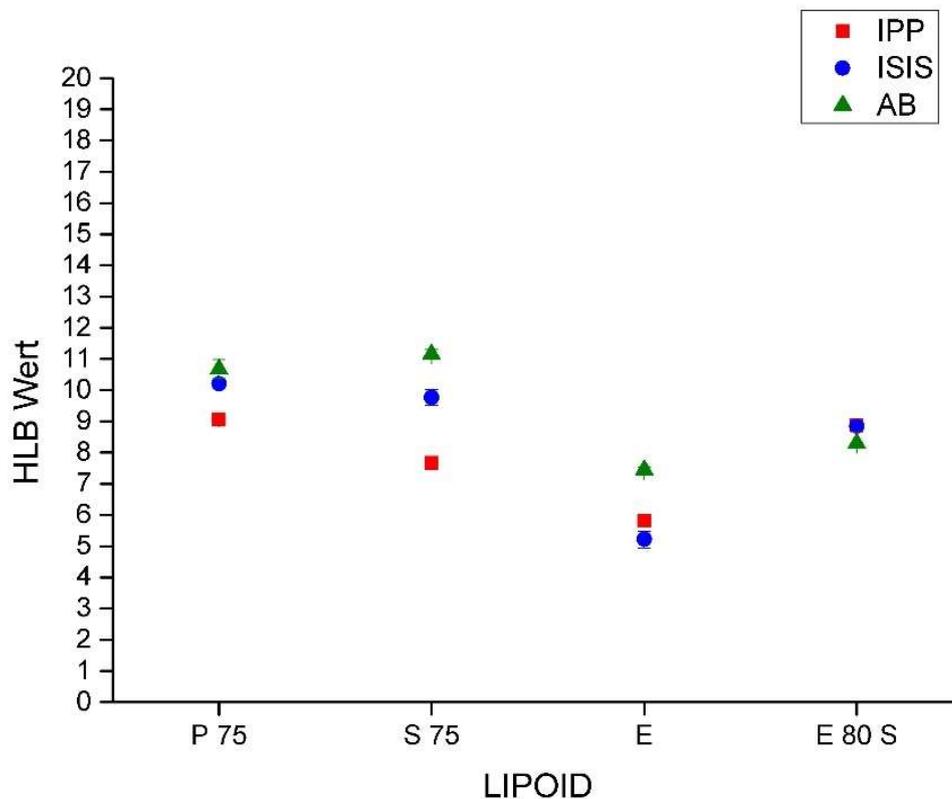


Abbildung 12: Vergleich der HLB-Werte von PLs aus tierischen und pflanzlichen Quellen gleichen PC-Gehaltes ($n=3$)

Tabelle 8: HLB-Werte von PLs aus tierischen und pflanzlichen Quellen gleichen PC-Gehaltes (n=3)

PL	HLB-Wert in IPP	RSD [%]	HLB-Wert in ISIS	RSD [%]	HLB-Wert in AB	RSD [%]
LIPOID E	5,8	0,03	5,2	0,27	7,5	0,09
LIPOID E 80 S	8,9	0,21	8,9	0,01	8,3	0,01
LIPOID P 75	9,1	0,12	10,2	0,16	10,7	0,30
LIPOID S 75	7,7	0,06	9,8	0,25	11,2	0,15

Für die Öle ISIS und AB ergaben sich höhere HLB-Werte für die aus Soja gewonnenen PLs. Im Falle des Öles IPP zeigte sich allerdings für LIPOID S 75 ein geringerer HLB-Wert als für das tierische LIPOID E 80 S. Wie bei fast identischer Herkunft zu erwarten zeigten LIPOID P 75 und S 75 vergleichbare HLB-Werte von 9,1 – 10,7 bzw. 7,7 - 11,2 und weisen damit ähnliche Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten auf. Dagegen besaßen die Ei-PLs bis auf die beschriebene Ausnahme signifikant geringere HLB-Werte. Vor allem jene des LIPOID E lagen mit 5,2 bis 7,5 deutlich niedriger und identifizierten damit eine Präferenz für W/O-Emulsionen bei vergleichbaren PC-Anteilen. LIPOID E 80 S wies hingegen nur geringe Schwankungen im Bereich von 8,3 bis 8,9 auf.

In Bezug auf die Substitutionsmuster der Fettsäureketten weisen aus Soja gewonnene PLs signifikant höhere Anteile an Linolsäure auf als solche, die aus Ei gewonnenen wurden. Die tierischen PLs LIPOID E bzw. E 80 S besitzen im Unterschied dazu höhere Anteile an Palmitin-, Stearin- und Ölsäure, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben. Längere Fettsäuren (Linolsäure im Vergleich zu Palmitinsäure) sind dabei aufgrund ihrer Struktur und der damit einhergehenden stärkeren van-der-Waals-Kräfte lipophiler als kürzere Fettsäuren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Linolsäure sorgen hingegen für eine höhere Fluidität in Membranen [27] und führen vermutlich auch zu vergleichbaren Effekten an den Grenzflächen von Emulsionen. Aufgrund ihrer räumlichen Struktur besitzen ungesättigte Fettsäuren eine geringere Affinität zu lipophilen Phasen als ihre gesättigten Gegenparts. Basierend auf den logP-Werten, welche ein guter Indikator für die Lipophilie einer Substanz sind, reduzieren vorhandene Mehrfachbindungen von Fettsäuren die lipophile Affinität in höherem Maße als eine Verlängerung der Kettenlänge um wenige Moleküle diese anhebt [28].

Ein weiterer Unterschied zwischen den PLs aus diesen beiden Quellen ist das unterschiedliche Verhalten im Zusammenhang mit den jeweils verwendeten lipophilen Phasen. Während LIPOID S 75 bzw. LIPOID P 75 einen höheren HLB-Wert aufweisen, je höher der

eHLB der lipophilen Phase ist, lässt sich diese Korrelation für LIPOID E und E 80 S nicht feststellen.

Bei PLs mit einer geringeren Aufreinigungsstufe ist die Anzahl an unbekanntem Substanzen verständlicherweise höher als bei fast PC-reinen Fraktionen (Kapitel 2.1.2). So könnten weitere polare Komponenten in den Soja-PLs zu einer erhöhten Hydrophilie führen. Durch das relativ komplexe Gemisch an Substanzen sind weitere Interaktionen an den Grenzflächen der Emulsionen möglich, welche weitere, schwer zu quantifizierende Auswirkungen auf den experimentell ermittelten HLB-Wert haben.

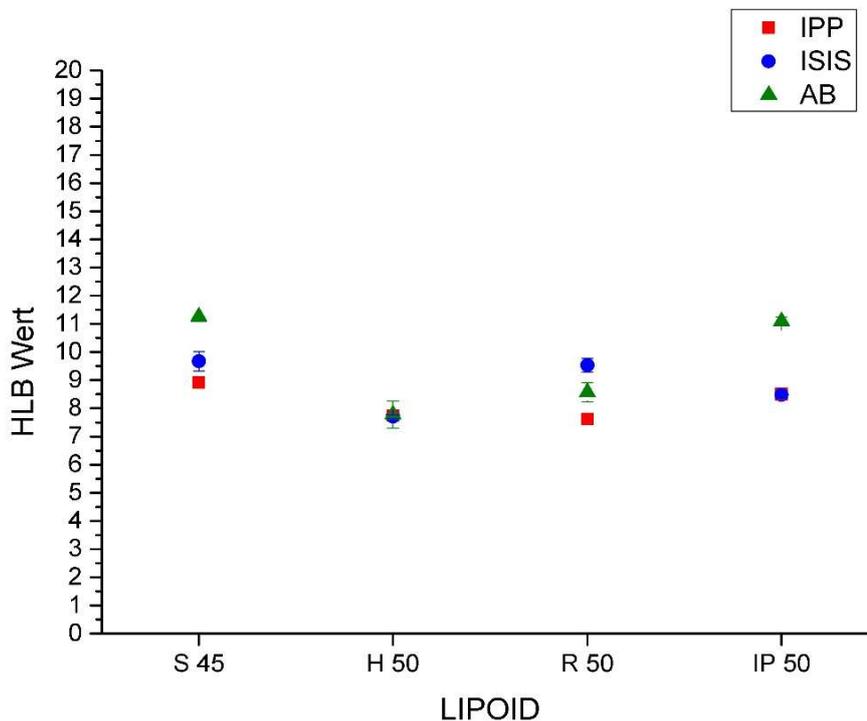


Abbildung 13: PLs aus Sonnenblume, Raps und Non-GMO-Soja mit ca. 50% PC-Gehalt

Tabelle 9: HLB-Werte der PLs aus Sonnenblume, Raps und non-GMO-Soja

PL	HLB-Wert in IPP	RSD [%]	HLB-Wert in ISIS	RSD [%]	HLB-Wert in AB	RSD [%]
LIPOID H 50	7,7	0,10	7,7	0,06	7,8	0,48
LIPOID R 50	7,6	0,07	8,7	0,32	8,6	0,34
LIPOID S 45	8,8	1,34	9,7	3,56	11,3	0,03
Phospholipon IP 50	8,5	0,22	8,5	0,12	11,1	0,14

Abbildung 13 zeigt einen Vergleich von PLs unterschiedlichen pflanzlichen Ursprungs. LIPOID H ist dabei aus Sonnenblumen gewonnen, LIPOID R aus Raps und PHOSPHOLIPON IP 50 und LIPOID S 45 aus Sojabohnen. Alle PLs sind von vergleichbarer Aufreinigungsstufe und besitzen demzufolge einen ähnlichen Gehalt an PC. Während die PLs aus Raps und Sonnenblume einen annähernd gleichen HLB-Wert aufweisen, besitzen die Soja-PLs einen deutlich höheren Wert mit einer breiten Streuung von etwa 2,5 Einheiten in Abhängigkeit von der verwendeten lipophilen Phase. Da der Anteil an nicht identifizierten Begleitsubstanzen bei der dargestellten Aufreinigungsstufe hoch ist (Kapitel 2.1.2), erscheint eine umfassende und valide Beurteilung der Beobachtungen als nicht darstellbar.

3.3.2 Reinheitsgrad der PLs

Die analysierten natürlichen PLs wiesen unterschiedliche Aufreinigungsstufen bezüglich des PC-Gehaltes auf. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, ist PC die am weitesten verbreitete Substanzklasse innerhalb der PLs.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, welchen Einfluss der Reinheitsgrad der natürlichen PLs auf deren physiko-chemische Eigenschaften und damit in letzter Konsequenz auf deren Anwendung als Emulgator hat. Daher wurden unterschiedliche Reinheits – bzw. Verunreinigungsgrade von PLs des gleichen Ursprungs miteinander verglichen.

Tabelle 10: HLB-Werte von PLs mit unterschiedlichen Aufreinigungsstufen

PL	HLB-Wert in IPP	RSD [%]	HLB-Wert in ISIS	RSD [%]	HLB-Wert in AB	RSD [%]
Phospholipon IP 50	8,5	0,22	8,5	0,12	11,1	0,14
LIPOID S 45	8,8	0,12	9,7	0,34	11,3	0,00
LIPOID P 75	9,1	0,12	10,2	0,16	10,7	0,30
LIPOID S 75	7,7	0,06	9,8	0,25	11,2	0,15
LIPOID S 80	9,1	0,00	9,8	0,19	10,9	0,16
LIPOID P 100	7,6	0,18	7,0	0,04	9,7	0,26
LIPOID S 100	7,5	0,29	7,1	0,99	9,6	0,02

Abbildung 14 zeigt die entsprechenden Ergebnisse der HLB-Untersuchung von aus Soja gewonnenen PLs, welche die am häufigsten eingesetzten natürlichen PLs repräsentieren.

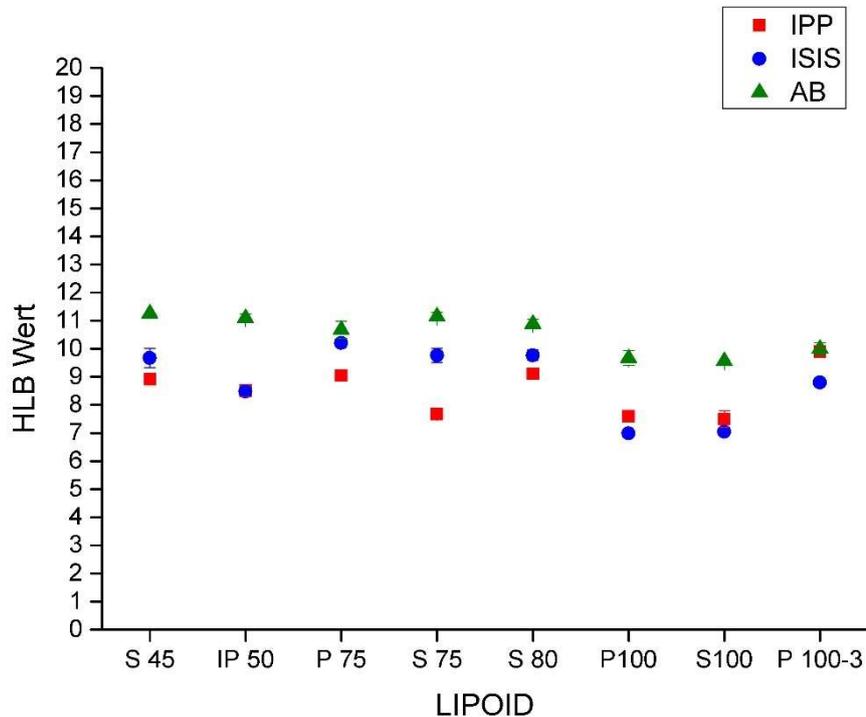


Abbildung 14: HLB-Werte der PLs aus Soja und Non-GMO-Soja geordnet nach zunehmendem PC-Gehalt ($n=3$)

Aufgrund der komplexen Eigenschaften und Einflüsse der enthaltenen Komponenten und der zum Teil unbekannt Bestandteile der untersuchten PLs konnte keine Korrelation zwischen Reinheitsgrad und HLB-Wert festgestellt werden. Selbst PLs, die gleiche Aufreinigungsstufen aufweisen und damit ähnliche PC-Gehalte besitzen, zeigten durchaus erhebliche Unterschiede in den HLB-Werten.

Dass bei den beiden hoch aufgereinigten PLs aus Soja, LIPOID P 100 und LIPOID S 100, mit PC-Gehalten von 97,4% bzw. 96,7% nur geringfügige Unterschiede der HLB-Werte in den jeweiligen Ölen auftraten, ist stützt die Einschätzung der verwendeten Methode als robust und verlässlich. Des Weiteren entspricht der für diese Aufreinigungsstufen ermittelte HLB-Wert von 7 - 9 in den Ölen ISIS und IPP dem in der Literatur angegebenen Wert für reines PC. Im Gegensatz dazu zeigten PLs mit geringeren Reinheitsgraden stärkere Unterschiede in den ermittelten HLB-Werten in Abhängigkeit von der verwendeten lipophilen Phase und dem entsprechenden Reinheitsgrade.

LIPOID S 45 erreichte mit 11,3 den höchsten HLB-Wert der unmodifizierten PLs und war damit das am meisten hydrophile, natürliche PL gemäß HLB-Bestimmung. Es ist anzunehmen,

dass dieses PL über einen höheren Anteil an (nicht identifizierten) polaren Substanzen wie z.B. Glykolipide oder anionische PLs verfügt, die neben den Lyso-Formen der PLs (zu 1,5% enthalten) dem Gemisch hydrophilere Eigenschaften verleihen.

Allgemein ließ sich feststellen, dass PLs aus Soja bzw. Non-GMO-Soja bei vergleichbarem PC-Gehalt auch ähnliche HLB-Werte aufweisen (siehe Abbildung 14).

Konnten bei geringen Aufreinigungsstufen von Soja-PLs wie PHOSPHOLIPON IP 50 und LIPOID S 45, HLB-Werte im Bereich 8,5 – 11,3 ermittelt und damit einer hydrophilen Phasenlage zugeordnet werden, so waren die hoch aufgereinigten Soja-PLs LIPOID P 100 und LIPOID S 100 bei einem PC-Gehalt von annähernd 100% erwartungsgemäß mehrheitlich als lipophiler bestimmt wurden (HLB-Werte 7,0 und 7,6 in ISIS bzw. IPP, 9,7 in AB).

Ei-Lecithine, die von allen PLS die niedrigere HLB-Werte aufwiesen, zeigten, anders als bei den Soja-Produkten, deren HLB-Werte mit zunehmendem PC-Gehalt fielen, weniger unpolare Eigenschaften bei steigendem Anteil an PC. So erreichte LIPOID E 80, das zu dem möglicherweise über polare Inhaltsstoffe verfügt, Werte, die Ei-PLs auch zu einem Einsatz als O/W-Emulgatoren befähigen (HLB = 10,4 in AB) und lag damit in gleichen Bereichen, wie sein Pendant der Soja-PLs LIPOID S 80 mit 10,9 (Abbildung 15).

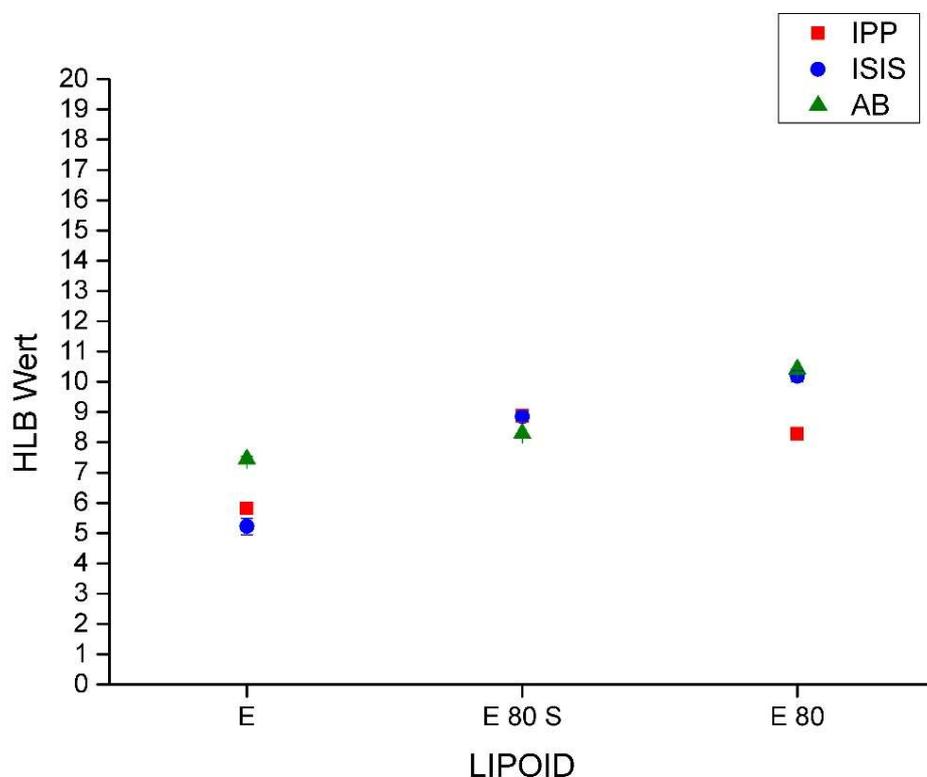


Abbildung 15: HLB-Werte der PLs aus Ei geordnet nach zunehmendem PC-Gehalt (n=3)

Tabelle 11: HLB-Werte der Ei-PLs

PLs	HLB-Wert in IPP	RSD [%]	HLB-Wert in ISIS	RSD [%]	HLB-Wert in AB	RSD [%]
LIPOID E	5,8	0,03	5,2	0,27	7,45	0,09
LIPOID E 80 S	8,9	0,21	8,9	0,01	8,3	0,01
LIPOID E 80	8,3	0,09	10,2	0,18	10,4	0,01

Dass auch innerhalb der pflanzlichen PLs mögliche Unterschiede in der PL-Zusammensetzung herrschen, zeigten die HLB-Werte der Substanzen, welche in Abbildung 13 zusammengefasst sind. Hier wurden Sonnenblume- (LIPOID H 50), Raps- (LIPOID R 50) und Soja-PLs (LIPOID S 45 und PHOSPHOLIPON IP 50) ähnlichen PC-Gehaltes (50,7 – 54,4%) verglichen und dabei Unterschiede im HLB-Wert von bis zu einer HLB-Einheit festgestellt (vergl. Kapitel 3.3.1).

PHOSPHOLIPON IP 50 erreichte dabei in AB Werte bis 11,1 und lag somit deutlich höher auf der HLB-Skala als die beiden anderen PLs ähnlichen PC-Gehaltes. Damit ist LIPOID H 50 die einzige Substanz mit einem vom eHLB-Wert der lipophilen Phase nahezu unabhängigen Verhalten. Allerdings ist bei diesem geringen Reinheitsgrad von nur ca. 50% Anteil an PC und nicht definierten weiteren Bestandteilen damit zu rechnen, dass polare und unpolare Verunreinigungen gemeinsam auftreten und interagierend Einfluss auf den HLB-Wert nehmen. Außerdem kann der PC-freie Anteil auch Batch-to-Batch Variationen unterliegen, wie bei natürlichen Produkten häufiger zu beobachten ist. Dies erschwert die Interpretation von Messergebnissen gering aufgereinigter PLs erheblich. Deswegen können der Gehalt an Komponenten, wie beispielsweise PE oder Lysolecithin, lediglich Hinweise auf die Ursachen möglicher Verschiebungen des HLB-Wertes der PLs geben.

3.3.3 Phasentrennlinien der PLs

Folgende weitere Auffälligkeit der untersuchten natürlichen PL wurde im Laufe der experimentellen Versuche festgestellt: Im Gegensatz zu den mit den Referenzemulgatoren erhaltenen Ergebnissen (Kapitel 3.2) zeigten alle analysierten natürlichen PLs einen deutlich unterschiedlichen Verlauf in den Phasenseparationskurven. In Abbildung 16 sind die Phasenseparationsverläufe für LIPOID S 75 als einen ihrer repräsentativen Vertreter für alle drei untersuchten lipophilen Phasen dargestellt. Dabei ist ein niedriger Wert der Phasenseparation gleichbedeutend mit einer stabilen Emulsion.

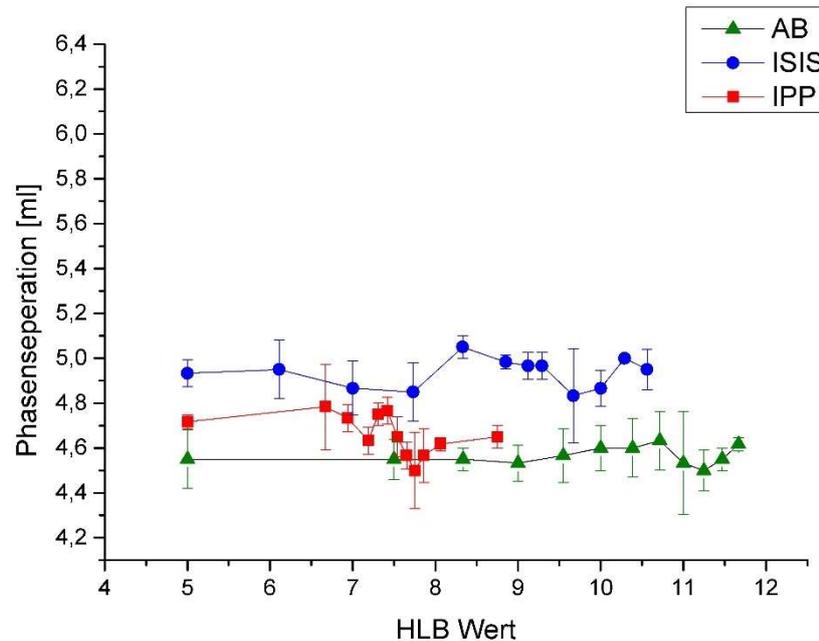


Abbildung 16: Phasentrennlinienverlauf für LIPOID S 75 (n=3)

Dieses Verhalten wurde für mittelkettige Triglyceride als lipophile Phase bereits bei der Methodenentwicklung beobachtet (Kapitel 3.1.4). Der Effekt war für andere, im Zuge dieser Arbeit verwendete, lipophilen Phasen weniger ausgeprägt zu beobachten, stellt aber trotzdem einen beachtenswerten Unterschied zu den ermittelten Phasentrennkurven der ethoxylierten Emulgatoren (SPAN® 20, TWEEN® 80) dar.

Auffällig ist bei Betrachtung der Phasentrennlinienverläufe die nur geringe Ausbildung eines Minimums an Phasenseparation. Dieser Sachverhalt ist bei allen untersuchten PLs ungeachtet des Reinheitsgrades und der Quelle festzustellen. Dies erschwert zum einen die Zuordnung eines speziellen und eindeutigen HLB-Werts, zeigt zum anderen aber auch das besondere Potential der PLs für ein breites Einsatzspektrum als Emulgatoren.

Mit ISIS als lipophiler Phase hergestellte Emulsionen zeigten die Tendenz, sich im Vergleich zu IPP und AB ausgeprägter zu separieren. Dies ist deutlich anhand der Phasentrennlinienhöhe erkennbar. Insbesondere bei der Verwendung von AB konnten über einen weiten Bereich von HLB-Werten hochstabile Emulsionen erzeugt werden. Möglicherweise liegt dieses Verhalten an der unterschiedlichen Affinität der applizierten lipophilen Phasen zu den untersuchten PLs [23]. Unterschiedliche Strukturen würden zu differenzierten Wechselwirkungen an der Grenzfläche führen. Solche physiko-chemischen Effekte sind hochkomplex und werden im weiteren Verlauf der Arbeit diskutiert (Kapitel 4.2). Obwohl der Einfluss der verwendeten lipophilen Phase auf die Eigenschaften der Kurven erkennbar war, konnte über einen weiten Bereich von HLB-Werten kein eindeutiges Minimum beobachtet werden, so wie es für SPAN® 20 und TWEEN® 80 festgestellt wurde.

Vergleichbares wurde für die Phasentrennlinienverläufe bei Vergleich verschiedener Reinheitsgrade ermittelt. Besonders stark ausgeprägt war dies bei den der Soja-PLs LIPOID S 45 und LIPOID S 100 in AB als lipophiler Phase (siehe Abbildung 17). Hierbei zeigte das fast nur aus PC bestehende PLs ein deutliches Minimum bei HLB-Wert 11,3, LIPOID S 45 hingegen wies große Schwankungen über den gesamten untersuchten HLB-Bereich auf. Bei Vergleich dieser beiden PLs in anderen lipophilen Phasen war der beschriebene Kontrast weniger stark ausgeprägt. Im Vergleich zu SPAN® 20 und TWEEN® 80 war das Minimum bei LIPOID S 100 in AB allerdings schwächer ausgeprägt und die Emulsionen neigten auch nicht zu starken Instabilitäten abseits des entsprechend definierten HLB-Wertes wie dies für ethoxylierte Emulgatoren festgestellt wurde.

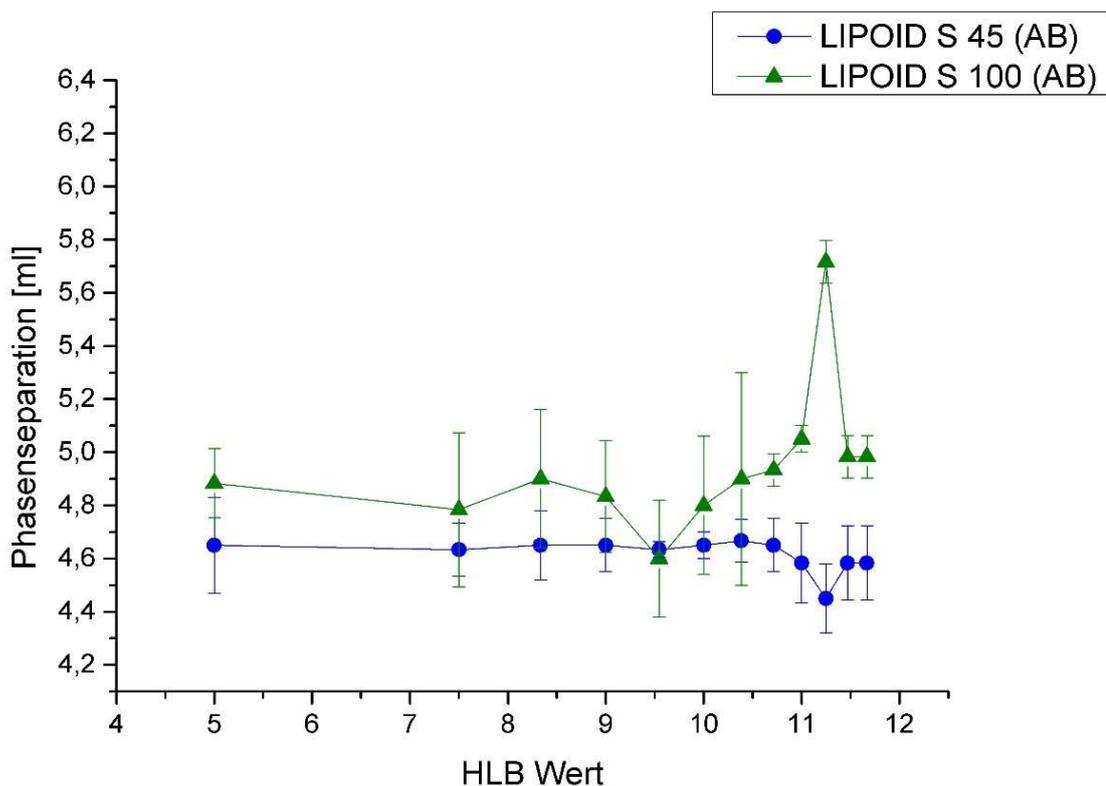


Abbildung 17: Vergleich der Phasentrennlinien in Abhängigkeit vom Reinheitsgrad am Beispiel der PLs LIPOID S 45 und S 100 (n=3)

3.4 Physiko-chemische Untersuchungen der PLs

3.4.1 Zeta-Potential-Untersuchungen

Aufgrund der nicht konsistenten Ergebnisse der HLB-Untersuchungen wurden ausgewählte natürliche PLs einer physiko-chemischen Untersuchung unterzogen um ihr Verhalten an der Grenzfläche der Phasen bestimmen zu können. Zu Vergleichszwecken wurden dabei auch reines DPPC und POPC als Vertreter der Leitsubstanzen in natürlichen PLs untersucht.

Um die Eignung der PLs als Emulgatoren von W/O- bzw. O/W-Emulsionen genauer voraussagen zu können, wurde das Hauptaugenmerk der Untersuchung auf ihr Verhalten an der Grenzfläche und ihre Charakteristiken bei der Bildung von Membranen gelegt. Ein wichtiger Faktor für Aussagen über das Verhalten von Molekülen an diversen Grenzflächen ist die Bestimmung ihres elektrostatischen Potentials. Dafür wurden zunächst Liposomen aus unterschiedlichen PLs präpariert und im Hinblick auf ihr Zeta-Potential gemessen, wie in Kapitel 5 beschrieben.

Das Zeta-Potential gibt sowohl Einblicke in die Stabilität einer Emulsion hinsichtlich der elektrostatischen Abstoßung der dispergierten Partikel als auch in die Hydrophilie einer Emulsion. Diese kann aufgrund des ionogenen Anteils am Emulgator ungefähr eingeschätzt werden, da Ionen eine deutlich höhere Affinität zu Wasser haben als z.B. Hydroxylgruppen. Dies lässt sich mit der unterschiedlichen Bindungsstärke und -reichweite von ionischen Bindungen im Vergleich zu Wasserstoff-Brücken-Bindungen (HBB) erklären

Um das Zeta-Potential der auftretenden Oberflächenladung von Liposomen zu messen, wurde gereinigtes Wasser als kontinuierliche Phase gewählt. DPPC und POPC als zwitterionische PLs zeigen in Lösungen mit einem pH-Wert oberhalb ihres isoelektrischen Punktes nahezu kein Zeta-Potential. Die für beide Lipide gemessenen Werte waren entsprechend schwach negativ (-5,3 mV für POPC bzw. -13,7 mV für DPPC) und werden in Kapitel 4.2 diskutiert. Liposomen, die aus gereinigtem natürlichem PC (LIPOID S 100 und P 100) hergestellt, hydratisiert und bei 50° C äquilibriert wurden, zeigten geringfügig geringere negative Werte ($-25 \pm 6,9$ mV bzw. $-14,1 \pm 4,4$ mV). Dieser Unterschied zwischen LIPOID S 100 und LIPOID P 100 ist für diese PLs, die eine sehr ähnliche Zusammensetzung haben, unerwartet hoch. Um einen Einblick in die Ursachen dieses Befundes zu erhalten, wurde die Präparation (Hydratisierung und Äquilibrierung) der Liposomen anstelle von 50° C bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Präparation bei Raumtemperatur stellt dabei den klassischen Fall der Liposomen Herstellung dar.

Die Entscheidung für eine Präparation bei 50° C wurde getroffen, um die Messung des Zeta-Potentials bei gleichen Bedingungen vorzunehmen wie sie bei Präparation der PL-Membranen für die Kleinwinkelröntgenstreuung bestand (Kapitel 3.4.2). Ein Vergleich der Zeta-

Potentiale der Liposomen, die bei Raumtemperatur (RT) oder 50°C hergestellt wurden, ist in Tabelle 12 dargestellt. Vermutliche Ursachen dieser temperaturbedingten Diskrepanz aufgrund der Temperaturunterschiede können durch die unterschiedlich Ausrichtung der Kopfgruppen an der Grenzfläche bedingt sein, aber auch durch Struktur beeinflussende chemische Reaktionen, die von einer höheren Temperatur begünstigt werden.

Tabelle 12: Zeta-Potentiale der PLs bei 50°C und bei Raumtemperatur (RT) (n=3)

Natürliche PLs	Zeta-Potential bei 50 °C [mV]	Zeta-Potential bei RT [mV]
LIPOID S 45	-73.7 ± 3.9	-26.5 ± 2.5
LIPOID E 80 S	-38.1 ± 2.3	-6.7 ± 0.9
LIPOID S 100	-25.0 ± 6.9	-5.78 ± 0.6
LIPOID P 100	-14.1 ± 4.4	-6.9 ± 0.4
DPPC	-13.7 ± 2.3	nicht bestimmt
POPC	-5.3 ± 1.5	-2.8 ± 0.3

Wie erwartet zeigten die PLs geringerer Aufreinigungsstufen ein höheres negative Zeta-Potential aufgrund des größeren Anteils an anionischen Substanzen im Vergleich zu Substanzen, die aus reinem, zwitterionischem PC bestehen (DPPC, POPC, LIPOID S 100 und LIPOID P 100). LIPOID E 80 S, mit einem PC -Gehalt von ca. 70% zeigte ein Zeta-Potential von -38,1 mV. Das höchste Wert (-73,7 mV) wurde für LIPOID S 45 ermittelt, jener Probe mit der niedrigsten Menge an PC (54,7%) und dem höchsten Anteil an anionischen Substanzen (Phosphatidylinositol, Glykolipide und ähnlichem).

3.4.2 Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)

Die Elektrostatische Abstoßung stellt nur eine Komponente der physikalischen Stabilität von emulgierten Systemen dar. Wird diese Barriere überwunden, kommt es zum Kontakt der dispergierten, inneren Phase mit der äußeren. Dann spielen andere physikalische Phänomene eine Rolle, welche vorrangig sterischer oder nicht-kovalenter Natur sind.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die anionischen Komponenten auf die Rigidität, Dichte und Anzahl der ausgebildeten Phospholipidschichten an der Grenzfläche haben, wurde die Technik der Kleinwinkelröntgenstreuung angewandt. Damit lässt sich die Struktur der von

natürlichen PLs gebildeten Schichten genauer untersuchen und Vergleiche zwischen ihnen und den Referenzsubstanzen werden ermöglicht.

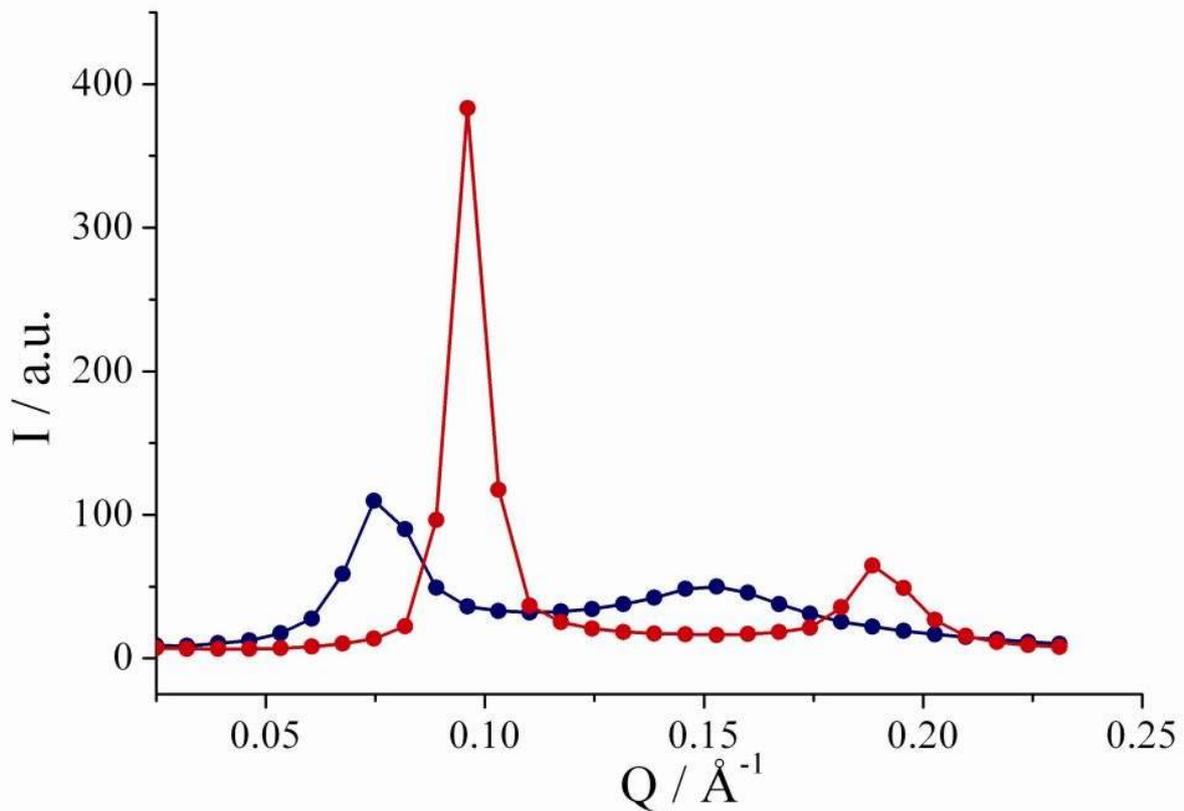


Abbildung 18: Kleinwinkelröntgenaufnahme im Vergleich (— LIPOID S 45 und — LIPOID E)

Die SAXS-Messung von LIPOID S 45 zeigte eine lamellare Struktur, die durch zwei Bragg-Peaks in einem Streuvektor-Verhältnis von 1:2 gekennzeichnet war, was einen d-Abstand von 83,1 Å ergab. Dies ist der größte d-Wert aller untersuchten PLs. In Dispersionen von LIPOID E 80 S wurde ein d-Wert von 65,7 Å festgestellt. Der Wiederholungsabstand nahm weiter ab, wenn PLs mit hoher PC-Menge (LIPOID S 100 und P 100) verwendet wurden, die also kaum geladene zusätzliche Komponenten enthielten. Die d-Abstandswerte (61,6 Å für P 100 und 62,2 Å für S 100) liegen nahe den Literaturwerten für reine synthetische PCs[29], [30]. Die Ergebnisse sind plausibel, da die beiden natürlichen PCs LIPOID S 100 und LIPOID P 100 eine sehr ähnliche Zusammensetzung mit hauptsächlich ungesättigten Ketten aufweisen. Exemplarisch sind die SAXS-Aufnahmen vom LIPOID S 45 und LIPOID E in Abbildung 18 dargestellt.

Die Ergebnisse für das Lyso-PL LIPOID S LPC 80 sind deutlich abweichend von den anderen. Für diese zeigte sich eine breite Intensitätsverteilung, die für eine einzelne Doppelschicht oder nicht korrelierte Mehrfachschichten typisch ist (Abbildung 19).

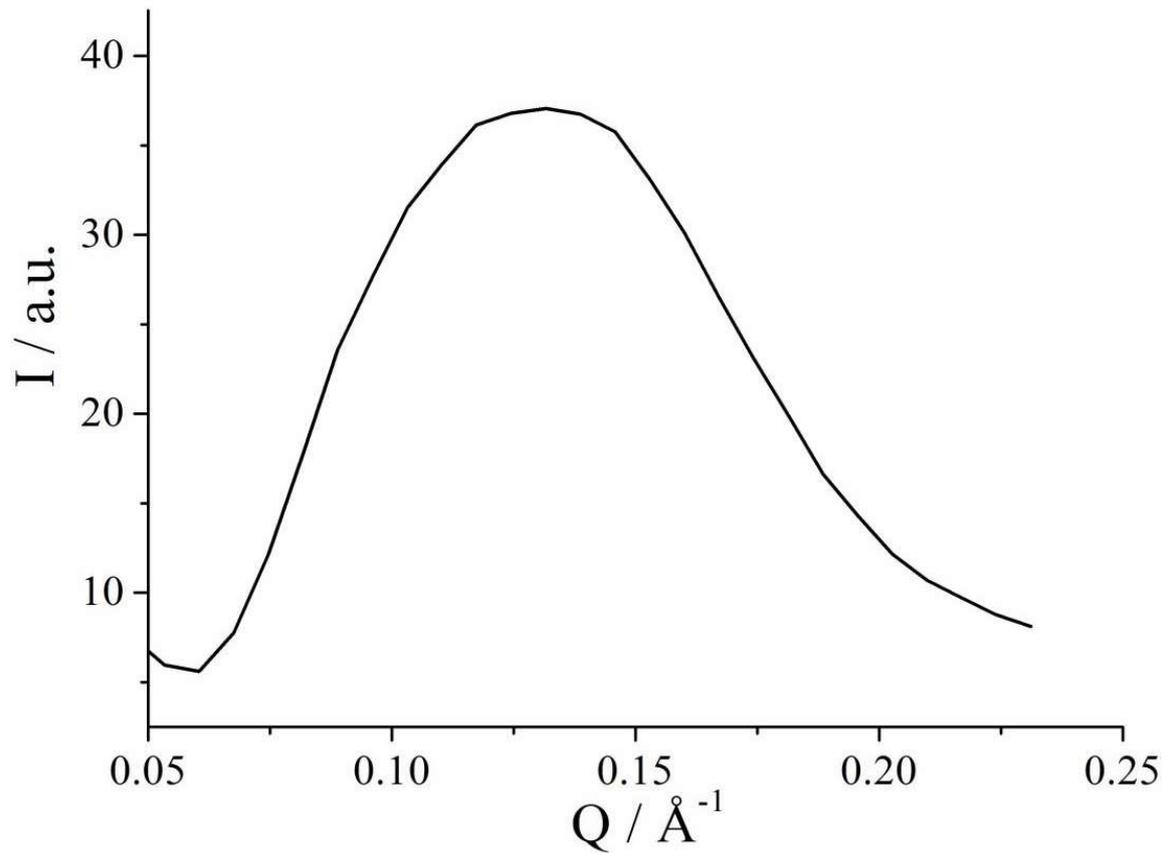


Abbildung 19: Streuintensität gegen den Streuvektor Q bei der Probe LIPOID S LPC 80

Die festgestellten unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der Proben waren bereits optisch im Verhalten der Proben zu erkennen. Die Proben, die Lamellenphasenstrukturen bilden, waren milchig und viskos, während jene von LIPOID S LPC 80 transparent und sehr flüssig ist (Abbildung 20).

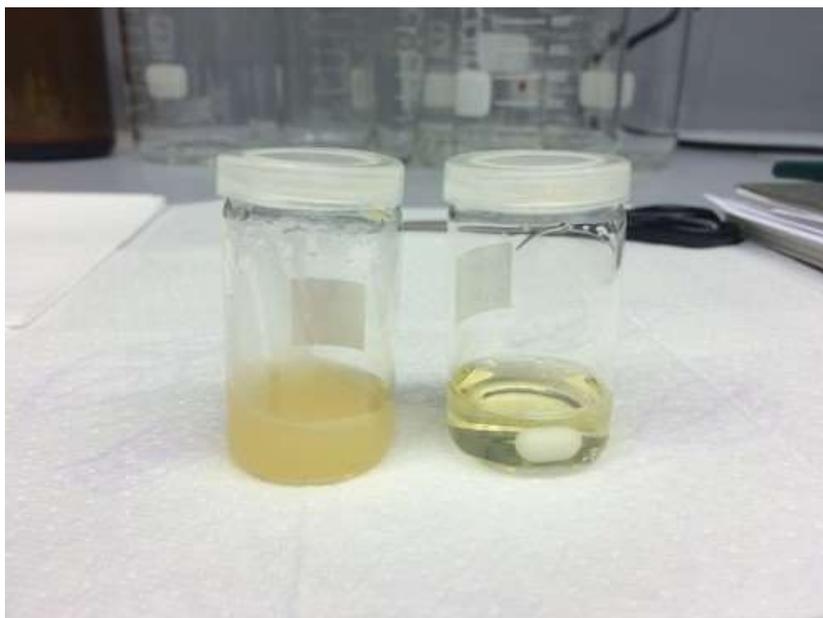


Abbildung 20: Die optische Transparenz der Dispersionen: Links LIPOID S 45 und rechts S LPC 80 (jeweils 20% (w/w) des PLs in 80% Puffer)

Die d-Werte der natürlichen PCs LIPOID P 100 und S 100 und der synthetischen PCs mit definierten Kettenmustern (DPPC und POPC) sind nahezu identisch. Dies ist bei der strukturellen Ähnlichkeit von beiden PCs auch erwartbar und in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur [29], [30].

Aufgrund von Abstoßungskräften, die durch die Ladung der anionischen Substanzen (negatives Zeta-Potential) in den natürlichen PLs verursacht werden, nimmt die Dicke der Doppelschicht mit zunehmender Konzentration der anionischen Substanzen zu. Es wird davon ausgegangen, dass Kettenlänge und Sättigung hauptsächlich für die "Feineinstellung" der Phospholipidschicht hinsichtlich Membranfluidität und Phasenübergangstemperatur verantwortlich sind [26]. Da die Van-der-Waals-Kräfte im Vergleich zu elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken schwächer sind, hat die Zusammensetzung der Kopfgruppe einen größeren Einfluss auf die Fläche pro Molekül (siehe Kap. 4.2) und die Doppelschichtabstoßung als die Kettenlänge und Konformation. Daher hängt die Korrelation zwischen Zeta-Potential und d-Abstand nicht maßgeblich von der Fettsäurezusammensetzung ab, sondern vom PC-Gehalt (Abbildung 21).

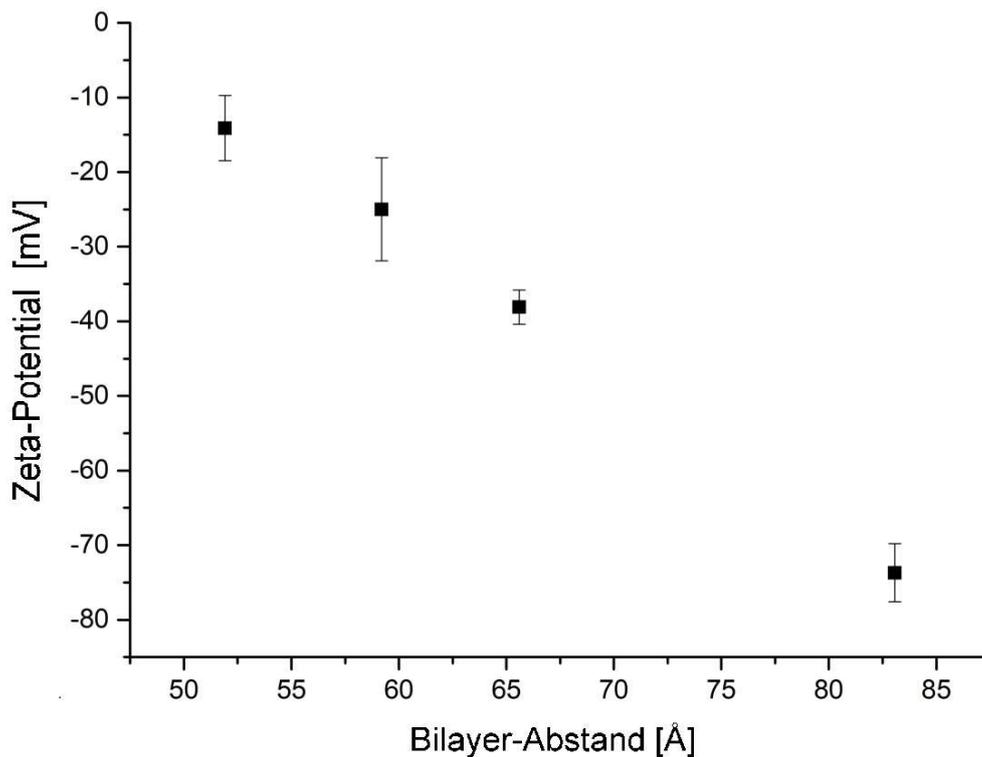


Abbildung 21: Korrelation von Zeta-Potential und der Bilayer-Dicke

Tabelle 13: Zeta-Potentiale und d-Werte von ausgewählten natürlichen PLs

PLs	d-Wert [Å]	Zeta Potential (50 °C) [mV]
LIPOID S 45	83.1	-73.7 ± 3.9
LIPOID E 80 S	65.6	-38.1 ± 2.3
LIPOID S 100	59.2	-25.0 ± 6.9
LIPOID P 100	51.9	-14.1 ± 4.4
DPPC	63.4	-13.7 ± 2.3
POPC	64.0	-5.3 ± 1.5

LIPOID S 45, das den höchsten Prozentsatz an negativ geladenen Substanzen enthält, hat den größten d-Wert, was auf eine starke elektrostatische Abstoßung zwischen den hydratisierten Doppelschichten hinweist. Diese Abstoßung dürfte auch der Grund für die kleinste Korrelationslänge zwischen den Doppelschichten sein. Eine Verringerung der Menge an geladenen Lipiden und eine Erhöhung der Menge an zwitterionischem PC erhöht nur geringfügig die Korrelationslänge. Die ermittelte Korrelationslänge, bestimmt durch die Scherrergleichung (Gleichung 6), von 295 Å entspricht nur 4,7 Doppelschichten für LIPOID S 45. LIPOID S 100 weist hingegen eine Korrelationslänge von 382 Å (6,5 Doppelschichten) auf, jene von LIPOID P 100 ist mit 883 Å deutlich größer und entspricht 17 Doppelschichten.

Tabelle 14: Berechnete Doppelschichten aufgrund von Korrelationslängen

PLs	Korrelationslänge [Å]	Entsprechen <i>n</i> Doppelschichten:
LIPOID S 45	295	3,5
LIPOID E	560	8
LIPOID E 80 S	560	9
LIPOID S 100	382	6,5
LIPOID P 100	883	17

3.4.3 Langmuir-Isothermen

Um den Einfluss der elektrostatischen Abstoßung auf die laterale Organisation der PL-Monoschicht weiter zu klären, wurden Langmuir-Experimente zur Bestimmung der π -A-Isothermen durchgeführt. Da die natürlichen PLs komplexe Mischungen darstellen (siehe Tabelle 2) wurde als Bezugsgröße die Fläche pro Gramm anstatt der Fläche pro Molekül verwendet, um bedeutsam erscheinende Eigenschaften der verschiedenen PLs auf Gewichtsbasis zu vergleichen. Als ein repräsentatives Beispiel für variierende Zusammensetzungen sind Monoschicht-Isothermen von PLs aus Sojabohnen mit unterschiedlichem Reinheitsgrad (S 45, S 75, S 80 und S 100) in Abbildung 22 dargestellt.

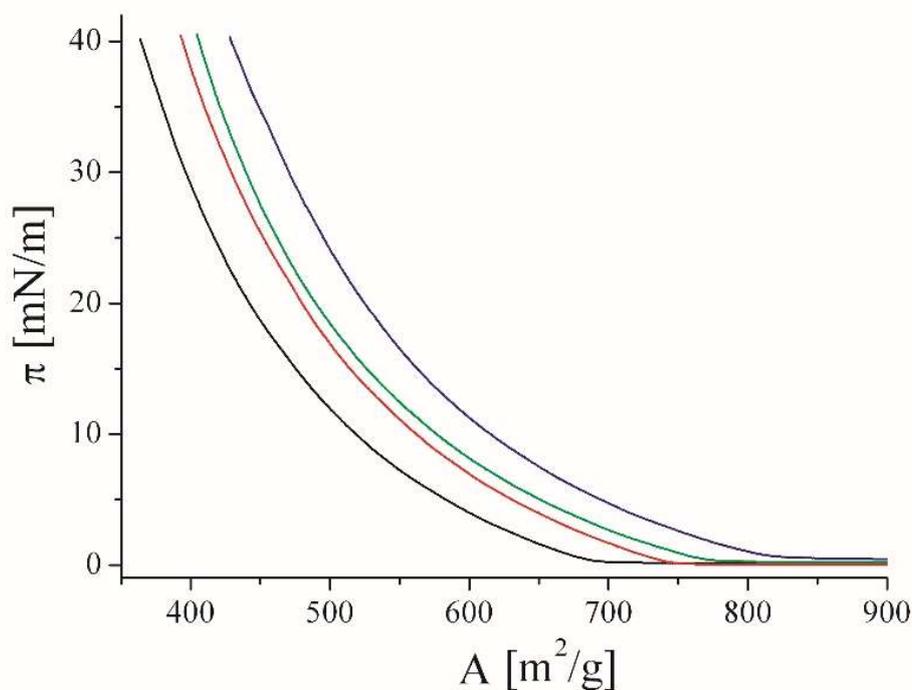


Abbildung 22: π -A Isothermen von Soja-PL mit variierendem PC-Gehalt (| S 100, | S 80, | S 75, | S 45) auf Reinstwasser bei 20 °C

Bei niedrigem Oberflächendruck und damit entsprechend großen Flächen befindet sich der Lipidfilm in einem dem Gas analogen Zustand (G). Bei der Kompression kann der Übergang erster Ordnung von G in den Zustand flüssig-ausgedehnt (liquid-expanded - LE) beobachtet werden. Der Übergangsdruck ist normalerweise sehr niedrig ($\sim 0,1$ mN/m). Wenn die molekulare Fläche ausreichend reduziert ist, befinden sich alle Lipide im LE-Zustand (Region mit ansteigendem Oberflächendruck), in dem die Konformation der Lipidketten gestört ist (d.h. Orientierungsordnung in kurzem Abstand, aber keine Positionsordnung in größeren Abständen). Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, gibt es außerdem kein horizontales Plateau, das einen Phasenübergang erster Ordnung von LE zu dem flüssig-kondensierten (liquid-condensed - LC) Zustand während der Kompression anzeigen würde. Die besondere Größe der

Monoschicht-Flächen ist als klares Indiz zu werten, dass sie sich ausnahmslos in der LE-Phase befanden. Aufgrund der Tatsache, dass die PLs im typischen Fall Mehrkomponentensysteme sind, kann diese Schlussfolgerung nur teilweise die reale Situation beschreiben.

Ein Expandieren zu größeren Flächen wurde beobachtet, wenn der Gehalt an PC (von S 45 bis S 100) erhöht wurde, was auf einen Kondensationseffekt hindeutet, der durch geladene Verbindungen in dem Gemisch verursacht wird. Dies steht in deutlichem Widerspruch zu den d -Werten, die in wässrigen Dispersionen beobachtet wurden. Die d -Werte erhöhten sich, wenn der Gehalt an geladenen Substanzen zunahm, was auf einen größeren Abstand zwischen den ausgebildeten Schichten hindeutet. Offensichtlich sind die geladenen Substanzen, die im Vergleich zu den ungeladenen Substanzen in geringeren Konzentrationen vorliegen, homogen innerhalb der Schicht verteilt. So kann die laterale elektrostatische Abstoßung der geladenen Substanzen durch die ungeladenen Substanzen abgeschirmt werden. Da außerdem die benötigte, effektive Kopfgruppenfläche der geladenen Substanzen im Vergleich zu der ungeladenen, zwitterionischen Komponente (große hydratisierte PC-Kopfgruppe) kleiner ist, führt das Mischen zu einer dichteren Packung mit dem Effekt eines kleineren Flächenbedarfs. Die zunehmende Ladung in der Schicht führt jedoch zu einer stärkeren Abstoßung zwischen benachbarten Schichten (größerer d -Abstand).

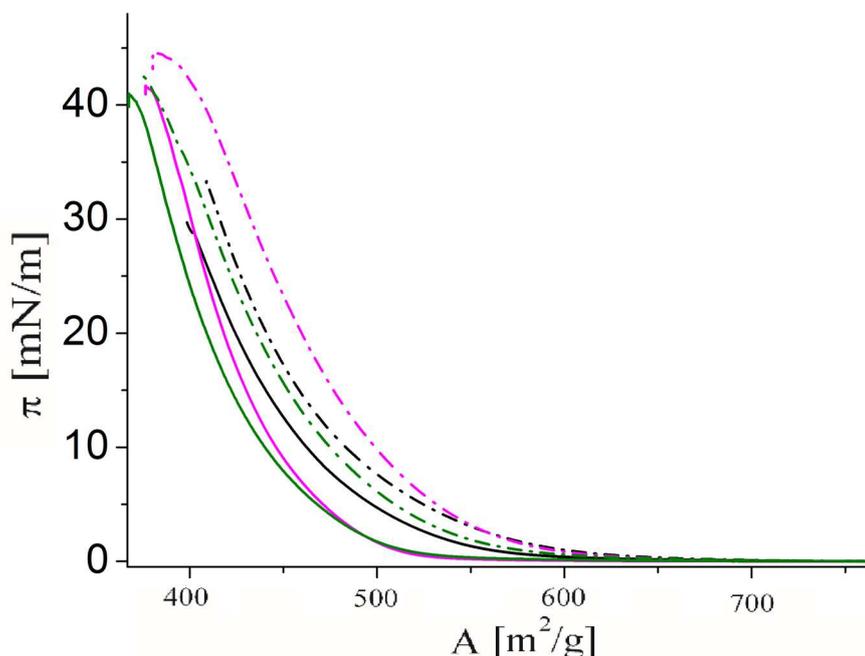


Abbildung 23: π - A Isothermen von S45 (schwarz), R50 (magenta), und H50 (oliv) auf Reinstwasser (durchgehende Linie) und auf Phosphatpuffer, pH 7.4, (gepunktet/gestrichelte Linie) bei 20 °C.

Verschiedene PLs (LIPOD S45, LIPOID R50 und LIPOID H50), die alle anionische Lipide enthalten, wurden auf Wasser und Phosphatpuffer untersucht, um den Einfluss des pH-Werts und zusätzlicher Ionen auf ihren Flächenbedarf zu untersuchen (Abbildung 23). Auf Wasser

sind LIPOID R 50 und LIPOID H 50 bei niedrigen Drücken sehr ähnlich, zeigen jedoch bei höheren Drücken ein anderes Verhalten in ihrer Kompressibilität. LIPOID S 45 wird auf größere Bereiche mit einer sehr ähnlichen Kompressibilität wie H 50 verschoben. Es kommt zu einem höheren „Lift-off“-Punkt. Dieser ist derjenige Messpunkt, bei dem zum ersten Mal der Oberflächendruck bei Kompression der Monoschicht registriert werden kann. Die Verschiebung zu größeren Flächen auf der Pufferlösung hängt vom untersuchten PL ab. Bei 20 mN/m Oberflächendruck beträgt die Flächenvergrößerung 14% für LIPOID S 45, 25% für LIPOID H 50 und 35% für LIPOID R 50.

Um den Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke auf die Fläche pro Gramm des verwendeten PLs zu untersuchen, wurden detaillierte Langmuir-Experimente an verschiedenen Subphasen durchgeführt. Dafür wurde LIPOID S 45 aufgrund seiner größeren Menge an geladenen Substanzen ausgewählt. Als gepufferte Subphasen wurden 50 mM Phosphatpuffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (pH 6 und 8) und 50 mM Zitronensäurepuffer (pH 4) verwendet. In allen Fällen wurde der pH-Wert mit NaOH eingestellt.

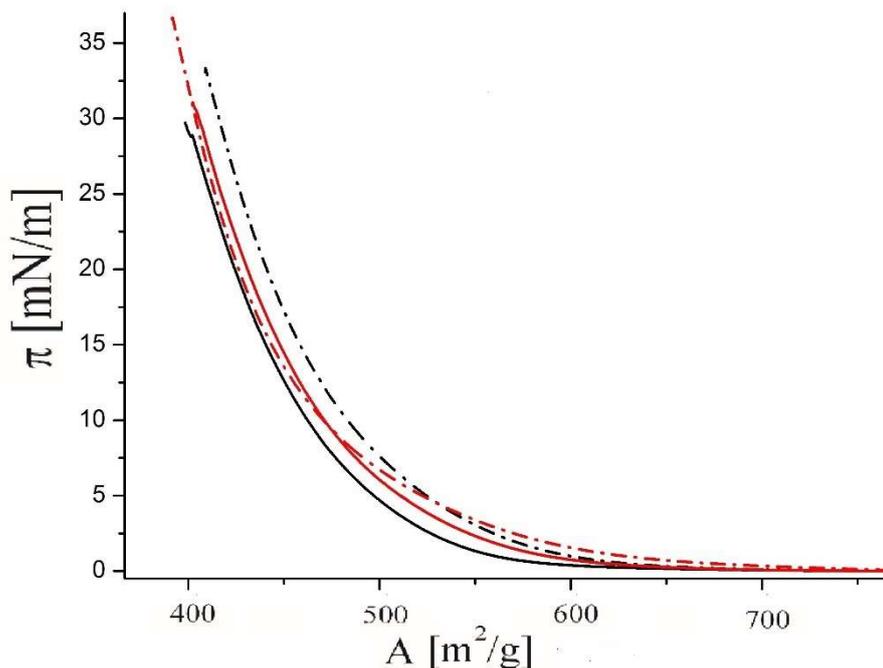


Abbildung 24: π - A Isothermen von LIPOID S 45 (schwarz) und LIPOID S 100 (Rot) auf Reinstwasser (durchgehende Linie) und auf Phosphatpuffer pH 7,4 (gestrichelte Linie)

Die Fläche pro Gramm für LIPOID S 45 auf der gepufferten Subphase sind größer als diejenigen auf Reinstwasser. Dieses Verhalten ist für LIPOID P 100 nicht beobachtet worden (Abbildung 24). Der offensichtliche Grund ist die größere Menge an geladenen Substanzen in LIPOID S 45 (siehe Tabelle 2). Der pKa der Phosphatgruppe in PC beträgt 1,0 und ist vergleichbar in LIPOID S 100, da diese 94 % zwitterionisches PC enthält. Die größere Menge an

PE in LIPOID S 45 beeinflusst dieses Verhalten nicht, da PE ein vergleichbares zwitterionisches Verhalten wie PC zeigt. Im Vergleich mit einer CO_2 -gesättigten Wasser-Subphase ergibt sich für eine Pufferlösung bei Anwesenheit von Ionen und erhöhtem pH-Wert ein vermutlich stärkerer Ionisierungsgrad für die geladenen Substanzen. Die erhöhte Ionisierung führt zu stärkeren elektrostatischen Abstoßungen, die nicht durch die Pufferionen abgeschirmt werden können.

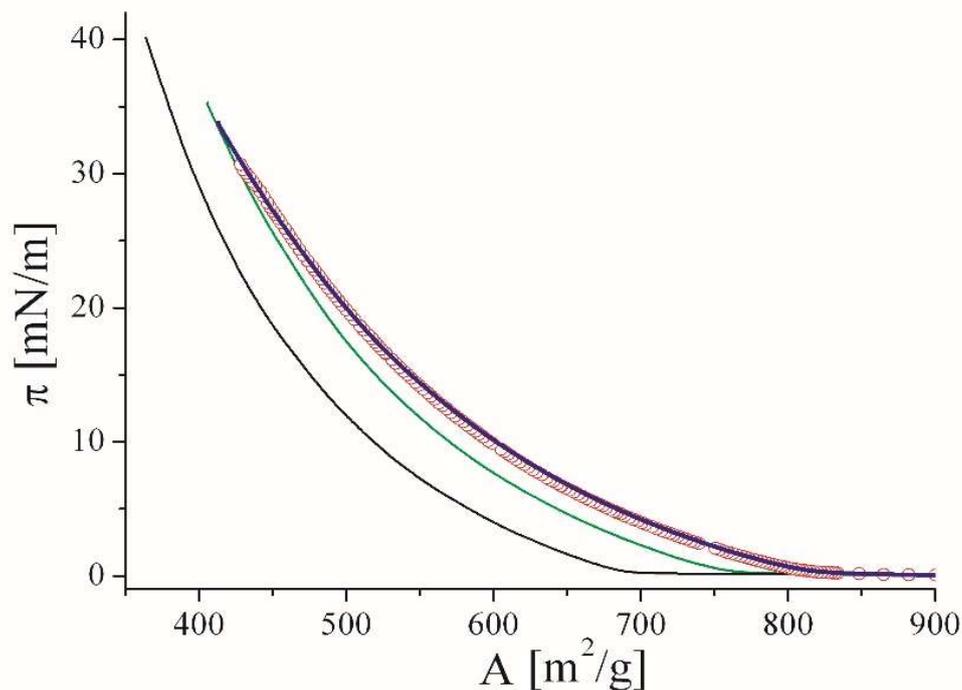


Abbildung 25: π -A Isothermen von LIPOID S 45 auf Reinstwasser (schwarz), auf Wasser mit 10 mM CaCl_2 (grün), auf Wasser mit 50 mM CaCl_2 (blau), und auf Wasser mit 150 mM NaCl (rote Kreise) bei 20 °C.

Wasser zur Erhöhung der Ionenstärke von 30 mM auf 150 mM (Abbildung 25), führte dies zu einem erhöhten Ionisationsgrad der anionischen Substanzen in LIPOID S 45 und verschob die Fläche pro Gramm PL zu höheren Werten. Aufgrund des Vorhandenseins von unbekanntem Substanzen in LIPOID S 45 ist es schwierig, die Ergebnisse im Detail zu interpretieren.

Um zu untersuchen, ob die Valenz der Kationen eine zusätzliche Rolle für die Kompressibilität der Flächen spielt, wurden zusätzlich Experimente auf Subphasen mit 150 mM NaCl und 50 mM CaCl_2 durchgeführt und verglichen (siehe Abbildung 25). Die Isothermen, die bei 150 mM NaCl und 50 mM CaCl_2 gemessen wurden, sind nahezu identisch. Damit ist ein deutlicher Hinweis gegeben, dass die Ionenstärke maßgeblich ist und nicht die erwartete kondensierende Wirkung von zweiwertigen Kationen. Die dargelegten eigenen Befunde kontrastieren Daten aus Experimenten mit reinen, synthetischen PLs, die bekanntlich keine geladenen Substanzen enthalten [31].

3.4.4 Brewster Angle Mikroskopie (BAM)

Die anzunehmende Homogenität der Monoschichten wurde durch BAM-Experimente verifiziert (Abbildung 26). Bei stark heterogenen PL-Gemischen ist in Erwägung zu ziehen, dass je nach Kettenlänge und Kopfgruppenverteilung eine Phasenpräferenz vorliegt, die zur Entmischung der PLs in den Langmuir-Schichten führt. PLs mit längeren Ketten könnten in kondensierten Phasen existieren, während jene mit kürzeren Ketten deutlich flüssig expandierte Phasen bilden könnten. Auf solche Verhältnisse gab es keine Hinweise bei der Mikroskopie. Bei geringem lateralen Druck auf die Monoschicht konnten zwar gewisse Helligkeitsunterschiede festgestellt werden, die bei weiterer Kompression jedoch wieder verschwanden. Nach abgeschlossener Komprimierung erschienen die Schichten homogen. Falls phasentrennte Domänen auftraten, müssen sie das Auflösungsvermögen des Mikroskops unterschritten haben.

Beispielhaft dafür ist Abbildung 22, die die mikroskopische Aufnahme von LIPOID S 45 auf Phosphatpuffer (pH 7,4) und bei 5 mN/m lateralem Druck zeigt. Exemplarisch wurde LIPOID S 45 untersucht aufgrund der größten Heterogenität der Zusammensetzung aller untersuchter PLs.

Interessanterweise konnten die heterogenen Bereiche, welche bei hohem Druck auf synthetische PLs beschrieben sind [32] für LIPOID S 45 nicht beobachtet werden. Der Zusammenbruch der Monoschichten hingegen war vergleichbar mit den beschriebenen Mechanismen [33].

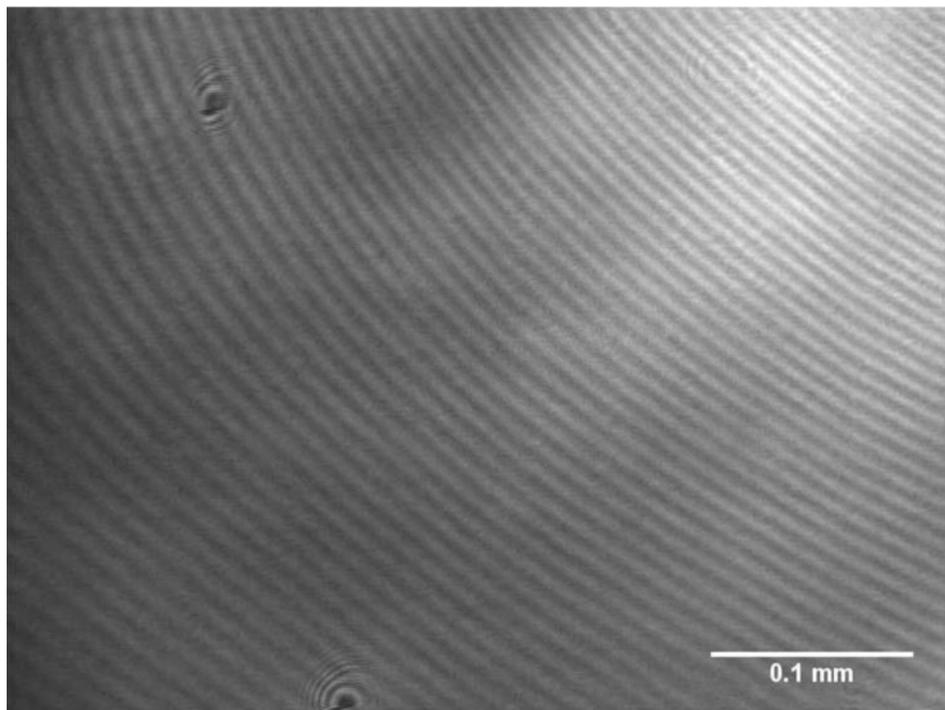


Abbildung 26: Brewstermikroskopaufnahme von LIPOID S 45 auf Phosphatpuffer, pH 7,4 bei 5 mN/m und 20°C

3.5 Entwicklung von Methoden zur mikroskopischen Untersuchung von Phospholipid Emulsionen

Um das Verhalten von PLs an der Grenzfläche zu visualisieren und zu bewerten erschienen mikroskopische Aufnahmen von PL-basierten Emulsionen als Mittel der Wahl. Die unterschiedlich ausgebildeten Schichten sollten beim Einsatz von PLs als Emulgator vergleichbare Unterschiede zu den in Kapitel 3.4 gewonnenen Erkenntnissen zeigen. Dies sollte sich durch die mikroskopische Betrachtung der Emulsionen bestätigen lassen.

Um die gewonnenen Erkenntnisse für die Wahl des PLs und der wässrigen Phase zur Stabilität von Emulsionen zu korrelieren, musste eine hinreichend robuste und reproduzierbare Methode entwickelt werden, um die physikalische Stabilität einer Emulsion bestimmen und vergleichen zu können. Als Kriterium für die physikalische Stabilität dient in Ermangelung valider analytischer Methoden bisher meist nur die organoleptische Untersuchung der betreffenden Emulsion. Um Langzeit- bzw. Lagerstabilität zu prüfen, werden häufig verschiedene Verfahren eingesetzt, die zu einer Beschleunigung der Phasentrennung führen. Auf diese Weise werden praxisrelevante Vorgänge in einem zeitlich stark verkürzten Verlauf simuliert. Dabei werden Temperaturerhöhung, Gefrier- und Auftauzyklen oder wie bei der HLB-Bestimmung das Zentrifugieren der entsprechenden Emulsionen angewandt. Diese forcierte Phasenseparation für eine anschließende visuelle Beurteilung beschreibt den Zustand der Emulsion zwischen Herstellung und Separation nur ungenügend und kann daher nicht prädiktiv eingesetzt werden. Aus diesem Grund war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, eine verlässlichere und weniger aufwändige Methode zu entwickeln und anzuwenden. Um die Vergleichbarkeit der Methoden zu gewährleisten wurde sich für ein optisches Verfahren, die Mikroskopie, entschieden.

Da die Prozesse innerhalb einer Emulsion, welche final in einer Phasentrennung resultieren, äußerst komplex und veränderbar sind, wird als entscheidendes Kriterium für die physikalische Stabilität einer Emulsion häufig die Beobachtung des „Brechens“ der Emulsion herangezogen. Dieses lässt sich mit verschiedenen Mikroskopiertechniken feststellen. Das Standardverfahren ist die Hellfeldmikroskopie. Um eine quantifizierbare Aussage zur Stabilität unterschiedlicher Emulsionen treffen zu können, wurden auch lichtmikroskopische Studien durchgeführt

Die beiden größten Herausforderungen, welche bei Untersuchungen und Bildaufnahme von pharmazeutischen Emulsionen bestehen, sind der geringe Kontrast zwischen kontinuierlicher und disperser Phase und die Bildung von Artefakten durch die Präparation der Objekte, welche eine präzise Auswertung erschwert.

Der geringe Kontrast ist bei der klassischen Lichtmikroskopie besonders problematisch, da sich die lipophilen Phasen hinsichtlich ihrer Brechungsindizes kaum von Wasser unterscheiden. Beispielhaft in Abbildung 27 dargestellt.

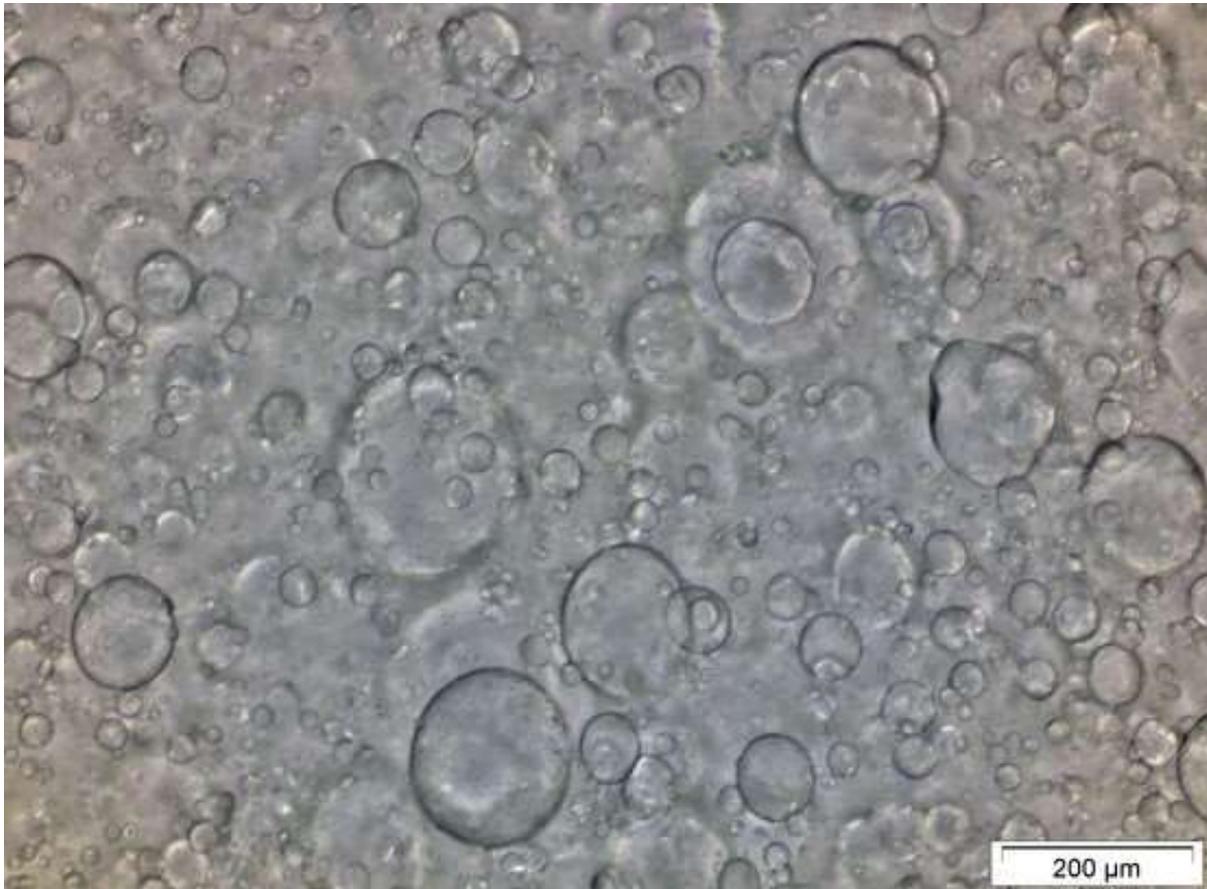


Abbildung 27: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45)

3.5.1 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Als erstes Verfahren zur Erhöhung des Kontrastes wurde die Environmental Scanning Electron Microscopy evaluiert. Wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, ist sie durch eine hohe Vergrößerung und Auflösung sowie durch einen geringen Präparationsaufwand zur Minimierung von Artefakten gekennzeichnet. In Summe führt dies zu einer (theoretisch) sehr detailgetreuen und wirklichkeitsnahen Darstellung der herrschenden Verhältnisse in einer Dispersion.

Die Herstellung der Emulsion erfolgte wie im experimentellen Teil der Arbeit beschrieben (Kapitel 5). Als repräsentatives PL wurde LIPOID S 75 ausgewählt, ein PL mittlerer Aufreinigungsstufe und damit durchschnittlicher Zusammensetzung. Als Ölphase wurde MCT gewählt, um eine möglichst stabile Emulsion (siehe Kapitel 3.1) herzustellen.

Obwohl ESEM im Vergleich zu anderen Techniken der Elektronenmikroskopie in der Literatur als geeignetste Methode zur Visualisierung von Emulsionen beschrieben ist [34], [35]

konnten unter den gewählten Bedingungen keine geeigneten, reproduzierbaren Bilder ohne Verzerrung der Struktur der Tröpfchen erzeugt werden (Abbildung 28).

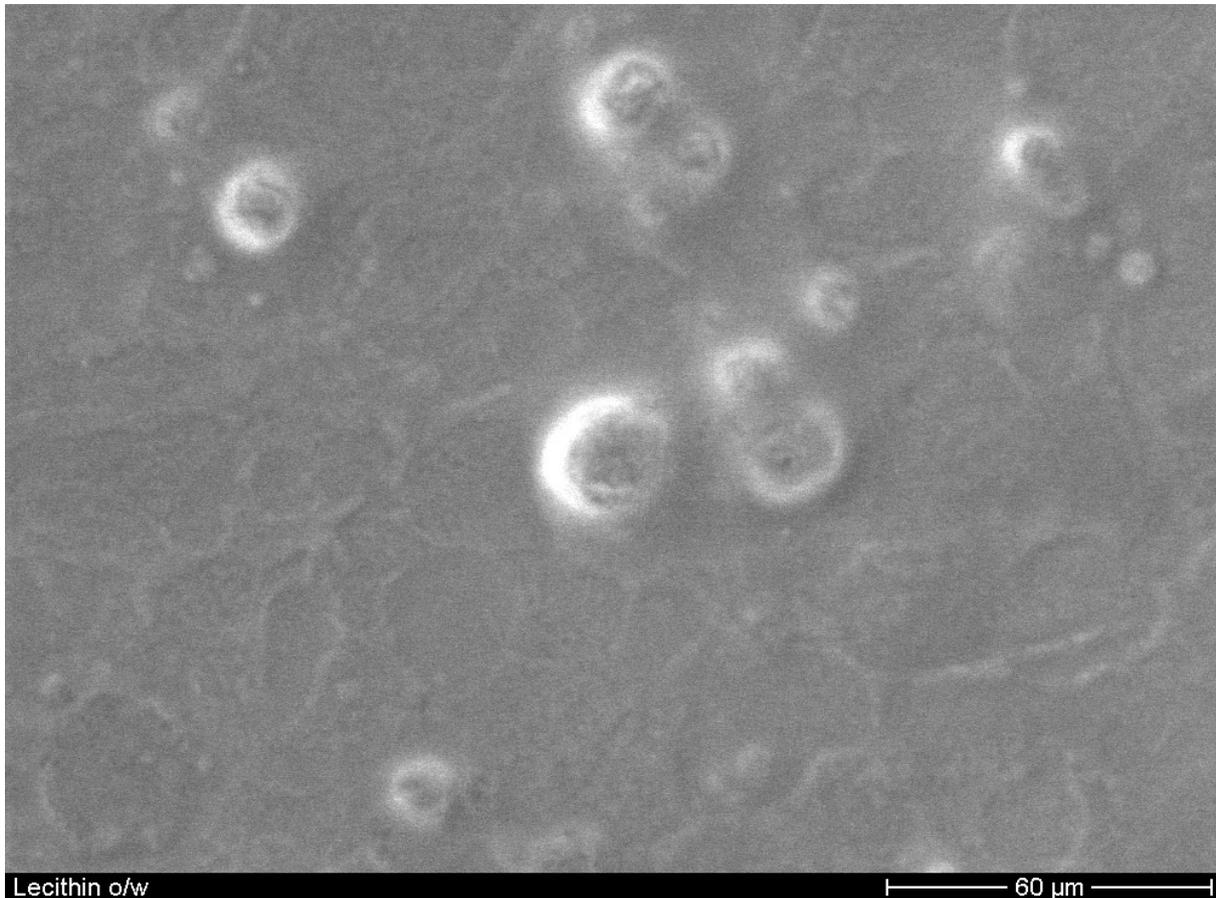


Abbildung 28: ESEM-Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 75)

Die hellen, runden Gebilde sind vermutlich stabile Öltröpfchen, während die Wasserphase evaporiert erscheint. Das schnelle Evaporieren ist für dünnflüssige Zubereitungen in der Literatur beschrieben [35]. Die Strukturen im Hintergrund sind vermutlich Reste der natürlichen PLs die nach der Evaporation zurückgeblieben sind. Aufgrund der Anzahl, Form und Größe der Gebilde kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um Artefakte auf dem Messteller handelt.

3.5.2 Polarisationsmikroskopie

Als weitere Möglichkeit zur mikroskopischen Untersuchung von PL- Emulsionen wurde das Verfahren der Polarisationsmikroskopie auf Eignung geprüft. Hierbei sollte die Struktur, Anzahl und Größe der dispergierten MCT-Tröpfchen durch die Verwendung von polarisiertem Licht analysiert werden. Durch die Verwendung von polarisiertem Licht wird der Kontrast der zu untersuchenden Strukturen erhöht. Als natürliches PL wurde wiederum LIPOID S 75 ausgewählt und als Ölphase wieder MCT (Kapitel 5.8).

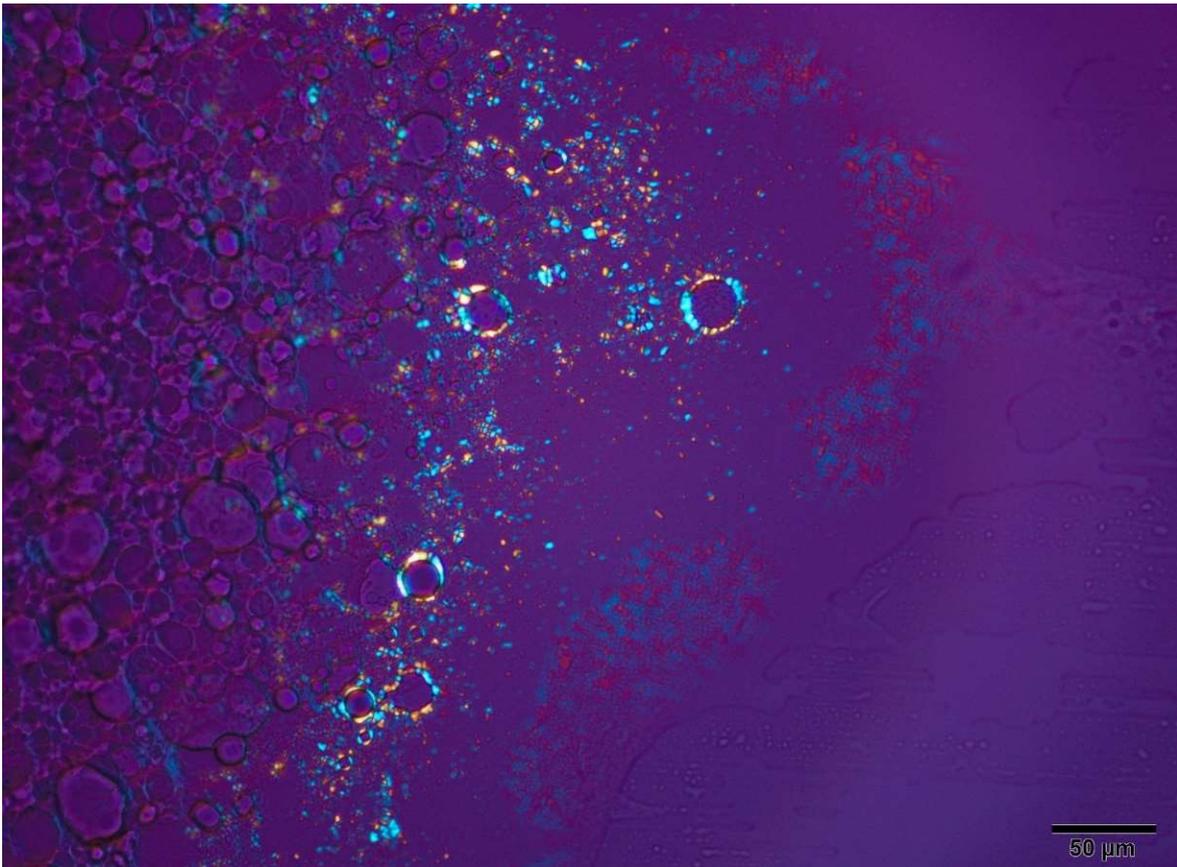


Abbildung 29: Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 75)

Wie in Abbildung 29 erkennbar, sind dispergierte Öltröpfchen bei entsprechender Fokussierung und Schichtdicke im polarisierten Licht relativ gut zu sehen. Auffällig ist die Ausbildung anisotroper Eigenschaften an der Grenzfläche von hydrophiler und lipophiler Phase, die durch gewisse Strukturmerkmale des PLs bedingt sind. Die Doppelbrechung ergibt sich aus der Schichtanordnung und den unterschiedlichen Brechungsindizes [36].

Für eine präzise Ermittlung der Tröpfchengröße von PL-Emulsionen hat sich die Polarisationsmikroskopie als ungeeignet erwiesen. Durch die anisotrope Brechung des polarisierten Licht ergibt sich keine sehr scharfe Abgrenzung der Strukturen die für eine exakte Messung erforderlich ist.

Als Vorteil der Methode lässt sich die gute Erkennbarkeit der dispergierten Tröpfchen konstatieren. Nachteilig sind für eine präzise Vermessung der Tröpfchengröße sind die durch das polarisierte Licht produzierten Formartefakte im mikroskopischen Bild.

3.5.3 Hellfeldmikroskopie mit gefärbtem Präparat

Eine weitere häufig genutzte Möglichkeit den Kontrast zu erhöhen ohne Artefakte an den Rändern der Strukturen zu generieren ist die Anfärbung der Präparate. Für O-W-Emulsionen bieten sich hierfür eine Vielzahl an lipophilen Farbstoffen an. Für die Pharmazie sind die bekanntesten und am häufigsten benutzten die Vertreter der Sudanfarbstoffe. Allerdings ist die

Färbung von Tröpfchen von nur wenigen Mikrometer Durchmesser weit weniger intensiv als von größeren. Gründe sind der geringere Gehalt an Farbstoff, aber auch physikalisch bedingte Umstände wie das begrenzte optische Auflösungsvermögen des Mikroskops und die stärkere Lichtbrechung aufgrund der stärkeren Krümmung des Tröpfchenrandes [37], [38]. Die lipophile Phase muss vor Präparation der Emulsion angefärbt werden, um eine komplette Verteilung in den Tröpfchen zu gewährleisten und um die Emulsion nicht nachträglich durch Einbringung von Farbstoffen schwer kontrollierbar modifizieren zu müssen.

Bei einer nachträglichen Färbung müssten dafür große Kräfte auf die Emulsion wirken, um eine homogene Verteilung des Farbstoffes zu gewährleisten. Dadurch lässt sich der aktuelle Zustand der Emulsion nicht mehr verlässlich beurteilen, da jeder Eintrag von Energie den thermodynamischen Zustand verändert und damit die Stabilität der Emulsion modifiziert. Es ist theoretisch möglich den benötigten Energieeintrag für jede Färbung der Emulsion zu berechnen und konstant zu halten. Dieser müsste für eine homogene Färbung der dispersen Phase hoch sein, damit Tröpfchen mit geringerem Durchmesser ebenso korrekt erfasst können. Allerdings sind die Prozesse bei der Phasentrennung sehr komplex und entsprechen keiner linearen Kinetik [39].

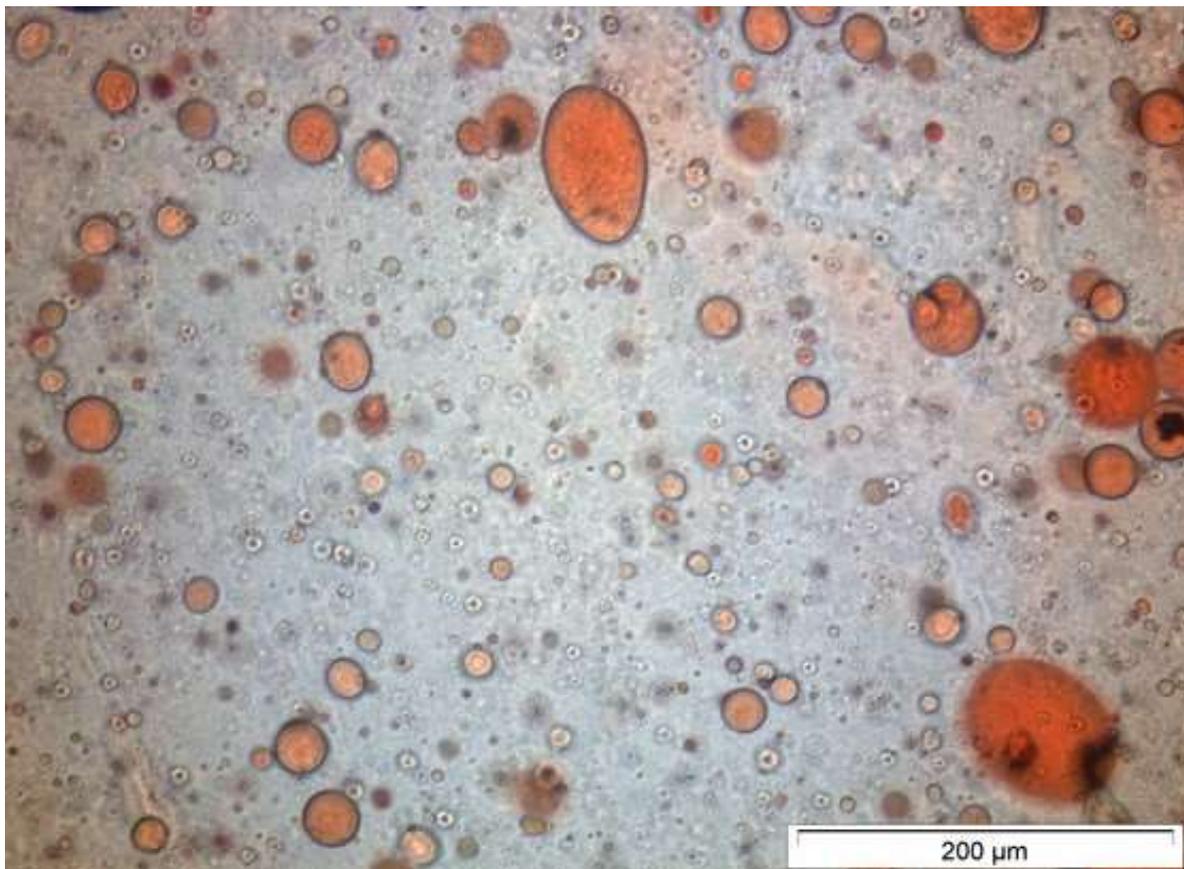


Abbildung 30: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45)

Aus den ersten lichtmikroskopischen Aufnahmen ergab sich eine weitere Herausforderung für die mikroskopische Untersuchung von Emulsionen. Die Tröpfchengröße in einer Emulsion ist nicht gleichmäßig verteilt bzw. verbleibt nicht in diesem Zustand aufgrund der thermodynamischen Instabilität. Dadurch war es schwierig nur genau eine Schicht an Tröpfchen auf dem Objektträger zu präparieren. Bei mehrschichtiger Präparation, wie in Abbildung 30 dargestellt, reduzierte sich der Kontrast der aufgenommenen Strukturen aufgrund stärkerer Lichtabsorption und -streuung. Ebenfalls überlagerten sich die aufgenommenen Strukturen und erschwerten damit eine eindeutige Differenzierung und Auswertung [40].

Eine solche einschichtige Präparation kann bei einer Schmierpräparation erzielt werden, wie sie auch in der Mikroskopie biologischer Proben genutzt wird. Dabei wird die Emulsion auf dem Objektträger ausgestrichen („geschmiert“), um einen möglichst dünnen Film des Präparates zu erreichen. Dies führte allerdings zu starken Artefakten bei größeren Tröpfchen, welche dabei formverändert werden und eine größere, ungleichmäßige Fläche einnehmen im Vergleich zur runden Ruheform der Tröpfchen.

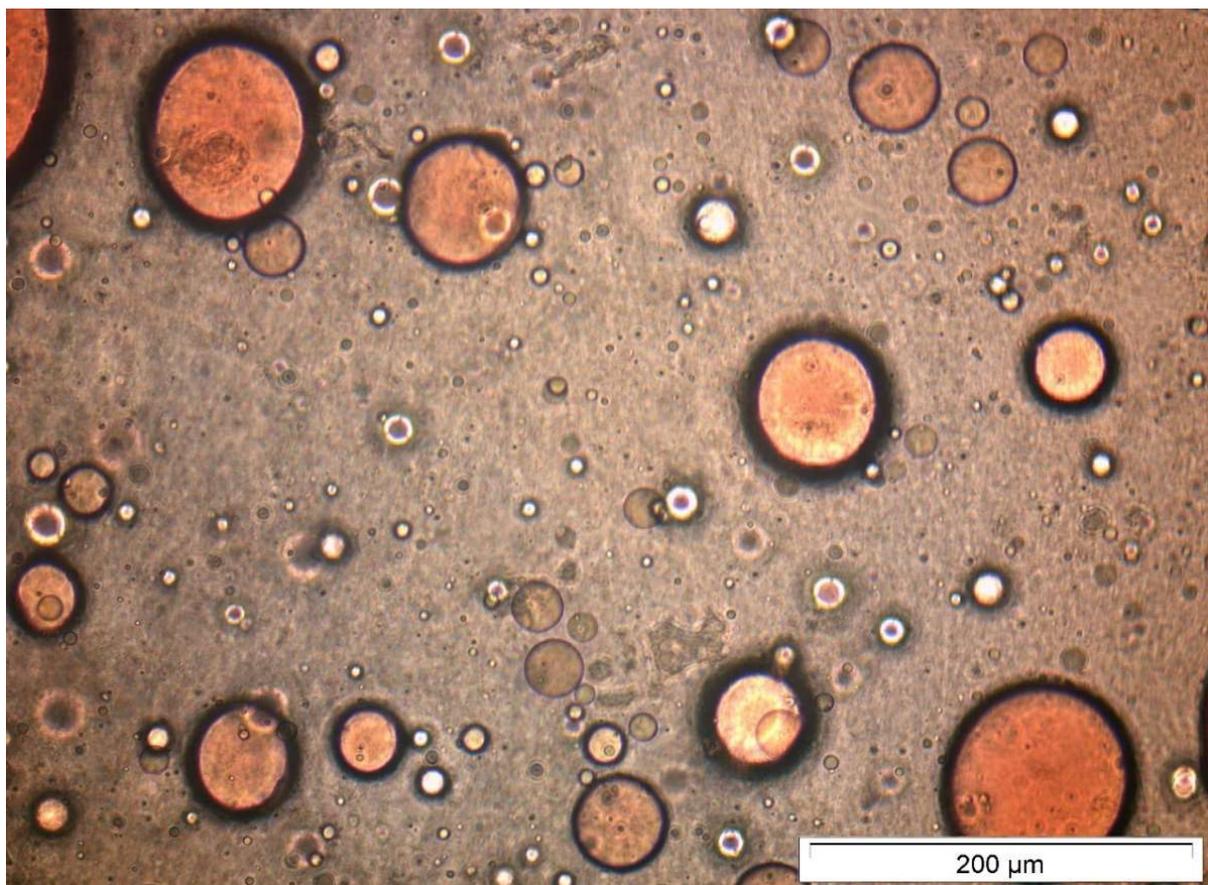


Abbildung 31: Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angeführten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlschliffobjektträger

Um eine einschichtige Präparation zu gewährleisten wurden Hohlschliffobjektträger gewählt, welche eine Vertiefung für das zu untersuchende Objekt besitzen. Dadurch kann an den Seiten der Vertiefung ein optimaler Abstand zwischen Objektträger und Deckglas gefunden

werden, bei dem die geeignete Schichtdicke vorliegt. Eventuell entstehende Kapillareffekte sind dabei vernachlässigbar.

Um eine bessere optische Auflösung und eine Erhöhung des Kontrastes zu erreichen, wird die klassische Hellfeldmikroskopie häufig modifiziert zur Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wird ein entsprechender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, um die gewünschten Strukturen hervorzuheben. Dabei kann auch unterhalb der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops gearbeitet werden. Diese Technik wurde bereits erfolgreich für Untersuchungen von Emulsionen verschiedenen Typs eingesetzt. [41], [42]. Nachteilig sind hierbei die hohen Kosten für den Fluoreszenzfarbstoff und der präparative Aufwand, da auch hier die zu untersuchenden Emulsionen bereits während der Herstellung angefärbt werden müssen.

3.5.4 Dunkelfeldmikroskopie

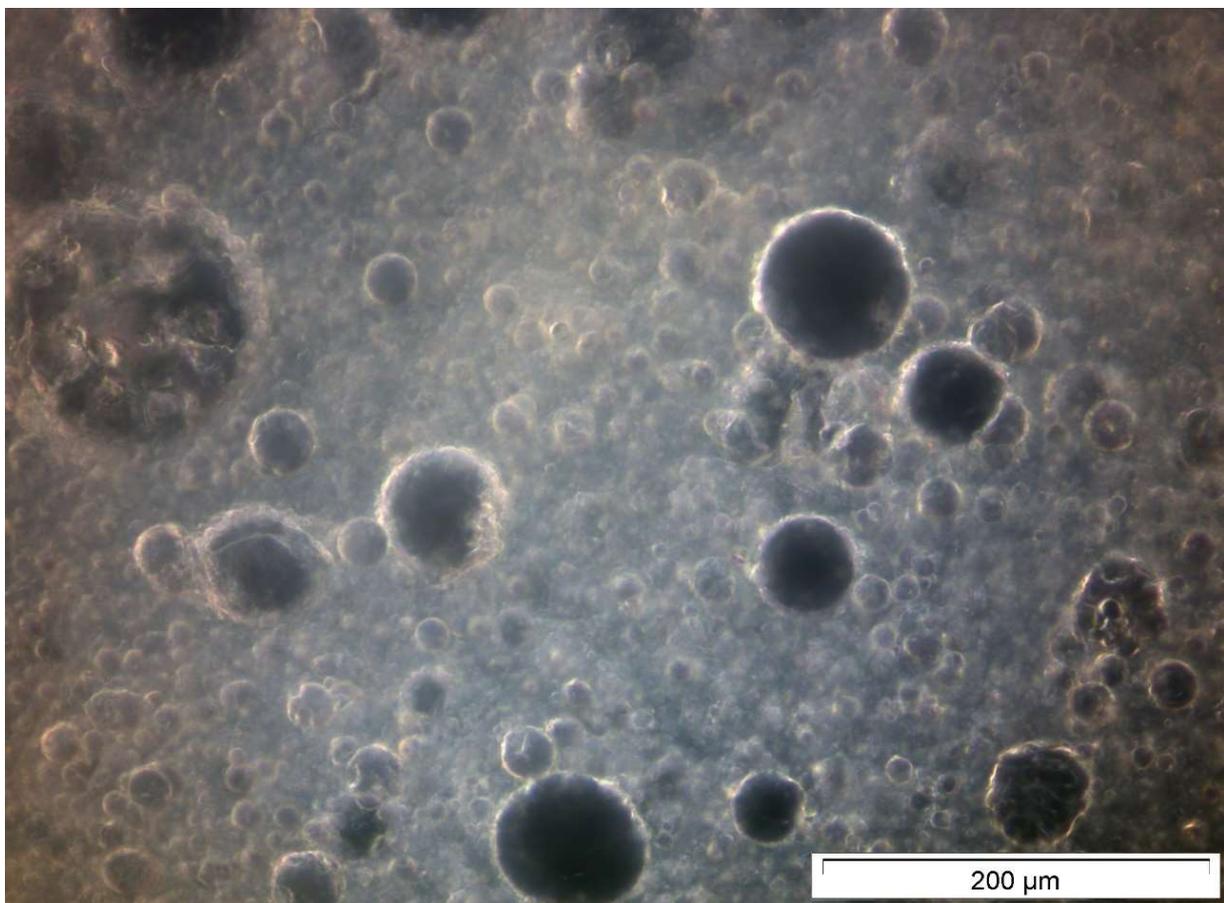


Abbildung 32: Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlschliffobjekttträger

Dunkelfeldmikroskopie unterscheidet sich im Vergleich zur klassischen Hellfeld-Mikroskopie durch die Art der Abbildung der Strukturen. Während im Hellfeld Objekte hervorgehoben werden, die auftreffende Lichtstrahlen absorbieren, wirken im Dunkelfeld die abgelenkten Strahlen strukturabbildend. Dadurch erscheint im Allgemeinen der Hintergrund dunkler, während Objekte im Strahlengang hell abgegrenzt erscheinen. Im Falle der Tröpfchen erfolgt an

der Grenzfläche eine Lichtablenkung und Intensitätserhöhung, wodurch ein hoher Kontrast erzeugt wird [22]. Aber auch dieser wird abgeschwächt, je mehr Tröpfchenschichten übereinanderliegen. Deshalb ist es wichtig entsprechende Bereiche des Hohlsliffobjekträgers zu untersuchen, bei denen ein günstiger Kompromiss zwischen Schichtdicke und Kontrast besteht.

Diese Suche nach günstigen optischen Verhältnissen ist der Grund, warum keine Automatisierung der Bildaufnahme, z. B. über einen mittels Computer gesteuerten Objektisch möglich ist. Manuelle Bildaufnahme ist immer mit Selektivität und damit auch Subjektivität verbunden. Deswegen ist eine gewisse Mindestanzahl manuell erzeugter Bilder erforderlich, um Datenmenge und Objektivität zu erhöhen und eine statistische Absicherung zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 respektive 5 Aufnahmen für eine Emulsionsauswertung erstellt. Eine weitere Möglichkeit die geschilderte Problematik der Subjektivität zu minimieren, wäre die Untersuchung von vorher verblindeten Proben oder die Durchführung durch mehrere unabhängige Personen. Trotz dieser Einschränkungen stellt die gewählte Methode den besten Kompromiss zur Bewältigung der genannten Herausforderungen dar.

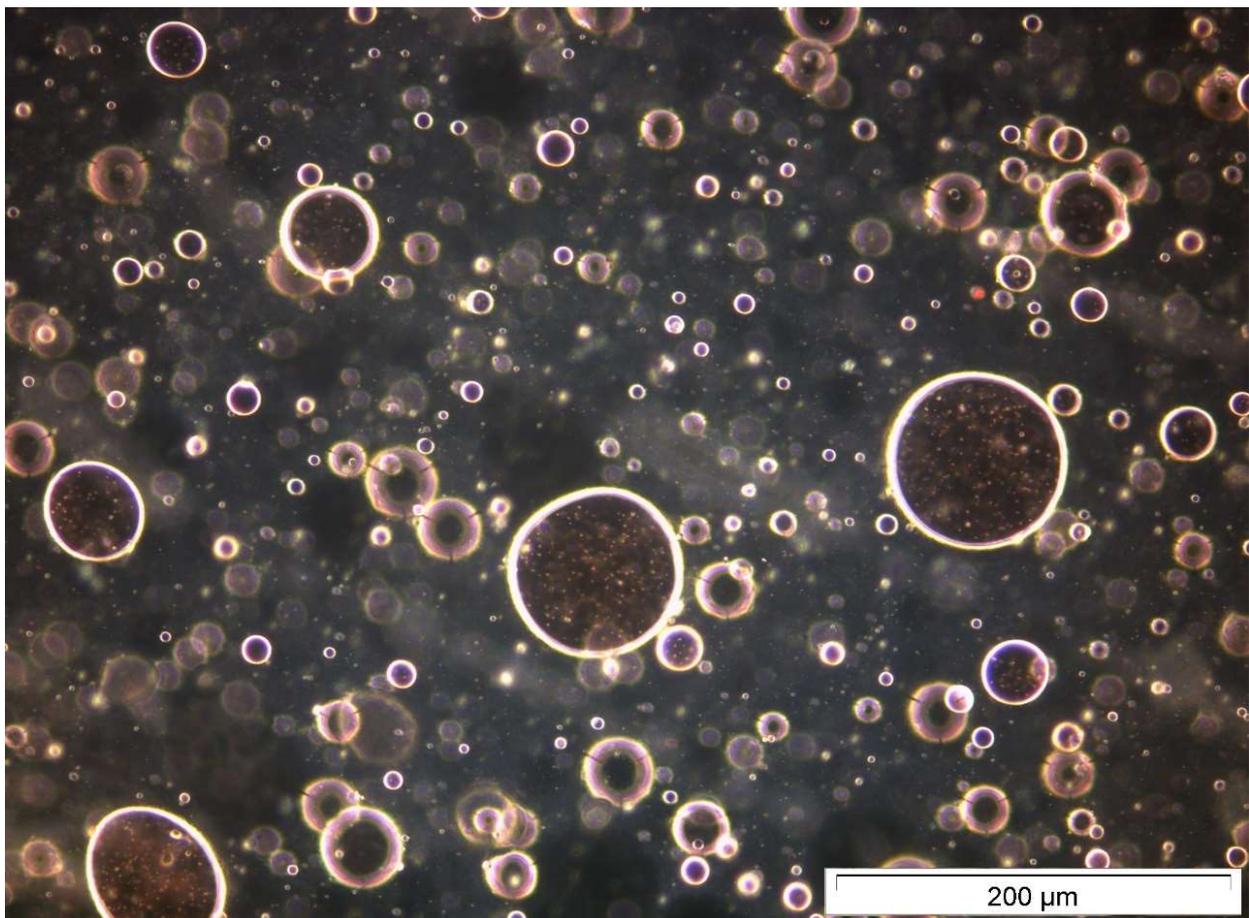


Abbildung 33: Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohlsliffobjekträger

Eine Übersicht der Vor- und Nachteile der für die Methodenentwicklung gewählten Mikroskopiertechniken ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Übersicht der Vor- und Nachteile der Mikroskopiertechniken

Mikroskopie- technik	Vorteil	Nachteil
ESEM	Hohe Auflösung,	Viele Artefakte durch Evaporation der kontinuierlichen Phase, Geringer Kontrast
Polarisations- mikroskopie	Hoher Kontrast	Viele Artefakte durch polarisiertes Licht Limitierte Auflösung
Hellfeldmikrosko- pie	Einfache Präparation	Geringer Kontrast Limitierte Auflösung
Hellfeldmikrosko- pie mit Anfärbung	Hoher Kontrast	Limitierte Auflösung Geringe Abgrenzung der Struktur- grenzen
Dunkelfeld- mikroskopie	Hoher Kontrast, Hohe Abgrenzung der Struk- turgrenzen	Limitierte Auflösung

3.6 Entwicklung der automatisierten Prozessierung der mikroskopischen Aufnahmen

Die Optimierung der per Dunkelfeldmikroskopie gewonnenen Aufnahmen (siehe Kapitel 3.5) ist entscheidend für deren qualitätsgerechte automatisierte Auswertung. Während eine individuelle Bildauswertung durch versierte Personen auf wissenschaftlicher Erfahrung und Abwägung beruht, muss für ein automatisiertes Verfahren ein strikter parameterbasierter Algorithmus definiert werden, für den eine mit der individuellen Auswertung vergleichbare Qualität anzustreben ist. Für eine entsprechende Software muss in letzter Konsequenz ein maßgeblicher Parameter festgelegt werden, der steuert, ob eine Strukturerrfassung erfolgen soll oder auszuschließen ist. Dieser wird beim beschriebene Sachverhalt über binärisierte Schwarz-Weiß-Bilder gewährleistet. Bedeutungsvoll ist dabei ein hoher Kontrastunterschied an den Grenzen der Partikel, um Größen korrekt zu erfassen und um das bildabhängige manuelle Einstellen des Schwellenwertes präzise, einfach und verlässlich zu ermöglichen.

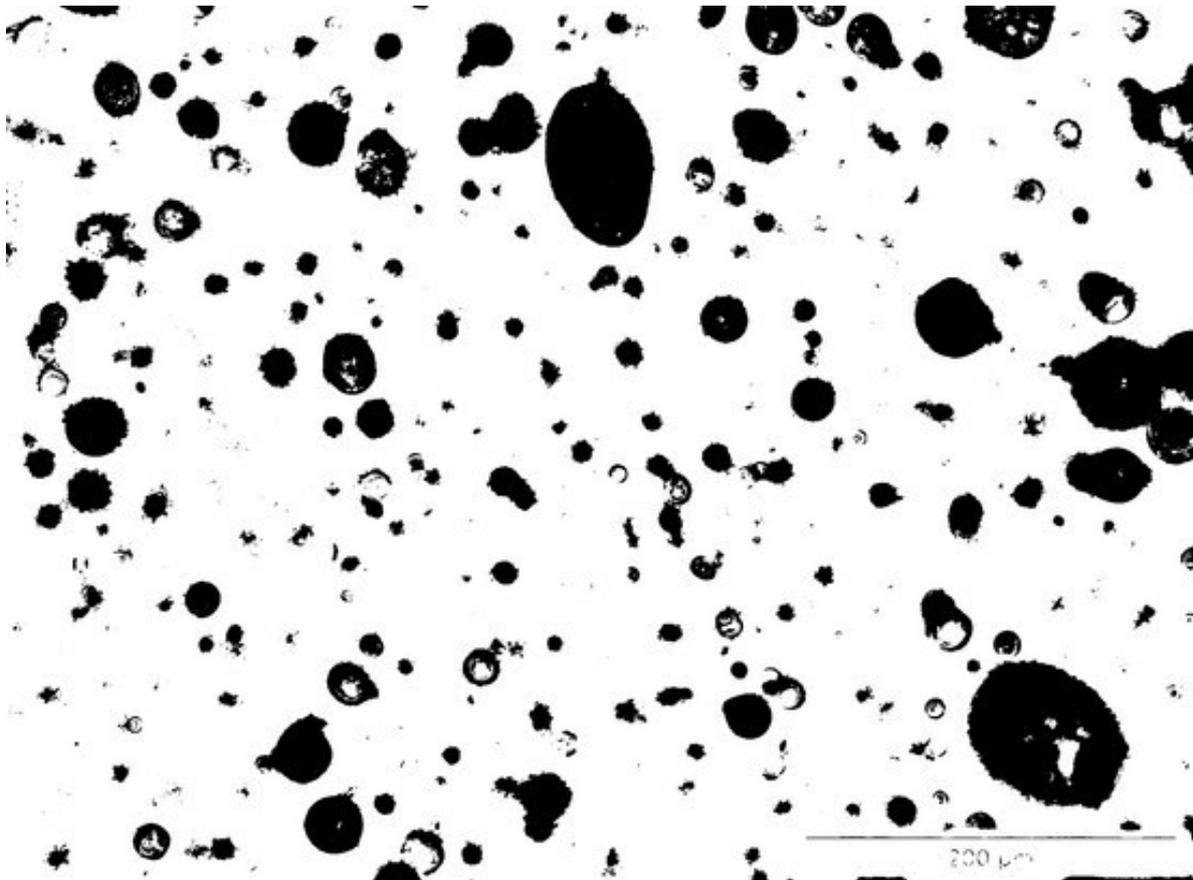


Abbildung 34: Prozessierte Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45)

Aus den genannten Gründen müssen die Bilder vor der automatisierten Partikelzählung in mehreren Schritten modifiziert werden. Diese Bearbeitungen der Aufnahmen wurde mittels Bildverarbeitungssoftware Fiji (ImageJ) [43], [44] durchgeführt.

Zuerst wurde der Kontrast des Bildes verstärkt (*Process* → *Enhance contrast* → *Saturated pixels 0,3 %*) um die Struktur der dispersen Phase besser hervorzuheben. Anschließend erfolgte ein Ausgleich des Bildhintergrund per Homogenisierung, welcher durch den Hohl-schliffobjekttträger und die Lichtablenkung verzerrt sein kann. Dafür wurde zunächst der „Rolling-Ball“-Algorithmus benutzt (*Process* → *Subtract background* → *Rolling ball radius 50 pixel*). Da die zu messenden Strukturen sehr variabel hinsichtlich ihrer Größe sind, wurde ein Wert von 50 Pixel festgesetzt. Dies entspricht gemäß Bildauflösung etwa 15 µm.

Im nächsten Schritt wurde das Bild in seine Farben-Bestandteile zerlegt und damit Graustufenbilder für jedes der 3 Spektren im HSB-Farbraum erzeugt. HSB ist eine Alternative zur RGB-Farbskala und steht für Hue (Farbton), Saturation (Sättigung) und Brightness (Helligkeit). Dieser Farbraum ist für die angestrebte Bildanalyse am besten geeignet, da auf diese Weise in der entsprechenden Dunkelfeldaufnahme ein maximaler Helligkeitskontrast am Tröpfchenrand besteht. Dieser Kontrast ist weit höher als er mit Färbe- oder Fluoreszenzverfahren erreichbar wäre. Dementsprechend wurde das Bild des Helligkeitskanal der Aufnahme für die weitere Bearbeitung und Auswertung gewählt (*Image* → *Type* → *HSB-Stack* → *Slice*).

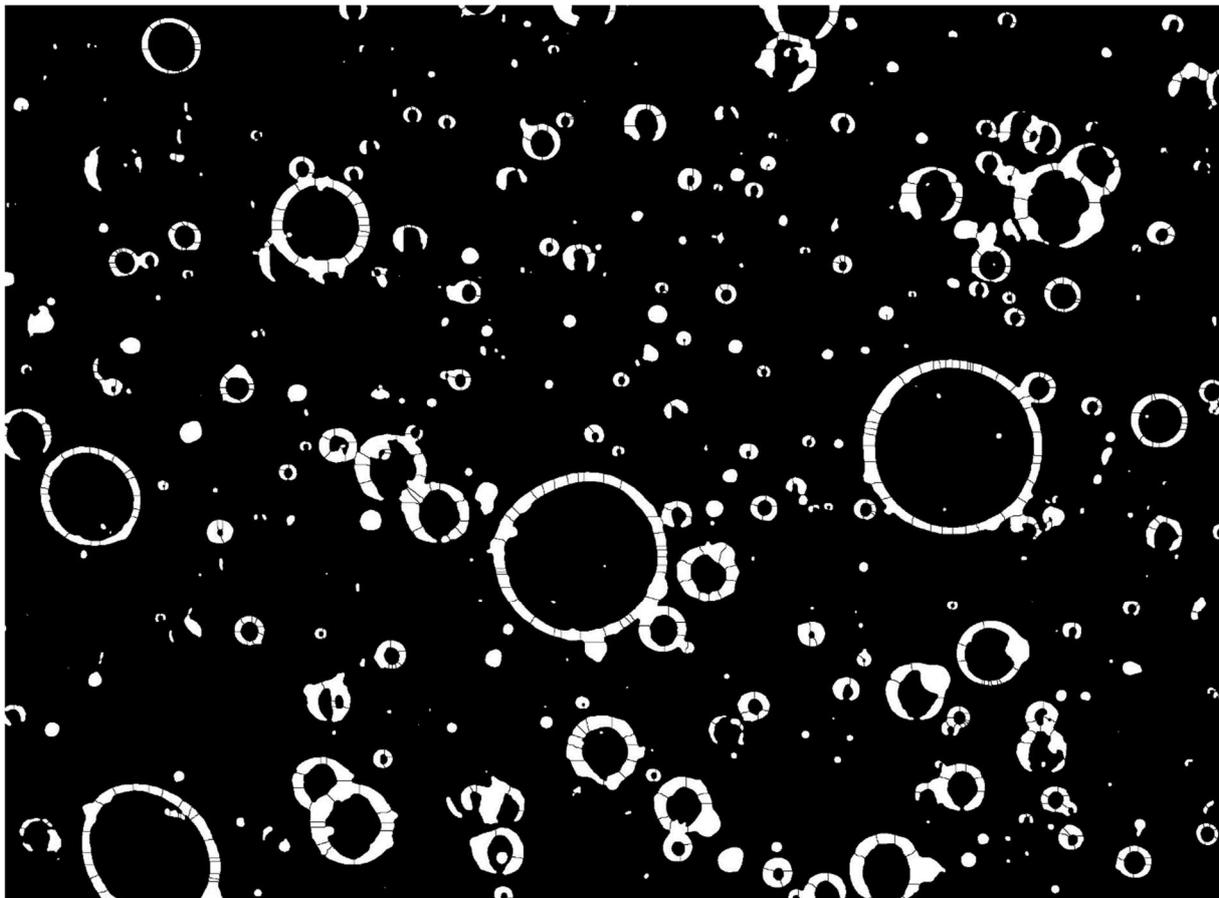


Abbildung 35: *Prozessierte Dunkelfeldmikroskopische Aufnahme einer mit Sudanrot angefärbten O-W-Emulsion (MCT-LIPOID S 45) auf einem Hohl-schliffobjekttträger (der Maßstab ist nicht eingezeichnet, um Fehler bei der automatisierten Erkennung der Strukturen zu vermeiden)*

Nachdem die Aufnahme maximal kontrastiert wurde, musste eine Umwandlung in ein binäres schwarz-weiß Bild für die automatisierte Auszählung erfolgen. Dies geschah über das willkürliche Setzen eines Schwellenwertes für das entsprechende Graustufenbild. Da ImageJ keine Automatisierung dieses Schrittes vorsieht bzw. der Wert stark abhängig von der verwendeten Bildquelle und Nachbearbeitung ist. Als am besten geeigneter Schwellenwert hat sich für alle Aufnahmen 65 erwiesen. Dabei steht 65 für den Grauwert des Bildes bei 8-Bit (von 0 bis 255 entsprechend der Anzahl der möglichen 2^8 Zustände von 8 Bits). Die Binärisierung in as Schwarz-Weiß-Bild erfolgte abschließend (*Image* → *Adjust* → *Threshold* → *0-65* → *Default*) → *Black & White*).

Die anschließende Zählung und Klassifizierung der kontrastierten Strukturen (Abbildung 35) erfolgte über das softwareinterne Plug-in zur Partikelanalyse. Dabei wurde die minimale Größe der zu detektierenden Tröpfchen auf 2 μm festgesetzt, um sowohl der maximalen Auflösung des Lichtmikroskops Rechnung zu tragen als auch um mögliche noch vorhandene Artefakte ausnahmslos geringere Größe von einer Erfassung auszuschließen (*Analyze* → *Analyze Particles* → *Size 2 - Infinity*). Die Datenausgabe erfolgte als CSV-Datei .

3.7 Statistische Auswertung der Tröpfchengrößenverteilung

Die Anzahl und Größe (Feret-Durchmesser) der Partikel wurde mit Hilfe von Excel und R statistisch bewertet. In Abhängigkeit der Tröpfchengröße wurde die Abundanz ermittelt und in Form von Histogrammen dargestellt. Dabei wurden die ermittelten Tröpfchengrößen in Größenklassen alle 5 bzw. 10 μm eingeteilt. Diese Einteilung war für einen statistischen Vergleich der Tröpfchengrößen besser geeignet als eine kontinuierliche Größenverteilung.

Zunächst wurde untersucht, wie valide bzw. konform die automatisierte Messung und Zählung im Vergleich zur individuellen Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen ist. Dafür wurden drei unabhängige Bilder einer LIPOID S 75 O-W-Emulsion per Dunkelfeld-Mikroskopie an verschiedenen geeigneten Bereichen des Hohlschliffobjektträgers erstellt. Diese wurden anschließend per Makro der entwickelten Methodik analysiert und die Parameter maximaler und minimaler Partikeldurchmesser mit den Ergebnissen einer individuellen Auszählung verglichen (Abbildung 36). Bei plausibel anzunehmender minimaler Änderung der Partikel während der Präparation ist von gleichmäßigen runden Formen auszugehen, welche nur minimale Unterschiede in den beiden beschriebenen Durchmessern zeigen sollten. Dies wird durch die geringen Unterschiede zwischen Minimum und Maximum bestätigt. Die Ausweisung einer Größenamplitude dient außerdem einer objektiveren Bewertung gewisser Unschärfen der subjektiven individuellen Auswertung

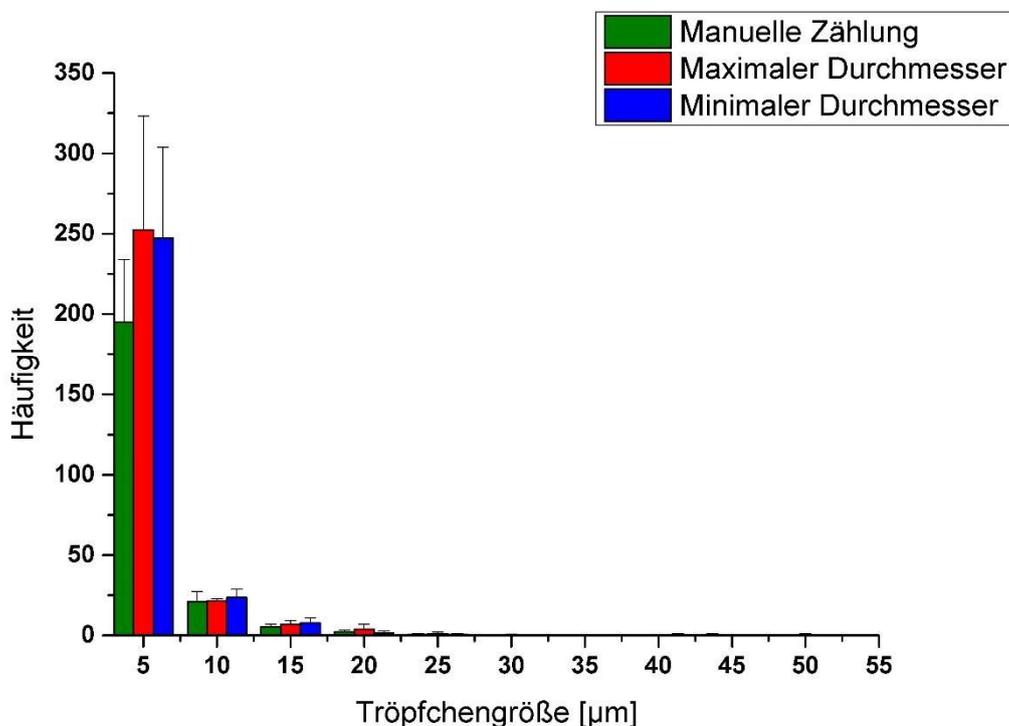


Abbildung 36: Methodenvergleich individuelle und automatisierte Auswertung von Emulsionen (Kumuliertes Histogramm aus 3 Aufnahmen)

Tabelle 16: Vergleich der Häufigkeiten der evaluierten Tröpfchengröße (n= 3 Einzelaufnahmen)

Tröpfchen Größenklasse [µm]	Individuelle Zählung	SD	Maximaler Durchmesser	SD	Minimaler Durchmesser	SD
0 - 5	195	39	252,3	70,9	247,3	56,5
5 - 10	21	6,6	21,3	1,5	23,7	5,1
10 - 15	5,3	1,5	6,7	2,5	7,7	3,1
15 - 20	2,3	1,2	4	3	1,7	1,2
20 - 25	0,7	0,6	1	1	0,7	0,6
25 - 30	0	0	0,3	0,6	0	0
30 - 35	0	0	0	0	0	0
35 - 40	0	0	0	0	0,5	0,7
40 - 45	0,5	0,7	0	0	0	0
45 - 50	0	0	0,5	0,7	0	0

Wie aus Tabelle 16 ersichtlich, sind die Unterschiede zwischen der individuellen Auszählung und der automatisierten Methode mit Ausnahme der kleinsten Kategorie gering. Der erhebliche Unterschied bei dieser Kategorie mit den weitaus höchsten Abundanzen lässt sich durch menschliche Defizite hinsichtlich Ermüdung des Auges und genereller Konzentration erklären, aber zu einem gewissen Grad auch durch die prinzipiell verlässlichere Erkennung von Artefakten bei individueller Bewertung. Bei Berechnung der durchschnittlichen Tröpfchengröße als Summe der jeweiligen Anzahl an Tröpfchen pro bestimmten Durchmesser durch die Anzahl aller Tröpfchen, liegt der Wert für die individuelle Auszählung zwischen den beiden automatisiert ermittelten Werten. Aufgrund der Auswertung in Größenklassen wurde sich gegen den Sauter-Durchmesser als bekanntesten Vertreter der Kenngrößen in der Partikelgrößenverteilung entschieden.

$$d = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{n} \quad (9)$$

Dabei sind:

\bar{d} = Durchschnittlicher Durchmesser

n_i = Anzahl der Tröpfchen in der jeweiligen Größenklasse i

d_i = Durchmesser der jeweiligen Größenklasse i

n = Anzahl aller Tröpfchen

Zur Beurteilung der Stabilität von Emulsionen sind im Besonderen die Größenklassen oberhalb der untersten relevant, da man eine Zunahme der Abundanz der entsprechenden Tröpfchengrößen statistisch zu erfassen und zu bewerten hat. Die Größenklassen wurden dafür folgend willkürlich in dekadischen Intervallen von 2 bis 200 μm festgelegt. Das untere Ende dieser Skale wird durch das optische Auflösungsvermögen und die Untergrenze zur Detektion der Software von 2 μm , das obere Ende durch die Größe des Gesamtbildes. Für den methodenvergleich wurden die gewählten Kategorien noch feiner granuliert (5 statt 10 μm) um eventuelle Unterschiede besser erkennen zu können und das obere Ende der Skala auf 50 μm beschränkt, was der normalen Spanne an Tröpfchengröße nach Präparation entspricht [45].

Da ein bedeutsamer Unterschied im Ergebnis zwischen den Methoden nur in der untersten Kategorie (2 bis 10 μm) vorkommt, und diese für die Qualitätseinschätzung die geringste Bedeutung hat, lässt sich schlussfolgern, dass die entwickelte automatisierte Methode in Bezug auf Genauigkeit und Präzision den Ansprüchen hinreichend genügt.

Ein weiteres Ergebnis der Methodenevaluierung ist, dass die Präparation tatsächlich nur zu einer minimalen und damit vernachlässigbaren Änderung der Tröpfchenform führt. Minimaler und maximaler Durchmesser erwiesen sich als nahezu identisch. Damit kann die Struktur der dispersen Phase als unmodifizierter und damit (fast) idealer Kreis eingestuft werden. Für die weitere Auswertung wurde der maximale Feret-Durchmesser als maßgebliches Größenkriterium gewählt, um damit eventuelle Instabilitäten der Emulsion (Vergrößerung der Tröpfchendurchmesser über die Zeit) sicher erkennen zu können.

Aufgrund der komplexen Statistik und Präparation samt mikroskopischer Aufnahme wurde im Weiteren ein Stapel von Bildern ($n=3$) verwendet, um eine kumulierte Häufigkeit der Tröpfchengröße zu erzeugen. Alle analysierten Emulsionen zeigten nicht normale verteilte Werte der Tröpfchengröße. Die Verteilung ähnelt einer logarithmischen Verteilung, wie sie bereits für Emulsionen beschrieben wurde [46], [47]. Allerdings sind die erzielten eigenen Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Gründe dürften die willkürlich gewählten Partikelgrößenklassen und die technisch bedingten Grenze für einen Partikeldurchmesser von 2 μm (Kapitel 3.6).

Um zu untersuchen, ob die Gesamtheit der Größenklassenverteilung der Emulsionen aus Populationen mit dem gleichen Verteilungsmuster entstammt, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Ergebnis ist, dass alle drei verglichenen Histogramme mit 95 % Wahrscheinlichkeit ihren Ursprung in der gleichen Grundgesamtheit an Tröpfchengrößenverteilungen ($p\text{-Wert} < 0.01$) haben.

Um zu prüfen, ob das gewählte statistische Setup tatsächlich in der Lage ist, Unterschiede beim Vergleich mehrerer Emulsionen korrekt zu beschreiben, wurden Emulsionen mit bekannten signifikanten Unterschieden gewählt, welche sich auch in den entsprechenden Ergebnisse der statistischen Auswertung wiederfinden sollten. Verglichen wurden diesbezüglich

die bewährte Herstellung von Emulsionen per Ultra-Turrax®, Fanta-Schale und Blatt-Rührer. Die gewählten Herstellungsarten unterscheiden sich vorrangig in der Menge an Energieeintrag in das System. Da die Tröpfchengröße der Emulsion direkt mit der eingesetzten Energie zur Erzeugung des Systems korreliert, sollte sich dies in den Histogrammen der automatisierten Methode widerspiegeln [37], [48]

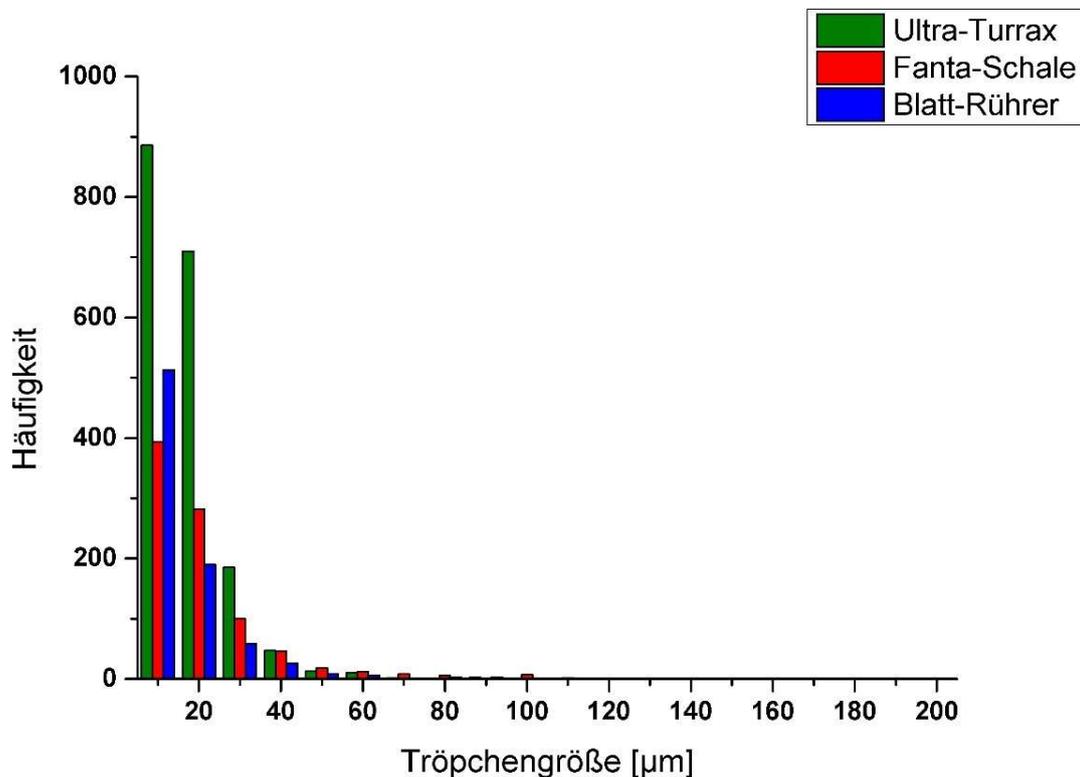


Abbildung 37: Vergleich der kumulierten Tröpfchengrößen für 3 verschiedene Herstellungsarten ($n=3$)

In Abbildung 37 ist das Histogramm für die drei verwendeten Herstellungsarten einer identischen Emulsion, also mit gleichen Bestandteilen und Konzentrationsverhältnissen dargestellt. Wie in Kapitel 5 beschrieben, war die Zeit für die Herstellung der Emulsion in allen drei Fällen gleich. Klar ersichtlich ist die deutlich höhere Anzahl an detektierten dispersen Partikeln in den unteren Größenklassen bis 30 µm bei Herstellung mit dem Ultra-Turrax®. Beim Vergleich der Blatt-Rührer-Herstellung mit der manuellen Herstellung in der Fanta-Schale zeigt sich vor allem eine diametrale Verteilung der Häufigkeit in den beiden untersten Größenkategorien (bis 10 µm und bis 20 µm). Auch dieser Unterschied ist nicht signifikant über alle Größenklassen und lässt aber auf einen etwas höheren Energieeintrag durch den Blatt-Rührer schließen. Damit konnte gezeigt werden, dass ein Vergleich zwischen verschiedenen Emulsionen per automatisierter Auswertung und statistischer Analyse von mikroskopischen Aufnahmen aussagekräftig ist.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden 3 PLs mit möglichst unterschiedlichen, gemäß Kapitel 3.3 bestimmten HLB-Werten ausgewählt, um eine mögliche Korrelation

zwischen HLB-Wert und Tröpfchengröße zu untersuchen. Um zu diesem Zwecke eine O/W-Emulsion zu erzeugen, die vergleichbar den industriell genutzten Emulsionen ist, wurde 20% (w/w) MCT als häufig verwendete Ölphase mit einem erforderlichen HLB-Wert von 11 gewählt. Um die physikalische Stabilität dieser Emulsionen zu testen, wurde die Öltröpfchenverteilung in der wässrigen Phase analysiert.

Abbildung 38 zeigt das Histogramm von drei O/W-Emulsionen, die mit unterschiedlichen, industrieüblichen PLs hergestellt wurden deren gemessene HLB-Werte die größten Unterschiede aufwiesen (Kap. 3.3). Es waren LIPOID S 45 (HLB-Werte zwischen 8,9 und 11,3), LIPOID E (HLB-Werte zwischen 8,3 und 8,9) und LIPOID P 100 (HLB-Werte zwischen 7,1 und 10,0). Dabei zeigten sich bei allen drei Emulsionen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Tröpfchengröße und deren Häufigkeit ($p < 0,05$).

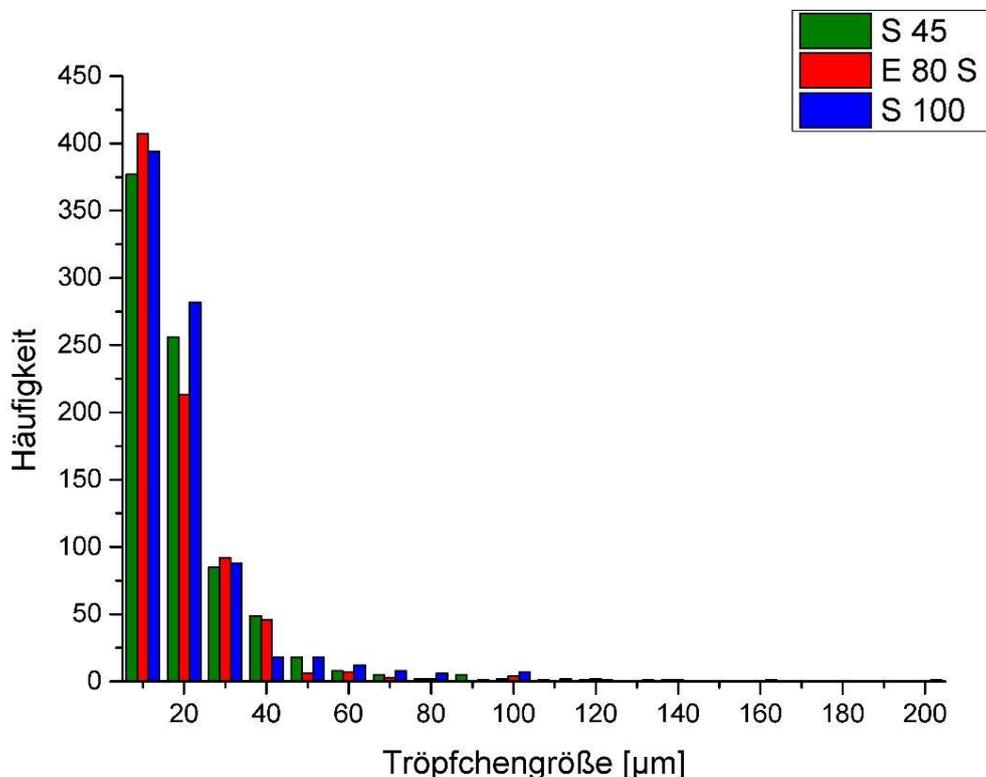


Abbildung 38: Vergleich der kumulierten Tröpfchengröße für LIPOID S 45, LIPOID E und LIPOID P 100 ($n=3$)

Die O/W-Emulsionen wurden bei Raumtemperatur gelagert, und die Tröpfchengrößenanalyse wurde nach einem und zwei Monaten Lagerung bei Raumtemperatur wiederholt. Nach einem Monat Lagerung (detaillierte Ergebnisse nicht gezeigt) war keine statistisch signifikante Differenzierung zwischen den drei Emulsionen auf PL-Basis nachweisbar ($p < 0,05$). Abbildung 39 zeigt die wiederholte Analyse nach zweimonatiger Lagerung, bei der alle Emulsionstypen noch immer Teil derselben Population sind. Die geringfügigen Unterschiede in der Häufigkeit bei kleineren Tröpfchengrößen ($< 30 \mu\text{m}$) sind bereits bei dem Vergleich der automatisierten

mit der individuellen Auszählung erläutert worden. Bei größeren Tröpfchen wird der beobachtete geringfügige Unterschied der statistischen Zufälligkeit im ausgewählten Ausschnitt der Emulsion zugeschrieben.

Wie in Kapitel 3.4 dargestellt, zeigten die untersuchten PLs Unterschiede in ihrer Packungsdichte an der Grenzfläche, gekennzeichnet durch die Fläche pro Molekül. Durch Modifizierung der wässrigen Phase auf der nicht komplett aufgereinigte PLs wie LIPOID S 45 eingebracht wurden (Reinstwasser gegen elektrolythaltige Lösung) vergrößerte sich die benötigte Fläche pro Molekül. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei PLs mit geringerem Anteil an PC und damit mit höherem Anteil an geladenen Substanzen im komplexen Gemisch. Um zu untersuchen, ob sich daraus Aussagen über die Stabilität einer Emulsion mit natürlichen PLs als Emulgator ableiten lassen, wurden Emulsionen mit Reinstwasser sowie 150 mmol NaCl-Lösung als hydrophile Phase in der Fanta-Schale hergestellt.

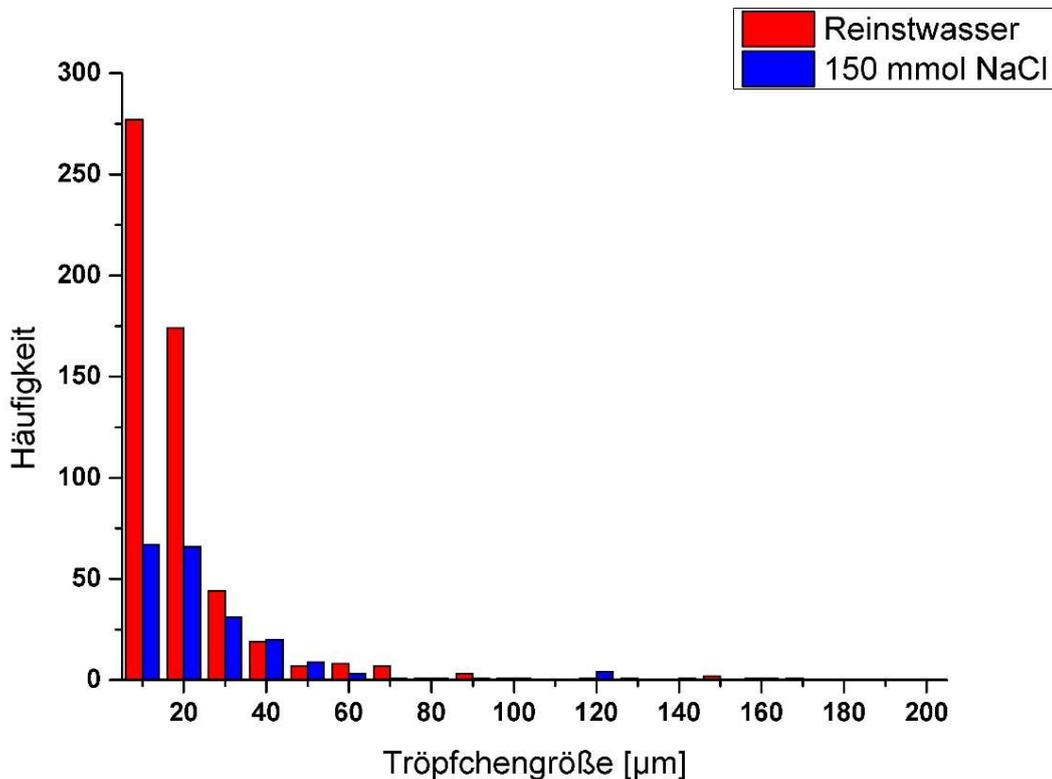


Abbildung 39: Vergleich der kumulierten Tröpfchengrößen für Reinstwasser und 150 mM NaCl-Lsg.

Abbildung 39 zeigt das Histogramm beider Emulsionen im direkten Vergleich. Auffällig ist der deutlich geringere Anteil von dispersen Tröpfchen im Größenbereich bis 20 μm bei Verwendung von elektrolythaltiger wässriger Lösung. Ab der Größenklasse bis 30 μm hingegen sind die Tröpfchengrößen ähnlich verteilt. Als Ursache für die unterschiedlichen Tröpfchengrößen kann die ungünstige Krümmung bei kleineren Radien in der Elektrolythaltigen Emulsion angenommen werden. Ebenso führt die Anwesenheit von NaCl in der äußeren

Phase zu einer anderen Ausrichtung der Kopfgruppen an der an der Grenzflächenmembran. Möglich ist in diesem Zusammenhang auch eine Änderung der Makroeigenschaften der Emulsion (Aufrahmen oder ähnliches), welche zu veränderten Bedingungen bei der Präparation führte.

Aus der weiter oben beschriebenen Tröpfchengrößenverteilung lässt sich schlussfolgern, dass in elektrolythaltigen wässrigen Phasen emulgierte Öltröpfchen weniger stabil sind bei der Verwendung von natürlichen PLs als Emulgatoren. Kleinere durchschnittliche Partikeldurchmesser kennzeichnen stabileren Emulsionen [49], [50]. Aufgrund des geringeren Anteil an kleinen Tröpfchen steigt die durchschnittliche Partikelgröße für Emulsionen mit elektrolythaltiger wässriger Phase zwangsläufig.

Es lässt sich abschließend herausstellen, dass die die Erkenntnisse der physiko-chemischen Untersuchung der natürlichen PLs (Kapitel 3.4), für deren Anwendbarkeit in der Praxis unmittelbare Bedeutung haben.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung physikalisch-chemischer Eigenschaften der Phospholipide durch HLB-Werte

Durch einen modifizierten Zentrifugationsassay in Anlehnung an Robbers & Bahia [19] wurde der HLB-Wert von vierzehn PLs mit unterschiedlichem Reinheitsgrad aus verschiedenen natürlichen Quellen bestimmt. Dabei wurden mehrere Auffälligkeiten im Vergleich zur Originalmethode und zur bekannten Anwendung des HLB-Wertes im Allgemeinen festgestellt. Zum einen unterscheiden sich die ermittelten HLB-Werte erheblich in Abhängigkeit von der verwendeten lipophilen Phase (z.B. für LIPOID S 75 7,7 und 11,2 und zum anderen sind in den ermittelten Phasenseparationskurven nur schwer charakteristische Minima auszumachen.

Mögliche Ursachen für die relativ großen Unterschiede der ermittelten HLB-Werte werden in den Eigenschaften der verschiedenen benutzten Öle gesehen, die unterschiedliche Affinitäten zu den natürlichen PLs aufweisen. Einer der Gründe sind die verschiedenen Kopfgruppen und Substanzen im PL-Gemisch und die dadurch möglichen Interaktionen an den Grenzflächen, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Daher kann sich bei jedem Öl und der damit verbundenen Änderung des eHLB-Wertes zusätzlich auch ein anderes ideales Mischungsverhältnis des Emulgators einstellen und damit auch ein verändertes Phasentrennlinienminimum ergeben, welches zur Auswertung genutzt wird. Außerdem existieren experimentell bedingte Einschränkungen in den abbildbaren Emulsionsreihen, da beispielsweise Mischungsverhältnisse der produzierten Stammemulsionen von 1:9 bzw. 2:8 bei IPP keine Emulsionen ausreichender Stabilität ergaben und folglich nur ein geringerer HLB-Bereich abgedeckt werden konnte. Innerhalb dieses Bereichs konnte die Untersuchung allerdings in kleineren Intervallen vorgenommen werden im Vergleich zu den Ölen ISIS und AB und so Mischungsverhältnisse in Schritten von 0,2 zubereitet werden (z.B. 4,2 : 5,8;). Experimentell bedingt ist weiterhin nur eine diskrete (nicht kontinuierliche) Analyse des abzudeckenden HLB-Bereichs, da zwischen den verwendeten Mischungsverhältnissen keine Analyse des resultierenden HLB-Wertes möglich ist.

Zur genaueren Einordnung der erhaltenen Werte wurde der Assay in drei verschiedenen lipophilen Phasen mit unterschiedlichem erforderlichen HLB-Wert durchgeführt. Zwar lagen alle aufgezeichneten Werte innerhalb des erwarteten Bereichs, jedoch ergaben sich deutliche Abweichungen von Werten in der Literatur. Der ermittelte HLB-Wert hing sehr stark von dem erforderlichen HLB-Wert der lipophilen Phase ab, die zur Herstellung der Test-Emulsion verwendet wurde. Höhere erforderliche HLB-Werte der verwendeten Öle führten zu höheren HLB-Werten der PLs, was auf einen systematischen Fehler hindeutet. Die vom Verfasser durchgeführte Verifizierung der Methode gemäß der Originalliteratur und -werte lässt allerdings nicht auf einen Fehler im Versuchsaufbau selbst schließen.

Als weiteren Unterschied gegenüber der Originalmethode bzw. weiteren in der Literatur beschriebenen Methoden lassen sich über einen weiten Bereich von berechneten HLB-Werten nur geringe Abweichungen in den Phasentrennungskurven der untersuchten natürlichen PLs feststellen. Es wurde beobachtet, dass die Varianz der Messwerte in den ermittelten Phasenseparationen mit höherem Reinheitsgrad der PLs zunahm. Dies ist wahrscheinlich auf die speziellen Eigenschaften der pflanzlichen PLs und die Präsenz von zusätzlichen Substanzen in den PLs zurückzuführen, die als Co-Emulgator in der Emulsion fungieren. Es ist festzustellen, dass sich die chemisch-physikalischen Verhältnisse an der Grenzfläche zwischen Wasser- und Ölphase während der Versuche von denen einer praktischen Anwendung der Emulgatoren unterscheiden, da mindestens zwei Emulgatoren zur Bestimmung der HLB-Werte verwendet werden. Die Analyse der gesamten Phasentrennkurve (siehe Kapitel 3.3) beweist jedoch, dass stabile O/W-Emulsionen mit natürlichen PLs über einen größeren Bereich hergestellt werden können, als es der HLB-Wert suggeriert.

Im Gegensatz zu den natürlichen PLs zeigten strukturell einheitlichere, synthetische Emulgatoren wie SPAN® 20 oder TWEEN® 80 ein deutliches Minimum in der Phasentrennkurve, die zur Bestimmung ihres HLB-Wertes verwendet wurde. Da der HLB-Wert ursprünglich für ethoxylierte Emulgatoren (wie SPAN® und TWEEN®) entwickelt und definiert wurde (und auch auf einige ionische Emulgatoren ausgedehnt wurde) [11], [12], ist es nicht inhärent, dass alle Emulgatorklassen, insbesondere Emulgatormischungen, durch ihn korrekt charakterisiert werden können. Ethoxylierte Emulgatoren sind aufgrund ihrer Herstellung keine Reinsubstanzen. Im Vergleich dazu ist die Heterogenität der Zusammensetzung der natürlichen PLs jedoch weit höher und sie können somit über ein breites Spektrum an verwendeten lipophilen Phasen Emulsion stabilisieren.

Ebenso weisen die Unterschiede zwischen den bekannten ethoxylierten Sorbaten und den hier untersuchten PLs auf einen großen Einfluss der ionischen Kopfgruppe auf die Interaktionen an der Grenzfläche bzw. auf die Ausbildung von stabilisierenden Membranen hin. Dabei sind die Eigenschaften von nichtionischen Emulgatoren weniger komplex in der Hinsicht, dass sie weniger Einflüssen unterliegen. Dies wurde bereits von Davies im Jahre 1954 durch die Erweiterung der Anwendbarkeit auf ionische Emulgatoren berücksichtigt. Damit verbunden war auch eine Änderung der Berechnung des HLB-Wertes (vergl. Kapitel 2.2, Gleichung 2 und 3). Die dabei den funktionellen Gruppen zugeordneten Faktoren wurden und werden bis zum heutigen Zeitpunkt noch stetig erweitert. Trotz allem sind die Möglichkeiten einer nahezu vollständigen HLB-Bestimmung aller funktioneller Gruppen sowohl durch deren strukturelle Vielfalt als auch durch deren Interaktionspotential begrenzt [51]. Ein weiterer Schritt zur Berücksichtigung anderer Einflussfaktoren auf den HLB-Wert war die Einführung des eHLB Wertes für die verwendete lipophile Phase. [12] Damit wurde versucht, den Einfluss

der verwendeten lipophilen Phase auf das System darzustellen, jedoch können die Interaktionen zwischen Emulgator und lipophiler Phase dadurch nur unzureichend abgebildet werden.

Einer jener Faktoren, die vom HLB-Wert außer Acht gelassen werden, ist die Temperatur des Systems. Ihr Einfluss ist hinlänglich bekannt. Durch Erhöhung der Temperatur kommt es beim Einsatz von nichtionischen Tensiden in einer Emulsion zu einer Phasenumkehr ab einem bestimmten Punkt. Dabei schlägt z.B. eine W/O-Emulsion in eine O/W-Emulsion um und die Emulsion verliert dabei ihren lipophilen Charakter. Diese Temperatur wird Phaseninversionstemperatur genannt (PIT) und ist ein wichtiger Parameter in der Emulsionstheorie. Einerseits kann die entstehende Phaseninversion für die Herstellung der Emulsion genutzt werden, andererseits wird das Phänomen z.B. für die Ermittlung des HLB-Wertes per Cloud-Point-Bestimmung (Trübungspunkt-Bestimmung) genutzt. Dabei wird diejenige Temperatur identifiziert, bei der durch die Änderung der Affinität des Emulgators eine vorher durchsichtige Emulsion sich zu trüben beginnt [52].

Auch der Einfluss der Elektrolytkonzentration auf ein disperses System ist bereits hinlänglich bekannt, wie im theoretischen Hintergrund zum Zeta-Potential (Kapitel 2.3) bereits erörtert. Die Möglichkeit der Einstellung der Stabilität von Dispersionen durch Verschiebung der wechselwirkenden Kräfte mittels Elektrolytzugabe wird beispielweise bei Suspensionen bereits seit langer Zeit genutzt. Gerade für die PLs ist auch der pH-Wert der wässrigen Phase von besonderem Interesse im Hinblick auf die elektrostatischen Wechselwirkungen [53].

Bei HLB soll es dem Namen nach um das Gleichgewicht zwischen Hydrophilie und Lipophile gehen, jedoch ist es ein Wert, der dem Tensid und nicht dem gesamten System zugeordnet wird. Ein Gleichgewicht des Tensids ist nicht existent. Diese offensichtliche Schwäche des Konzeptes lässt sich nur schwerlich durch Modifikationen der Gleichung ändern. Ein gegebenes Tensid kann abhängig von verschiedenen Faktoren (verwendeter lipophiler Phase, Temperatur, Elektrolytgehalt, Wasser-Öl-Verhältnis,) nahezu jede Art von Emulsion bilden. Die Möglichkeit der Stabilisierung einer dispergierten Phase in einer kontinuierlichen Phase ist also die Eigenschaft eines Systems und nicht die eines Tensids.

Gerade weil der HLB-Wert meist leicht zu bewerten ist, besteht die Notwendigkeit, Nachteile experimentell ermittelter HLB-Werte und -Bereiche für natürliche Mischungen von Emulgatoren auf pflanzlicher Basis, wie der PLs, zu sensibilisieren. Leider gibt es nur wenige andere Methoden zur Charakterisierung von Tensiden und insbesondere von Tensidmischungen. Keine von ihnen wird derzeit in Praxis und Wissenschaft umfassend eingesetzt. Daher sei die Verwendung von breiteren HLB-Bereichen für natürliche PLs und anderer, komplexerer Emulgatorsysteme dringend empfohlen. Die Angabe eines präzisen Wertes oder eines sehr engen Bereichs, wie in der Literatur oft geschehen, widerspricht der Realität und erzeugt falsche Annahmen.

Da für die meisten analysierten natürlichen PLs kein signifikantes Minimum an Phasentrennung identifiziert werden konnte, zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass die getesteten PLs keinen singulären HLB-Wert aufweisen, sondern als Emulgatoren mit einem breiten HLB-Bereich beschrieben werden sollten. Die zur Bestimmung des HLB-Wertes verwendeten Emulsionen waren über einen weiten Bereich der untersuchten Verhältnisse zwischen hydrophiler und lipophiler Phase vergleichsweise stabil. Daher muss korrekterweise die gesamte Phasentrennungskurve für die Beschreibung der HLB-Eigenschaften natürlicher PLs Berücksichtigung finden. Die Mehrheit der analysierten PLs zeigte eine minimale Phasentrennung, welche den erwarteten, in der Literatur beschriebenen Werten zwischen 7,5 und 10,5 entsprach. Dies unterstreicht die bevorzugte Verwendung der meisten dieser PLs als Emulgatoren zur Herstellung von O/W-Emulsionen.

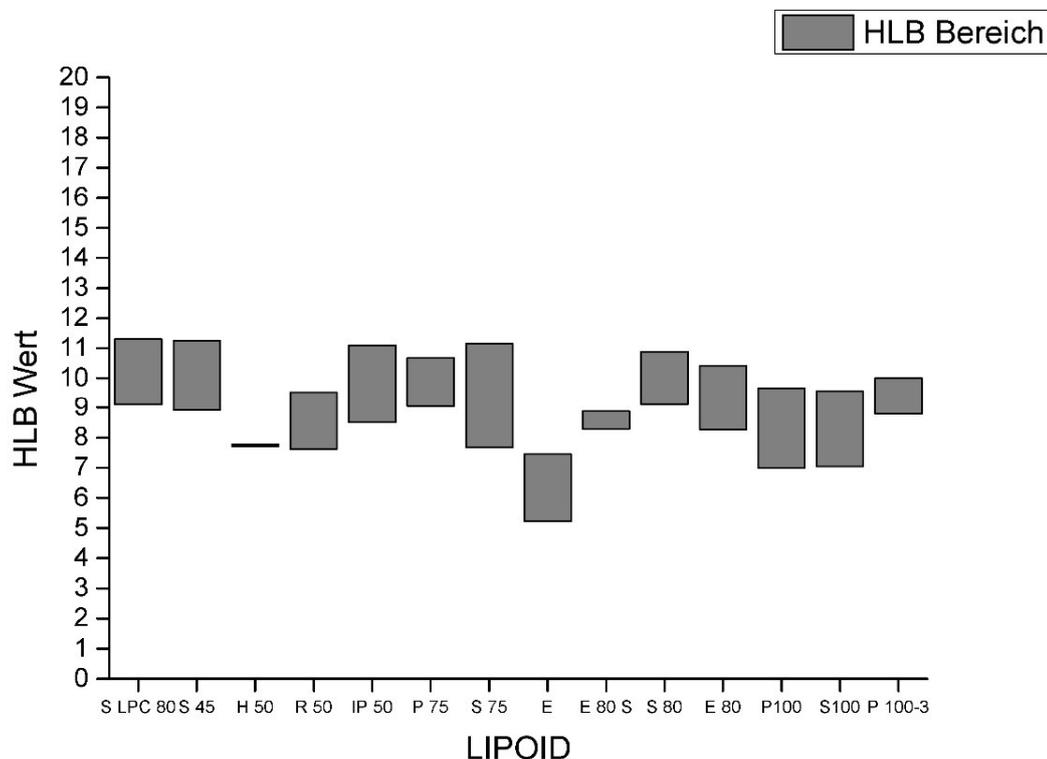


Abbildung 40: HLB-Bereiche der untersuchten PLs

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der HLB-Bestimmung an den untersuchten PLs zusammengefasst und in die vorher beschriebenen Bereiche eingeteilt. Auffällig sind dabei die unterschiedlichen Amplituden. Diese können ebenso wie die einzelnen HLB-Werte (siehe Kapitel 3.3) nicht verlässlich mit der jeweiligen chemischen Zusammensetzung der PLs korreliert werden. Dieser Befund resultiert aus der bereits besprochenen Unschärfe des HLB-Wertes im Allgemeinen. Augenfällig sind im Besonderen die HLB-Bereiche dreier PLs: LIPOID P 100-3 besitzt nur einen engen HLB-Bereich, was auf die weitgehend homogene Zusammensetzung

zurückgeführt wird. P 100-3 weist somit weniger Substanzen auf, die als Co-Emulgatoren fungieren können. Auf LIPOID H 50 und LIPOID E 80 S trifft diese Erklärung für ihre geringen HLB-Bereiche hingegen nicht zu. Als mögliche Ursachen können hier sowohl die methodisch bedingte Varianz als auch sich möglicherweise kompensierende oder synergistische Effekte der enthaltenen Substanzen im komplexen Gemisch herangezogen werden.

Die hier dargestellten Bereiche ergeben sich aus der experimentellen Bestimmung der HLB-Werte mit nur 3 verschiedenen lipophilen Phasen. Es ist daher anzunehmen, dass bei Durchführung zusätzlicher Experimente mit anderen Ölphasen die Bereiche noch erweitert werden können. Dabei könnten auch die angesprochenen LIPOIDE H 50 und E 80 S unter Umständen einen größeren HLB-Bereich abdecken. Für weiterführende Studien ist nicht nur der Einsatz eines größeren Spektrums lipophiler Phasen empfehlenswert, sondern auch die Erhöhung der Anzahl von Replikaten. Auf diese Weise können verlässlichere und statistisch besser abgesicherte Ergebnisse erzielt werden. Konkret erwähnt seien bessere Wichtungen durch Box-Plot-Diagramme. Daher ist die erläuterte Thematik als erster Versuch der Darstellung des komplexen Sachverhaltes von HLB-Werten und HLB-Bereichen für natürliche PLs zu betrachten.

Da der HLB-Wert, wie oben dargelegt, nur begrenzt für komplexere Emulgatoren und Mischungen verwendet werden kann, ergibt sich die Notwendigkeit für alternative Konzepte. Neben den vorgestellten HLB-Bereichen sind zwei bekannte Alternativen die Konzepte des HLD-Wertes (Hydrophilic-Lipophilic-Deviation) sowie des CPP-Wertes (Critical-Packaging-Parameter). Letztgenanntes wurde von Isrealachvili 1976 [54] als ein Parameter erfunden, der Vorhersagen über Strukturen ermöglicht, die von amphiphilen Molekülen gebildet werden. Die Gleichung leitet sich aus dem räumlichen Bedarf ab, den die polare Kopfgruppe im Verhältnis zum Volumen des lipophilen Schwanzes eines Moleküls einnimmt (siehe Gleichung 10).

$$CPP = \frac{V}{l_c \cdot A_0} \quad (10)$$

Dabei sind:

CPP = Kritischer Packungs Parameter

V = Volumen der Fettsäurereste

A₀ = Volumen der Kopfgruppe

l_c = Länge der Fettsäurereste

Dabei können nicht nur Eigenschaften flüssigkristalline Phasen prognostiziert werden, da die Dimension der Volumina auch die Krümmung der zusammengesetzten Tenside bestimmt. Die so abgeschätzte Krümmung der Moleküle zeigt ihre bevorzugte Eignung für O/W- oder W/O-Emulsionen [37], [54], [55]. Für die Kategorisierung der Vielzahl an möglichen Emulgatoren wären allerdings aufwendige Analysen zum Beispiel Neutronen- oder

Röntgenstreuung notwendig. Zugleich ist vermutlich auch eine Einzelbestimmung pro Emulgator(-gemisch) notwendig, da sich die Interaktionen und Anordnungen als zu komplex für prädiktive Modelle erweisen.

Das andere, weiter oben bereits erwähnte Konzept ist die Hydrophil-Lipophile Abweichung (HLD) [55]. Es ist weitaus komplexer, da es sowohl die Elektrolytkonzentration der wässrigen Phase als auch die Art des in der Emulsion verwendeten Öls beinhaltet (siehe Gleichung 11).

$$HLD = F(S) - k * EACN - \alpha(T - 25) + Cc \quad (11)$$

Dabei sind:

HLD = Hydrophile-Lipophile Abweichung

F(S) = Funktion der Salinität der wässrigen Phase

k = Tensidabhängiger Faktor

EACN = Effektive Alkane Kohlenstoffnummer

α = Tensidabhängiger Faktor

T = Temperatur

Cc = Charakteristische Krümmung

Die Salinitätsfunktion F(S) ist für ionische Tenside relevant, während die Temperatur (T) für ethoxylierte Tenside von größerer Bedeutung ist. Die effektive Alkan-Kohlenstoffzahl (EACN) ist ein Parameter, der das Maß der Lipophilie der verwendeten Phase kennzeichnet. Die charakteristische Krümmung (CC), sowie α und k sind Faktoren, die maßgebliche Eigenschaften des Tensids beschreiben [55]. Ein kalkulierter hoher HLD-Wert steht dabei für einen tendenziell lipophilen Emulgator.

Bei eingehender Betrachtung der vorgestellten Gleichung ist auffällig, dass viele Faktoren, die am HLB-Wert bemängelt wurden, hier berücksichtigt sind. Der Einfluss von Elektrolytkonzentrationen der wässrigen Phase auf die Packungsdichte an der Grenzfläche (vergl. Kapitel 3.4.3) und damit in Konsequenz auf die Stabilität der Emulsion (vergl. Kapitel 3.7) bei ionischen Tensiden ist durch die Einbeziehung der Salinität gebührend berücksichtigt. Dabei wird auch die Konzentration des ionischen Emulgators selbst mit eingerechnet, welcher ebenfalls Teil der wässrigen Phase wird. Ebenso wird der Einfluss der Temperatur auf die entstehende Emulsion betrachtet, welcher für ionische Tenside mit steigender Temperatur fällt. Dieses Verhalten wird der steigenden Löslichkeit von ionischen Verbindungen in Wasser zugeschrieben. Im umgekehrten Fall steigt der HLD-Wert mit steigender Temperatur für nichtionische (ethoxylierte) Tenside, da deren Löslichkeit mit steigender Temperatur abnimmt. Auch eine Variante des bereits vorgestellten CCP wird in die komplexe Berechnung einbezogen. Dabei ergibt sich aus charakteristischer Krümmung (CC) und effektiver Kettenlänge (EACN)

ein vergleichbarer Faktor. Dies geschieht unter der Annahme, dass die Krümmung durch das Verhältnis des Kopfgruppenvolumens zum Fettsäurevolumen beschrieben wird.

Der HLD-Wert repräsentiert also eine äußerst komplexe und auf diese Weise realitätsnahe Darstellung der Verhältnisse an der Grenzfläche zwischen unmischbaren Phasen. Für eine Anwendung in der Praxis ist er mutmaßlich zu kompliziert ermittelbar, um bei sämtlichen Fragestellungen zu Rate gezogen zu werden. Allerdings ist er mehr praktisch orientiert als mathematische Modelle, welche auf thermodynamischen Betrachtungen beruhen, wie z. Bsp. das Modell der überschüssigen Gibbs-Energie [56].

Jedoch ist er die Methode der Wahl für den besonderen Fall, wenn exakte Kenntnisse benötigt werden, für deren Gewinnung entsprechende zeitliche und finanzielle Ressourcen verfügbar sind. So ist der HLD-Wert prädestiniert für die Entwicklung einer optimalen Emulsion, wenn es z. B. darum geht, möglichst geringe Mengen von Emulgatoren zu verwenden um das hautirritierende Potential von halbfesten Formulierungen zu minimieren oder um möglichst stabile und damit qualitätskonstante Prozesse in der Industrie zu gewährleisten. Es wurden bereits Versuche beschrieben, dieses Methode auf pharmazeutische und kosmetische Emulsionszubereitungen zu übertragen [55], bislang aber ohne große Resonanz der Produzenten.

4.2 Physiko-chemische Untersuchungen

Durch Kombination von physiko-chemischen Analysemethoden (Zeta-Potential, SAXS, Langmuir-Isothermen) konnten weitere Einblicke in das Verhalten von natürlichen PLs bei der Bildung von Membranen in einer Phase und an Grenzflächen gewonnen werden.

Von Interesse sind hierbei insbesondere die verhältnismäßig großen Unterschiede zwischen den natürlichen PLs hinsichtlich ihres Zeta-Potential und dem Wiederholabstand der formierten Bilayer. Dabei unterscheidet sich das Zeta-Potential zwischen natürlichen PLs mit hohem Anteil an anionischen Inhaltsstoffen, wie LIPOID S 45, und reinem POPC bzw. DPPC um das 5 bzw. 14-fache (73,7 mV versus 13,7 bzw. 5,3 mV). Durch die elektrostatische Abstoßung unterscheidet sich die Dicke der Bilayer um das 1,3-fache (83,1 Å versus 64,0 bzw. 63,4 Å). Die unterschiedlichen Werte für die strukturell sehr ähnlichen PLs, DPPC und POPC, lassen sich dabei folgendermaßen erklären:

POPC ist ein synthetisches, einfach ungesättigtes PL mit einer PC-Kopfgruppe und einer gesättigten 16:0- und einer ungesättigten 18:1-Fettsäurekette mit zwei Estercarbonylen. DPPC weist dagegen zwei gesättigte 16:0 Fettsäureketten. Dies erklärt die viel höhere Hauptübergangstemperatur vom Gel zum flüssigkristallinen Phasenzustand von DPPC (41°C) im Vergleich zu POPC (-2°C). Daher liegt DPPC bei 20°C im Gelzustand in der L β -Phase (die Ketten sind in all-trans-Konformation, aber stark geneigt zur normalen Doppelschicht) vor. Im

Gegensatz dazu befindet sich POPC in der flüssigkristallinen $L\alpha$ -Phase (die Ketten sind flüssig mit einem hohen Gehalt an gauche-Konformeren) bei 20° C. Die ähnlichen d-Werte für die verschiedenen Phasen sind wahrscheinlich das Ergebnis unterschiedlicher Kettenorientierung, physikalischer Zustände und Hydratationsschichten zwischen den Lipid-Doppelschichten, die einander kompensieren. Die unterschiedlichen Phasenzustände von POPC und DPPC bei 20° C sind auch für die, von verschiedenen Autoren beobachteten, unterschiedlichen Zeta-Potential-Werte verantwortlich [57], da die Kopfgruppenorientierung in den gel- und flüssigkristallinen Phasen unterschiedlich ist [58].

Für die weiteren untersuchten natürlichen PLs lässt sich die Korrelation zwischen zusätzlichen anionischen Inhaltsstoffen, dem daraus resultierenden Zeta-Potential und dem Abstand der Bilayer, wie in Abbildung 21 dargestellt, gut nachvollziehen. Dabei scheinen für O/W-Emulsionen prinzipiell eher PLs mit geringeren Aufreinigungsgraden geeignet aufgrund der höheren Ladung und dickeren Schichten.

Dickere Grenzflächenschichten, die durch die Anwesenheit von stärker geladenen Substanzen verursacht werden können, führen zu einer erhöhten Stabilität von O/W-Emulsionen [59]. Die elektrostatische Abstoßung zwischen den Tröpfchen verhindert eine Aggregation der Tröpfchen der inneren Phase. Andererseits können dickere Doppelschichten mit verringerter Packungsdichte aufgrund elektrostatischer Abstoßung die Kontaktzeit zwischen innerer und äußerer Phase erhöhen und daher die Emulsion destabilisieren. Studien haben gezeigt, dass dichtere, festere Grenzflächen-Monoschichten zu einer Erhöhung der physikalischen Stabilität von O/W-Emulsionen führen [23], [60]. Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang aber auch noch einmal auf die Abhängigkeit der Grenzflächenmembran vom Anteil der dispersen Phase und des zugehörigen Emulgators im System [61]. Dabei gelten Anteile von mehr als 15% disperser Phase für die Herstellung von Emulsionen als kritisch [62] und bestimmen ebenso den resultierenden Durchmesser der Tröpfchen [63].

Verglichen mit dem Verhalten von natürlichen PLs ohne anionische Substanzen resultiert die Anwesenheit von geladenen Substanzen in paradoxen Phänomenen der lateralen Ordnung von Monoschichten. Während auf reinem Wasser als Subphase ein Kondensations-effekt zu beobachten ist, tritt bei Zugabe von Elektrolyten zur Subphase der gegenteilige Effekt der Expansion auf. Eine mögliche Erklärung ist die Verstärkung der elektrostatischen Effekte durch die zusätzlich vorhandenen Ionen der Lösung. Dadurch wird die zuvor geringere Reichweite der Abstoßung erhöht. Verstärkend können hierbei noch Dissoziationseffekte durch die zugegebenen Ionen wirken.

Eine andere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist der Bezug auf Fläche je Gramm, statt Fläche je Mol. Dieser Bezug wurde gewählt aufgrund der heterogenen Zusammensetzung und der teilweise unbekanntem Struktur der natürlichen PLs. Durch die

potentiell geringeren Molekulargewichte der Substanzen, welche kein PC sind, erscheint die Fläche der Fläche pro Gramm der stärker geladenen PLs zunächst kleiner als fast reines PC. Diese kleinere Fläche ist vielmehr das Resultat der kleineren Moleküle in der Monoschicht als der eines eventuellen Kompensationseffektes.

Die Auswirkungen der unterschiedlich zusammengesetzten PLs und ihrer daraus resultierenden Eigenschaften lassen sich abschließend allerdings nur durch einen Vergleich mit anderen Substanzklassen beurteilen. Hierbei sollte vor allem die Korrelation der physiko-chemischen Eigenschaften mit dem Vermögen zur Stabilisation einer Emulsion vergleichend betrachtet werden.

4.3 Mikroskopische Stabilitätsuntersuchungen

Um die gewonnenen Erkenntnisse zu verifizieren, wurde eine Methode zur mikroskopischen Tröpfchen Analyse angewandt. Dies geschah auch mit dem allgemeinen Ziel die Stabilität von Emulsionen zu beurteilen und zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene mikroskopische Verfahren evaluiert um eine optimale Methode zu finden.

Die in Kapitel 3.5.1 dargelegten Ergebnisse für Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) stehen nur scheinbar in Widerspruch zu den Publikationen, welche ein elektronenoptisches Bildgebungsverfahren für Emulsionen beschreiben [35]. In der genannten Literatur werden die Bedingungen für eine Präparation sowohl von W/O- als auch O/W-Emulsionen erläutert. Herausgestellt wird die besondere Schwierigkeit O/W-Emulsionen zu präparieren, was nur bei einer Emulsion von Wasser-in-DHP(Di-Heptyl-Phthalat) Emulsion gelang. Bessere Ergebnisse wurden für die O/W-Emulsionen erzielt. Aber auch hier ist augenfällig, dass die Emulsionen je nach verwendeter lipophiler Phase mit veränderten Emulgatormischungen (TWEEN®20, 60 oder 85 mit SPAN® 20 oder 85) und Konzentrationen hergestellt wurden. Hervorgehoben sei, dass die beschriebenen Ergebnisse eine Abhängigkeit von den definierten Druck- und Temperaturbedingungen aufweisen und dementsprechend nur für definierte Werte gelten.

Die zitierte Publikation beschreibt also in erster Linie die allgemeine Möglichkeit der Anpassung der Parameter für eine ESEM-Untersuchung von halbfesten Formulierungen. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit der Vergleich von verschiedenen Emulsionen im Hinblick auf ihre physiko-chemischen Eigenschaften war, wurde die Option ihrer Präparation unter verschiedenen Bedingungen verworfen. Der dafür nötige Aufwand wäre nicht leistbar gewesen, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Deswegen wurden einheitliche Untersuchungsparameter festgelegt.

Polarisationsmikroskopie wird unter anderem bei der Analyse von dispergierten Systemen zur Bestätigung des Vorhandenseins von Liposomen oder ähnlichen Strukturen, z. B. in

parenteralen Formulierungen, eingesetzt [64]. Die dabei genutzten anisotropen Eigenschaften ergeben sich aus der geordneten und gerichteten Struktur der PL-Schichten. Sobald die polarisierten Lichtstrahlen die senkrecht zur Polarisationssebene angeordneten lamellaren Schichten durchlaufen, entstehen die sogenannten „Malteserkreuz“-Texturen (Abbildung 29). Dieser optische Effekt wurde auch für die hergestellten Emulsionen beobachtet und wäre bei einschichtiger Präparation auf dem Objektträger vermutlich noch ausgeprägter gewesen. Solche eindeutigen Hinweise auf anisotrope Strukturen lassen auf eine mehrschichtige Anordnung der natürlichen PL um die dispergierte Ölphase schließen oder auf kristalline Strukturen innerhalb einer Schicht der PLs. Für das Formieren mehrschichtiger Lamellen ist sowohl der Anteil der dispergierten Phase als auch die Konzentration der eingesetzten PLs maßgeblich.

Polarisationsmikroskopie zum Nachweis von Liposomen in Emulsionssystemen ist besonders geeignet, da Öltröpfchen im Gegensatz zu den Phospholipidvesikeln keine optisch aktiven Eigenschaften besitzen. Eine Alternative ist die Dunkelfeldmikroskopie, die häufig im medizinischen und pseudo-medizinischen Bereich, z. B. zur Blutbildanalyse, eingesetzt wird. Momentan wird aber das Anwendungsspektrum der Technik konsequent erweitert [22]. Auch hier wird von spezifischen Eigenschaften der Beleuchtungstechnik Gebrauch gemacht, um Objekte ohne kontrastierende Eigenfarbe besser sichtbar zu machen.

In der Pharmazie wird die Mikroskopie hauptsächlich für die Charakterisierung von Emulsionen eingesetzt und nicht für die Bestimmung der Tröpfchengröße bzw. der Stabilität [65]. Häufiger eingesetzt wird das Verfahren in der Lebensmittelforschung [41], [66], [67] und in der Mineralölforschung [68]. Auch dort werden aber vermehrt andere bildgebende Verfahren, wie Particle Video Microscopy und Focus Beam Reflective Measurement für die Tröpfchengrößenbestimmung benutzt [61], [69]. Im Unterschied zu pharmazeutischen Emulsionen sind in den genannten Forschungs- bzw. Industriezweigen die Eigenschaften und Zusammensetzung der zu betrachtenden Emulsionen verschieden und z.B. in der Mineralölindustrie aufgrund geringerer Viskosität leichter für optische Auswertemethoden zugänglich.

Van Dalen et. al [70] konnten zeigen, dass die Schnittebene einer Emulsion einen Einfluss auf die gemessene Tröpfchengröße hat. Aufgrund zufällig gewählter Schnittebene wird sowohl eine geringere Anzahl an Tröpfchen vermessen, als auch ein kleinerer Durchmesser bestimmt. Um diesen Effekt zu reduzieren wurden 3 Schnittebenen der Emulsion gewählt. Eine größere Anzahl würde sicher zu einer weiteren Reduzierung führen, allerdings wäre der Nutzen geringer als der zu betreibende Aufwand.

Generell bleibt für die mikroskopischen Methoden festzuhalten, dass für den Anwender ein hoher präparativer Aufwand besteht und ein hohes Maß an Verständnis für die verwendete Technik und das zu untersuchende Präparat vorhanden sein muss. Besonders Sorgfalt ist auch für das korrekte Applizieren der Emulsion auf den Objektträger und die Wahl eines nach

Möglichkeit artefaktfreien Bildausschnittes erforderlich. Gerade durch interdisziplinären Austausch bietet sich aber die Möglichkeit diese Herausforderungen zu minimieren und zusätzliche bildgebende Verfahren zur Tröpfchengrößenbestimmung zu evaluieren.

4.4 Partikelgröße und Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen ergeben sich weitere herausfordernde Aspekte. Dabei sind für die Analyse und Charakterisierung von Partikelsystemen verschiedene Ansätze und Gleichungen entwickelt worden. Für ihre Auswahl und Anwendung ist auch die wissenschaftliche Disziplin zu berücksichtigen, für deren Zielsetzungen die entsprechenden Parameter definiert wurden. Die zu charakterisierenden Partikel können dabei sowohl fester, flüssiger oder gasförmiger Natur sein als auch unterschiedliche Formen haben.

Für die pharmazeutische Anwendung sind besonders der Z-Average, bekannt aus der Analyse der dynamischen Lichtstreuung (DLS), der Äquivalentdurchmesser und der Sauter-Durchmesser bedeutsam. Die DLS wird in der Pharmazie für die Bestimmung von Partikelgrößenverteilung von Emulsionen, Dispersionen, Pulvern und Aerosolen eingesetzt. Der resultierende Z-Average repräsentiert dabei den Gesamtdurchschnitt aller Signalintensitäten die vom Detektor aufgenommen werden [71]. Er ist daher eine gerätespezifische Größe und für die Übertragung auf andere Messtechniken ungeeignet. Der Äquivalentdurchmesser hingegen ist vor allem ein Maß für die Größe von unregelmäßig geformten Partikeln, wie sie beispielsweise bei Zerkleinerungsprozessen entstehen [72]. Bei Emulsionen kann aber der Fall von ideal kugelförmigen dispergierten Partikeln angenommen werden, da in diesem Zustand die Grenzfläche und die damit verbundene benötigte Energie minimal sind. Der Sauter-Durchmesser beschreibt das Volumen/Oberflächenverhältnis von ideal gleich großen Partikeln einer Dispersion [73]. Da die Tröpfchengrößen nicht diskret, sondern als Klassen erfasst wurden, hätte die Berechnung des Sauter-Durchmessers zu Verfälschungen geführt. Daher wurde für den Vergleich der Histogramme der arithmetische Mittelwert der erhaltenen Partikel je Größenklasse genutzt.

Zur Interpretation der erhaltenen Daten sind weitere Verfahren der statistischen Auswertung evaluiert worden. Da die gewonnenen Daten aufgrund der in Kapitel 3.7 beschriebenen Einschränkungen der Methode keiner Wahrscheinlichkeitsverteilung zugeordnet werden konnten, ergibt sich die Verwendung einer nichtparametrischen Statistik für die zu untersuchenden Verteilungen. Dabei wurde sich für ein Verfahren entschieden, das testet, ob die Werte zweier betrachteter Populationen tatsächlich aus 2 Verteilungen herrühren oder ob die Werte Bestandteil ein und derselben Population von Partikeln sind. Es geht um die Frage, in welchem Maß ein zufällig aus der einen Population ausgewählter Wert größer oder kleiner ist als ein

zufällig ausgewählter Wert aus der anderen Population ist. Hierfür wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test gewählt, auch Wilcoxon-Rangsummentest genannt.

Die für die deskriptive Statistik in der Pharmazie häufig genutzte Varianz-Analyse und der t-Test konnten für die Datenauswertung nicht genutzt werden, da die Voraussetzungen (Normalverteilung der Grundgesamtheit) nicht erfüllt sind. Aus dem gleichen Grund konnten weitere für Partikelgrößenverteilung genutzte Verfahren, wie die Dichtefunktion nicht angewendet werden.

Für alle drei zur Anwendung gebrachte, mit pflanzlichen PLs hergestellte Emulsionen ergab sich trotz unterschiedlicher HLB-Bereiche die gleiche physikalische Stabilität, die mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test hinreichend verlässlich ermittelt und statistisch abgesichert werden konnte (Kapitel 3.7). Ein gleichbleibende durchschnittliche Tröpfchendurchmesser in Emulsionen über die Zeit ist bereits in der Literatur beschrieben [74]. Als Gründe werden hierfür die nicht-lineare Kinetik der Prozesse die zum Brechen einer Emulsion führen beschrieben, ebenso wie die Wahl des Probenahmepunktes in einer Emulsion. Abhängig von den dominierenden Prozesse in der Emulsion (Aufräumung vs. Sedimentation) sind andere Stellen der Emulsion kritisch für deren Brechen.

Die angewendeten mikroskopischen und analytischen Methoden bieten einen automatisierungsfähigen Ansatz, der nach Kenntnis des Autors in der pharmazeutischen Literatur bisher nicht beschrieben ist. Durch die Spezifik der Datengenerierung und der statistischen Auswertung sind Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der hiermit gewonnen Aussagen mit bereits etablierten Partikelgrößen-Analyse-Systemen notwendig. Dies war im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Studien aufgrund von Limitierungen bei Laborverfügbarkeit und Zeit nicht leistbar.

In letzter Zeit gibt es auf dem Gebiet der chemischen Verfahrenstechnik vermehrt Publikationen, welche sich mit der automatisierten Aufzeichnung und Auswertung von Tröpfchengrößen und deren Verteilung in Emulsionen beschäftigen [75]–[77]. Diese benutzen als Parameter zur Klassifikation und Auswertung ganz unterschiedliche Darstellungsweisen, wie Boxplots, Summenverteilungen oder Dichteverteilungen. Eine favorisierte Variante der Auswertung der Tröpfchengrößenverteilung hat sich bisher noch nicht durchgesetzt.

Einer der Hauptgründe warum auch 30 Jahre nach Erstbeschreibung der Möglichkeit automatisierter Bildauswertungen [78] noch keine industrielle Nutzung erfolgt sind die unterschiedlichen Eigenschaften der Bandbreite an Emulsionen. Dadurch kann keine generell anwendbare Methode vorgegeben werden, sondern es sind immer eine Vielzahl von individuellen Anpassungen nötig. Noch viel entscheidender ist aber die noch nicht eindeutig beschriebene Korrelation zwischen Tröpfchengrößenverteilung und Stabilität einer Emulsion.

Viele Hoffnungen für dieses Problem ruhen auf der künstlichen Intelligenz, welche aus einer Vielzahl von Menschenhand klassifizierter Verteilungen ein prädiktives Modell errechnet [79]. Ebenso gibt es Ansätze komplett auf die Bestimmung der Tröpfchengröße für prädiktive Modelle zu verzichten und einen rein mathematischen (chemometrischen) Ansatz zu wählen [80]. Beide Ansätze bieten interessante Perspektiven und werden in den kommenden Jahren zu einem neuen Verständnis von Emulsionen und deren Verhalten führen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

Alle Phospholipide, inklusive DPPC und POPC, wurden freundlicherweise von der LIPOID GmbH (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung der analysierten Chargen ist in Tabelle 2 aufgeführt. Die verwendeten Öle wurden von Croda Europe (England) bezogen, das Polysorbat 20 und 80 (TWEEN®20, TWEEN®80) von Caelo (Hilden, Deutschland) und Sorbitanmonolaurat (SPAN®20) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Das dünnflüssige Paraffin aus einer Abfüllung der St. Laurentius Apotheke in Borchon (Deutschland), Sucrodestearat von Sisterna (Roosendaal, Niederlande) und mittelkettige Triglyceride von Fagron (Glinde, Deutschland) zum Einsatz.

5.2 Methoden

5.2.1 HLB Bestimmung

Die HLB-Wert Untersuchungen wurden an 14 PLs durchgeführt, die von LIPOID GmbH (Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Zur Herstellung der Proben und der damit verbundenen Lösungen der eingesetzten PLs und W/O-Emulgatoren in den jeweiligen Ölen bzw. der O/W-Emulgatoren in gereinigtem Wasser wurde das Ultraschallbad Sonorex® Super RK 102 H von Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland) eingesetzt. Zur Homogenisierung der Emulsionen wurde mit dem Ultra-Turrax® T 25 digital von IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland) als Mischer gearbeitet. Als Zentrifuge diente eine Heraeus Biofuge® primo R (Hanau, Deutschland), um die Zeit der Phasentrennung der Emulsionen zu verkürzen. Die verwendeten Zentrifugenröhrchen fassten ein Volumen von 15 ml und waren zu 0,5 ml skaliert.

Die Vorversuche, wie auch die Probenvorbereitungen und anschließenden HLB-Wert-Bestimmungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Dank standardisierter Homogenisationszeiten von 20 Sekunden mit dem Ultra-Turrax® sowie definierten Zentrifugationszeiten der Dauer von 2, 4, 6 und 8 Minuten bei 21°C wurden gleiche Untersuchungsvoraussetzungen geschaffen. Alle Bestimmungen wurden mit $n = 3$ Ansätzen durchgeführt, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen.

Zur Bestimmung der HLB-Werte wurden zunächst Stammlösungen der Öllöslichen PLs und des wasserlöslichen Polysorbat 80 hergestellt. Dabei wurden von jedem zu untersuchenden Lecithin 3 Stammlösungen (SL) der Konzentration 25 mg/ml mit den Ölen IPP (HLB = 10, $\rho = 0,85 \text{ g/cm}^3$), ISIS (HLB = 11, $\rho = 0,87 \text{ g/cm}^3$) und AB (HLB = 12, ρ nicht definiert) als Lösungsmittel hergestellt und bis zur vollständigen Lösung ins Ultraschallbad gegeben (SL Typ A). Die gute Löslichkeit der PLs sowie deren Lösungsgeschwindigkeit von maximal 20

Minuten ohne Zufuhr von Wärme wurden in Voruntersuchungen festgestellt. Die Herstellung der SL des Polysorbat 80 erfolgte in gleicher Konzentration in gereinigtem Wasser und wurde ebenfalls im Ultraschallbad für die Dauer von 5 Minuten behandelt, um eine vollständige Lösung des O/W-Emulgators (HLB = 15) zu gewährleisten (SL Typ B)

Im Anschluss an die Präparation der Emulgator-Stammlösungen folgt die Herstellung von Stammemulsionen, anhand derer durch Mischung in definierten Verhältnissen die Emulsionsreihe entsteht.

Die Stammemulsionen wurden wie folgt angefertigt: Nach Vorlage eines Anteils aus dem jeweiligen Öl, das zur Herstellung der Lecithin-Stammlösung verwendet wurde, wurde die Stammlösung derart zugegeben, dass sie in einer Endkonzentration von 0,5% (V/V) vorlag. Erst dann wurde die wässrige Phase in gleichem Anteil zur Öl-Phase zugegeben, sodass lipophiler und hydrophiler Anteil im Verhältnis 50:50 vorlagen. Die Emulgatorkonzentration betrug somit in den Stammemulsionen 0,125 mg/ml.

Durch Mischen der Öl- und Wasserphase mittels Ultra-Turrax (20 Sekunden) entstanden zwei über den Zeitraum von 10 Minuten stabile Emulsionen A und B, wobei in Emulsion A das zu untersuchende Lecithin und in Emulsion B Polysorbat 80 als Emulgator diente.

Im Anschluss daran erfolgte die Herstellung der Emulsionsreihe mit einem Umfang von 12 Emulsionen zu je 10 ml mittels Kombination der Stammemulsionen A und B in verschiedenen Volumenanteilen. Die daraus resultierenden Emulsionen wurden in Zentrifugenröhrchen gegeben und manuell durch kurzes Aufschütteln per Hand erneut homogenisiert. Daraus resultiert eine Reihe von Emulsionen, die eine HLB-Spanne abdecken, innerhalb derer der unbekannte HLB-Wert des Lecithins rechnerisch ermittelt werden kann.

Die vorbereiteten Proben der Emulsionsreihe wurden mit 1500 U/min für 2, 4, 6 und 8 Minuten in der Heraeus Biofuge® (Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Nach Entnahme aus der Zentrifuge wurde unmittelbar die Phasentrennung in Millilitern bestimmt, in dem die Höhe der Phasentrennlinie anhand der Skalierung der Zentrifugenröhrchen abgelesen wurde. Die Feinbestimmung erfolgte unter Zuhilfenahme von Millimeterpapier, was ein Ablesen der Phasentrennlinie auf 0,1 ml ermöglichte.



Abbildung 42: Phasenseparationsverlauf am Beispiel PHOSPHOLIPON 50 IP in ISIS

Mittels der Phasentrennlinien, sichtbar durch die klare Abtrennung der wässrigen Phase im unteren Teil des Tubes (Abbildung 42), konnte die Emulsion der geringsten Phasentrennung der Emulsionsreihe bestimmt werden. Der in dieser Probenemulsion enthaltene Anteil an Lecithin sowie der Anteil an Polysorbat 80 und dessen HLB-Wert, ebenso der eHLB-Wert des verwendeten Öls wurden anschließend für die Berechnung des unbekannten HLB-Wertes des zu untersuchenden Lecithins eingesetzt und nach der Gleichungen von Griffin berechnet (Gleichung 8). Der HLB-Wert des Lecithins ist der gemittelte Wert aus $n = 3$ Ansätzen bei 8 Minuten Zentrifugationszeit, da nach dieser Zeit die Phasentrennlinien der Emulsionen am stabilsten und gut reproduzierbar waren.

5.3 Vorversuche im Rahmen der HLB-Wert-Bestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Vorfeld Versuche unternommen, um die experimentelle Vorgehensweise zu erproben und die ausgewählte Literaturmethode zu optimieren. Für die Vorversuche wurden die PLs LIPOID H 50 und P 100 ausgewählt.

5.3.1 Löslichkeit der PLs

Um die Löslichkeit der PLs in verschiedenen Medien zu bestimmen, wurden diese im Anteil von 0,5 % (m/m) in 10 ml des jeweiligen Lösungsmittels gegeben und ohne Zufuhr von Wärme ins Ultraschallbad gegeben. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über eine Stunde, wobei im Abstand von 5 Minuten das Lösungsverhalten der PLs dokumentiert wurde. Getestet wurden die PLs in ICS, STS, IPP, ISIS, MCT und AB.

5.3.2 Auswahl des Partneremulgators

In Anlehnung an die Methode nach Robbers und Bhatia [19], wurde eine Stammlösung der PLs LIPOID H 50 und P 100 mit 25 mg/ml in IPP hergestellt sowie Stammlösungen der wasserlöslichen Emulgatoren Sucrosetearat (bei 55°C) und Polysorbat 80 (ohne Wärmezufuhr) in gereinigtem Wasser.

Im Anschluss wurden die Stammemulsionen hergestellt, wobei die Emulgator-Konzentration mit 0,125%, 0,25%, 0,5%, 0,75% und 1,0% Volumenanteil der Stammlösung variierte. Jeweils eine Lecithin-haltige und eine Polysorbat 80- bzw. Sucrosetearat-haltige Stammemulsion wurden im Verhältnis 50:50 gemischt und für 6 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte nach der Qualität der Phasentrennlinie.

5.3.3 Auswahl der Öle und deren eHLB-Rückbestimmung

Untersucht wurden Öle, deren eHLB-Wert im Bereich 8 - 12 liegen. Die Wahl fiel auf die von Croda Europe (England) bezogenen Öle. Es wurde wie unter beschrieben vorgegangen und die PLs H50 und P100 in den Ölen ICS, STS, IPP, ISIS, MCT und AB getestet. Es folgte die Auswahl von 3 Ölen, die sich für die HLB-Bestimmung der PLs eignen.

Daran schloss sich die Überprüfung der eHLB-Werte der ausgewählten Öle IPP, ISIS, AB anhand der Literaturmethode [19] mit einem etablierten Emulgatorsystem aus Polysorbat 80 (HLB = 15) und Sorbitanmonolaurat (HLB = 9,6): Nach Herstellung der jeweiligen Stammlösungen (25 mg/ml) und Stammemulsionen, die jeweils einen wasserlöslichen und einen wasserunlöslichen Emulgator enthielten, wurde eine Emulsionsreihe mit einem Umfang von 10 Emulsionen hergestellt und für 8 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte über Gleichung 8.

5.4 Zeta-Potential

5.4.1 Herstellung von Liposomen

Die Liposomen wurden durch ein Membranextrusionsverfahren hergestellt. Alle PLs wurden in Wasser (10 mg in 1 ml) dispergiert und bei Raumtemperatur extrudiert oder in einem Wasserbad oberhalb der Phasenübergangstemperatur (60 ° C) erhitzt. Dann wurden die Lipiddispersionen 19mal durch 0,1 µm Polycarbonatmembranen unter Verwendung des Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, USA) extrudiert. Um mögliche strukturelle Defekte zu entfernen, wurden die erhaltenen Liposome für 1 h über ihrer erwarteten Übergangstemperatur gelassen, die z.B. 41 ° C für DPPC (1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin) [81] und -2 ° C für POPC (1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin) [82]. Die so hergestellten Liposomen wurden innerhalb von 3 Stunden gemessen. Alle Liposomen wurden 3-mal präpariert, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

5.4.2 Zeta-Potential Messung

Alle so erhaltenen Liposomen wurden zeitnah nach Herstellung unverdünnt (10 mg / ml) in entionisiertem Wasser (pH 6,2) gemessen. Das Zeta-Potential aller Liposomen wurde bei 20 ° C unter Verwendung des Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) bestimmt, der mit einer Tauchzelle (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) zur Zeta-Potential Bestimmung ausgestattet war.

5.5 Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)

Die Proben wurden auf eine Temperatur oberhalb des Hauptphasenübergangs (50 ° C) erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Kühl-Heiz-Zyklus wurde dreimal mit Vortexen dazwischen wiederholt. Lipiddispersionen wurden in 150 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, hergestellt. Die Lipiddispersionen (20 % (w/w) im Puffer) wurden in Glaskapillaren (Innendurchmesser 1,5 mm, GLAS, Deutschland) überführt. Nach der Vorbereitung wurden die Proben 7 Tage im Kühlschrank (4° C) gelagert und dann bei Raumtemperatur gemessen. Die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) wurde am Nanostar (Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Das Beugungssignal wurde mit einem Vantec 2000 2D MikroGap Detector (Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland) gemessen. Der ankommende Strahl hatte eine Wellenlänge von 154 μm und die Belichtungszeit betrug 2 h. Die Temperatur wurde während der Messungen auf 20 °C eingestellt. Positionen der Bragg-Peaks wurden in reale Raumwiederholungsabstände der Gitterebenen umgewandelt. Zur Bestimmung der Peakmaxima und der Halbwertsbreite (FWHM) wurden Lorentz-Kurven an die experimentellen Datenpunkte angepasst.

5.6 Langmuir Isothermen

Die PLs wurden in Chloroform gelöst, um 1 mM Vorratslösungen herzustellen. Ultrareines Wasser mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 M Ωcm wurde für die Monoschicht-Experimente verwendet und wurde von einem Millipore-Desktop-System erhalten. Oberflächendruck / Flächen-Isothermen (π -A-Isothermen) wurden auf einer mit einer Wilhelmy-Waage ausgerüsteten Langmuir-Mulde mit Computerschnittstelle (R & K, Potsdam, Deutschland) aufgezeichnet. Die Temperatur wurde konstant bei 20 \pm 0,1 °C gehalten. Zehn Minuten nach dem Verteilen von 50 μL PL-Lösung wurde die Monoschicht mit einer konstanten Geschwindigkeit komprimiert und die π -A-Isothermen wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Alle Isothermen wurden mindestens zweimal gemessen, um auf Reproduzierbarkeit zu prüfen.

5.7 Brewster-Winkel-Mikroskopie (BAM)

Die Morphologie der Monoschicht wurde mit einem Brewster-Winkelmikroskop [83], [84], Modell BAM2 + von NanoFilm Technologie (Göttingen, Deutschland), mit einer Miniaturfilmwaage von NIMA Technology (Coventry, UK), beide auf einem Antivibrationstisch montiert, abgebildet. Das Mikroskop wurde mit einem frequenzverdoppelten Nd: YAG-Laser (532 nm, ~ 50 mW), einem Polarisator, einem Analysator und einer CCD-Kamera ausgestattet. Wenn p-polarisiertes Licht auf die reine Luft / Wasser-Grenzfläche bei dem Brewster-Winkel (~ 53,1 °) gerichtet wird, wird eine Nullreflektivität beobachtet. Das Vorhandensein einer Monoschicht bewirkt, dass Licht aufgrund des veränderten Brechungsindex der Oberflächenschicht reflektiert wird, der dann von der CCD-Kamera nach Passieren des Analysators registriert wird. BAM-Bilder von $355 \times 470 \mu\text{m}^2$ wurden während der Kompression der Monoschicht digital aufgezeichnet. Die laterale Auflösung betrug etwa $2 \mu\text{m}$.

5.8 Herstellung der Emulsionen

Alle O/W-Emulsionen zur mikroskopischen Untersuchung wurden mit mittelkettigen Triglyceriden (MCT) als lipophiler Phase von 20 % (w/w) und mit 2 % des jeweiligen PL als Emulgator hergestellt. Nachdem die natürlichen PLs 30 Sekunden lang in Wasser hydratisiert worden waren, wurden beide Phasen vereinigt und zwei Minuten lang per Ultra-Turrax® (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) bei 13000 U/min gerührt. Für den Vergleich der Herstellungsmethoden wurden zusätzlich zur Präparation mit dem Ultra-Turrax® noch ein Blatt-Rührer (EUROSTAR 40 digital, IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland) und eine Fantaschale mit Pistill eingesetzt. Die Umdrehung pro Minute (rpm) des Blatt-Rührers lagen bei 200, die des Ultra-Turrax® bei 6000. Die Präparationszeit für alle Emulsionen in diesem Versuch betrug 5 Minuten. Alle Emulsionen wurden bei Raumtemperatur gelagert, wenn nicht anders lautend beschrieben, und mit einer Pipette auf einen Objektträger übertragen.

5.9 Lichtmikroskopie

Die Bestimmung der Tröpfchengröße erfolgte mittels des Mikroskops Leica DM RXE (Wetzlar, Deutschland) mit aufgesetzter Kamera ColorView 3.1 (SIS, Norwich, UK). Es wurden Objektträger mit einer Vertiefung von 5 mm im Zentrum gewählt, um die maximal mögliche Tröpfchengröße unter dem Deckglas zu erhöhen. Es wurde ein Tropfen der Probe mittels Einmaltropfer am Rand der Vertiefung aufgebracht, mit dem Deckglas abgedeckt und drei Minuten unter dem Mikroskop mit eingeschaltetem Licht äquilibriert. Als Bedingung für die mikroskopische Aufnahme wurde Durchlicht mit einem Dunkelfeldfilter gewählt und die Bilder wurden am Rand der Vertiefung aufgenommen, um den maximalen Helligkeitskontrast zwischen den Phasen zu gewährleisten.

5.10 Bildauswertung

Die Bildauswertung erfolgte mit der Software ImageJ (U. S: National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) [44], [85]. Zuerst wurde mittels „Enhance Contrast“ der vorhandene Kontrast des Bildes verstärkt. Der Hintergrund wurde ausgeglichen mittels „Background Subtraction“. Zunächst wurde das aufgenommene RGB- Bild in HSB-Schichten aufgeteilt. Davon wurde das Helligkeits- Abbild zur weiteren Benutzung gewählt. Das nun gewonnene Bild konnte mit einem manuell eingestellten Schwellwert (0 bis 65 von 255) binärisiert werden. Anschließend wurde die Partikelanalyse durchgeführt mit einem Minimalwert von $6 \mu\text{m}^2$ Fläche ($\approx 2 \mu\text{m}$ Durchmesser, was der Lichtmikroskop-Auflösung entspricht). Die Feret-Durchmesser der Tröpfchen wurden dann mittels Software MS Excel und R [86] ausgewertet und die Histogramme mittels Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) erstellt.

6 Fazit / Ausblick

Natürliche PLs aus Sojabohnen, Sonnenblumen und Eigelb wurden auf ihre physikochemischen Eigenschaften im Hinblick auf ihre praktische Anwendbarkeit als Emulgatoren hin untersucht.

Dazu wurden zuerst vierzehn unterschiedliche PLs mit Hilfe eines Zentrifugationstests auf ihre HLB-Werte untersucht. Dabei konnten einige Ungereimtheiten bei der Bestimmung und Verwendung des HLB-Wertes als universeller Parameter für die Charakterisierung von Emulgatoren gezeigt werden. Zum einen sind die experimentell bestimmten HLB-Werte deutlich abhängig von der verwendeten lipophilen Phase als ihr erforderlicher HLB-Wert suggeriert. Es konnten Unterschiede für die natürlichen PLs in Abhängigkeit der verwendeten Ölen von bis zu zwei HLB-Einheiten gezeigt werden. Zum anderen sind die zu erwartenden klaren Stabilitätsoptima am HLB-Wert der Emulgatoren nicht signifikant zu bestimmen bei Verwendung von natürlichen PLs im Gegensatz zu klassischen ethoxylierten Emulgatoren, wie SPAN® und TWEEN®. Die Gründe für die Unausgewogenheit des HLB-Wertes liegen in seiner Entwicklung mit und für ethoxylierte Sorbitanester. Die dabei willkürlich getroffenen Annahmen und Folgerungen berücksichtigen dabei die Interaktionen zwischen den Emulgatoren und den Phasen der Emulsion nur ungenügend. Die ursprüngliche Gleichung wurde mehrfach modifiziert, um diesem Umstand mehr Rechnung zu tragen [13]. Trotzdem ist der grundlegende Ansatz, ein System aus mehreren Komponenten nur über einen davon bewerten zu wollen, nicht ausreichend.

Daher wird vom Autor vorgeschlagen, anstelle eines einzigen numerischen Wertes Bereiche von HLB-Werten für die Verwendung von natürlichen PLs und möglicherweise weiteren Emulgatorklassen zu benutzen oder Emulsionsstabilitätsexperimente durchzuführen, anstatt sich auf ungefähre HLB-Literaturwerte zu verlassen. Die meisten der dabei analysierten PLs wiesen einen HLB-Bereich auf, der für die Herstellung einer O/W-Emulsion geeignet ist. PLs mit erhöhtem PE-Gehalt (ca. 10 % und mehr) zeigten zusätzliche Präferenzen für die Verwendung als W/O-Emulgatoren.

Die natürlichen PLs zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei der Bildung von Mono- und Doppelschichten. Die Stabilität von Emulsionen mit PLs als Emulgatoren und die Verkapselungswirksamkeit von Liposomen hängen von den Eigenschaften der gebildeten Grenzflächen-Phospholipid-Mono- und Doppelschichten ab. Die Analyse der Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der PL-Schichten ermutigt den Anwender, die Möglichkeiten der verschiedenen natürlichen PLs experimentell als Teil des Designs und der Entwicklung einer Formulierung zu evaluieren. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der Menge der geladenen Substanzen in natürlichen PL und deren PC-Gehalt in wässrigen liposomalen Dispersionen und Langmuir-Monoschichten untersucht.

Natürliche PLs mit einem geringeren Gehalt an PC, die zusätzlich geringe Mengen anionischer Substanzen enthalten, weisen eine höhere negative Oberflächenladung auf, was zu einer verringerten Aggregation von Tröpfchen und Vesikeln führt, wenn diese PLs als Emulgatoren oder Liposomenbestandteil verwendet werden. Eine weitere Folge der erhöhten Oberflächenladung ist die Abstoßung zwischen gebildeten Doppelschichten, wie die SAXS-Daten vermuten lassen. Eine weitere Erklärung für die Zunahme des Wiederholungsabstandes kann ein Kondensationseffekt im hydrophoben Teil der Schicht sein (Umwandlung von *gauche* zu *all-trans*), der durch das Vorhandensein zusätzlicher Mischungskomponenten verursacht wird. Die laterale Organisation der natürlichen PLs in Langmuir-Schichten führt zu einer Verringerung der Fläche pro Gramm, wenn der Gehalt an geladenen Substanzen erhöht wird. Dies deutet auf eine höhere Packungsdichte in der Schicht hin, was zu einer erhöhten Dicke des hydrophoben Bereichs führen kann. Die beobachtete Kondensation führt zu einer erhöhten Monoschichtrigidität die zur physikalischen Stabilität potentieller Formulierungen beiträgt, da die Koagulation der Tröpfchen durch Emulgatorverdrängung und Desorption entlang der Grenzfläche erfolgt. Einige Studien haben bereits eine erhöhte Stabilität von PL-Membranen, die natürlich vorkommende Substanzen (z.B. Cholesterin) enthalten, im Vergleich zu Membranen, die nur aus reinem PC bestehen, gezeigt [87].

Interessanterweise konnte in den Experimenten mit LIPOID S 45 kein Einfluss der Kationenvalenz auf die Fläche pro Molekül gefunden werden. Es zeigte sich, dass Monoschichten aus reinem PC in Gegenwart von zweiwertigen Kationen wie Calcium oder Magnesium kondensieren [31]. Es wird vermutet, dass zweiwertige Kationen in PC-Systemen aufgrund der Dehydrierung des Phosphatanteils der Kopfgruppe eine höhere Ordnung induzieren. Das Vorhandensein von zusätzlich geladenen Substanzen in LIPOID S45 in der Phasengrenzfläche scheint diesen Effekt zu beseitigen.

Mikroskopische Bilder von generischen O/W-Emulsionen mit natürlichen PLs aus verschiedenen HLB-Bereichen konnten ihr Potential bestätigen, stabile Emulsionen über ihren bekannten HLB-Wert hinaus zu erzeugen. In Anbetracht der Komplexität der möglichen Grenzflächeninteraktionen und -strukturen natürlicher Emulgatoren und der Herausforderung, die Fähigkeit solcher Mischungen zur Bildung stabiler Grenzflächen und Emulsionen vorherzusagen, bietet die entwickelte Methode großes Potential genauere Einblicke in das Ergebnis dieser Prozesse zu erhalten. Dafür muss für die Methode eine breite Basis an Daten durch Einsatz bei verschiedenen Charakterisierungen geschaffen werden, um die statistische Aussagekraft der Histogramme zu erhöhen.

Für den Einsatz als Emulgator in halbfesten Formulierungen bieten die natürlichen PLs vorteilhafte Eigenschaften. Das natürlich vorkommende Zeta-Potential verhindert die Koaleszenz der dispersen Phase durch elektrostatische Abstoßung. Die in dieser Arbeit vorgestellten neuen Erkenntnisse können die Erforschung von PLs als natürliche und physiologisch

relevante Emulgatoren fördern, insbesondere angesichts der wachsenden Skepsis der Öffentlichkeit gegenüber aggressiven, unnatürlichen, synthetischen und halb-synthetischen Tensiden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] H. Pardun, "Eine empirische Methode zur Bestimmung der Emulgierfähigkeit von Pflanzenlecithinen in O/W-Systemen," *Fette, Seifen, Anstrichm.*, vol. 84, no. 8, pp. 291–299, 1982.
- [2] H. Chung, T. W. Kim, M. Kwon, I. C. Kwon, and S. Y. Jeong, "Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system," *J. Control. Release*, vol. 71, no. 3, pp. 339–350, 2001.
- [3] R. C. R. Jala *et al.*, "Enzymatic preparation and characterization of soybean lecithin-based emulsifiers," *Grasas y Aceites*, vol. 67, no. 4, pp. e168–e168, Dec. 2016.
- [4] "Umsatz mit Naturkosmetik bis 2019 | Statista." [Online]. Available: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/201220/umfrage/umsatz-mit-naturkosmetik-in-deutschland/>. [Accessed: 22-Sep-2020].
- [5] "Natural Cosmetics Market Size, Share, Trends | Industry Report, 2025." [Online]. Available: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/natural-cosmetics-market>. [Accessed: 22-Sep-2020].
- [6] P. van Hoogevest and A. Wendel, "The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 116, no. 9, pp. 1088–1107, 2014.
- [7] *United States Pharmacopoeia - National Formulary [USP 40 NF 35]*, Volume 1. Rockville: Pharmacopeial Convention Inc, 2018.
- [8] B. F. Szuhaj, "Lecithin production and utilization," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 60, no. 2Part1, pp. 306–309, Feb. 1983.
- [9] U.S. Food and Drug Administration, "CFR - Code of Federal Regulations Title 21," 2013.
- [10] J. Wohlrab, T. Klapperstück, H. W. Reinhardt, and M. Albrecht, "Interaction of epicutaneously applied lipids with stratum corneum depends on the presence of either emulsifiers or hydrogenated phosphatidylcholine," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 23, no. 6, pp. 298–305, 2010.
- [11] W. C. Griffin, "Classification of surface-active Agents by 'HLB,'" *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 1, pp. 311–326, 1949.
- [12] W. C. Griffin, "Calculation of hlb values of non-ionic surfactants," *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 5, pp. 249–256, 1954.

- [13] J. T. Davies, "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent," in *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface. Proceedings of the International Congress of Surface Activity*, 1957, vol. 1, pp. 426–438.
- [14] V. R. Huebner, "Determination of the Relative Polarity of Surface Active Agents by Gas-Liquid Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 34, no. 4, pp. 488–491, Apr. 1962.
- [15] P. Becher and R. L. Birkmeier, "The determination of hydrophile-lipophile balance by gas-liquid chromatography," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 41, no. 3, pp. 169–172, Mar. 1964.
- [16] W. G. Gorman and G. D. Hall, "Use of dielectric constants in the classification of surfactants," *J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 442–446, May 1963.
- [17] A. H. C. Chun and A. N. Martin, "Measurement of Hydrophile-Lipophile Balance of Surface-Active Agents," *J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 9, pp. 732–736, Sep. 1961.
- [18] H. L. Greenwald, G. L. Brown, and M. N. Fineman, "Determination of the Hydrophile-Lipophile Character of Surface Active Agents and Oils by a Water Titration," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 11, pp. 1693–1697, Oct. 1956.
- [19] J. E. Robbers and V. N. Bhatia, "Technique for the Rapid Determination of HLB and Required-HLB Values," *J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 8, pp. 708–709, 1961.
- [20] T. Glawdel and C. L. Ren, "Zeta Potential Measurement," in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, New York, NY: Springer New York, 2015, pp. 3513–3522.
- [21] S. Da Vela and D. I. Svergun, "Methods, development and applications of small-angle X-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution," *Current Research in Structural Biology*, vol. 2. Elsevier B.V., pp. 164–170, 01-Jan-2020.
- [22] P. Fei Gao, G. Lei, and C. Zhi Huang, "Dark-Field Microscopy: Recent Advances in Accurate Analysis and Emerging Applications," vol. 8, p. 51, 2021.
- [23] L. Rydhag and I. Wilton, "The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 58, no. 8, pp. 830–837, 1981.
- [24] I. A. Inc, *The HLB system : a time-saving guide to emulsifier selection*. Wilmington: ICI Americas, Inc., 1984.
- [25] D. M. Cabezas, B. W. K. Diehl, and M. C. Tomás, "Emulsifying properties of hydrolysed and low HLB sunflower lecithin mixtures," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 118, no. 7, pp. 975–983, 2016.

- [26] J. M. Seddon, "Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids," *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.*, vol. 1031, no. 1, pp. 1–69, Feb. 1990.
- [27] W. J. van Blitterswijk, H. Hilkmann, and B. W. van der Meer, "Quantitative Contributions of Cholesterol and the Individual Classes of Phospholipids and Their Degree of Fatty Acyl (Un)Saturation to Membrane Fluidity Measured by Fluorescence Polarization," *Biochemistry*, vol. 26, no. 6, pp. 1746–1756, 1987.
- [28] J. S. Patton, B. Stone, C. Papa, R. Abramowitz, and S. H. Yalkowsky, "Solubility of fatty acids and other hydrophobic molecules in liquid trioleoylglycerol," 1984.
- [29] N. Kučerka, Y. Liu, N. Chu, H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, "Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DMPC and DLPC Lipid Bilayers Using X-Ray Scattering from Oriented Multilamellar Arrays and from Unilamellar Vesicles," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 4, pp. 2626–2637, 2005.
- [30] M. Lúcio, F. Bringezu, S. Reis, J. L. F. C. Lima, and G. Brezesinski, "Binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to DPPC: structure and thermodynamic aspects.," *Langmuir*, vol. 24, no. 8, pp. 4132–9, 2008.
- [31] E. M. Adams, C. B. Casper, and H. C. Allen, "Effect of cation enrichment on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers at the air-water interface," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 478, pp. 353–364, 2016.
- [32] J. Minones, J. M. Rodríguez Patino, O. Conde, C. Carrera, and R. Seoane, "The effect of polar groups on structural characteristics of phospholipid monolayers spread at the air–water interface," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 203, no. 1–3, pp. 273–286, Apr. 2002.
- [33] B. S, M. L, R. HJ, M. SJ, and T. DP, "The molecular mechanism of lipid monolayer collapse," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 31, pp. 10803–10808, Aug. 2008.
- [34] D. J. Stokes, B. L. Thiel, and A. M. Donald, "Direct observation of water-oil emulsion systems in the liquid state by environmental scanning electron microscopy," *Langmuir*, vol. 14, no. 16, pp. 4402–4408, Aug. 1998.
- [35] R. G. Mathews and a M. Donald, "Conditions for imaging emulsions in the environmental scanning electron microscope.," *Scanning*, vol. 24, no. 2, pp. 75–85, 2002.
- [36] G. Rücker, M. Neugebauer, and G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2013.

- [37] T. F. Tadros, *Emulsions: Formation, Stability, Industrial Applications*, 1st ed. Berlin: De Gruyter, 2013.
- [38] W. Chantrapornchai, F. Clydesdale, and D. J. McClements, "Influence of Droplet Size and Concentration on the Color of Oil-in-Water Emulsions," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, no. 8, pp. 2914–2920, 1998.
- [39] W. Pflügl and U. M. Titulaer, "The droplet size distribution in the late stage of phase separation," *Phys. A Stat. Mech. its Appl.*, vol. 214, no. 1, pp. 52–67, Feb. 1995.
- [40] D. J. McClements and S. M. Jafari, "Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 251. Elsevier B.V., pp. 55–79, 01-Jan-2018.
- [41] Y. T. Hu, Y. Ting, J. Y. Hu, and S. C. Hsieh, "Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 25, no. 1. Elsevier Taiwan LLC, pp. 16–26, 01-Jan-2017.
- [42] O. A. Inozemtseva, T. A. Kolesnikova, D. A. Gorin, N. V. Shvyndina, and V. Y. Shklover, "Functionalization of direct-emulsion disperse-phase surface by zinc oxide nanoparticles using layer-by-layer electrostatic assembly," *Nanotechnologies Russ.*, vol. 6, no. 3–4, pp. 211–217, Apr. 2011.
- [43] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nature Methods*, vol. 9, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 671–675, 28-Jul-2012.
- [44] J. Schindelin *et al.*, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012.
- [45] W. Orciuch, Ł. Makowski, A. Moskal, and L. Gradoń, "Evolution of the droplet size distribution during a two-phase flow through a porous media: Population balance studies," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 68, no. 1, pp. 227–235, Jan. 2012.
- [46] M. Moradi, V. Alvarado, and S. Huzurbazar, "Effect of Salinity on Water-in-Crude Oil Emulsion: Evaluation through Drop-Size Distribution Proxy," *Energy Fuels*, vol. 25, pp. 260–268, 2011.
- [47] B. Balinov, O. Urdahl, O. Söderman, and J. Sjöblom, "Characterization of water-in-crude oil emulsions by the NMR self-diffusion technique," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 82, no. 2, pp. 173–181, Jan. 1994.
- [48] G. Carlucci, "Drop size distributions in stirred liquid/liquid systems Influence of the dispersed phase," Technische Universität Berlin, 2021.

- [49] V. Iyer *et al.*, "Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants," *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 11, no. 7, pp. 1853–1864, Jan. 2015.
- [50] F. Goodarzi and S. Zendejboudi, "A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries," *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 97, no. 1, pp. 281–309, Jan. 2019.
- [51] R. G. Laughlin and T. Procter, "HLB, from a thermodynamic perspective," *Cosmet. Chem*, vol. 32, pp. 371–392, 1981.
- [52] K. Shinoda and H. Arai, "The correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier," *J. Phys. Chem.*, vol. 68, no. 12, pp. 3485–3490, 1964.
- [53] D. J. McClements and C. E. Gumus, "Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 234, pp. 3–26, 2016.
- [54] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, and B. W. Ninham, "Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers," *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, vol. 72, p. 1525, 1976.
- [55] S. Abbott, *Surfactant science : Principles & Practice*. DEStech Publications, 2017.
- [56] K. C. Corin and C. T. O'Connor, "A proposal to use excess Gibbs energy rather than HLB number as an indicator of the hydrophilic–lipophilic behavior of surfactants," *Miner. Eng.*, vol. 58, pp. 17–21, Apr. 2014.
- [57] E. Chibowski and A. Szcześ, "Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme," *Adsorption*, vol. 22, no. 4, pp. 755–765, 2016.
- [58] K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima, and T. Kondo, "Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data," *Biophys. Chem.*, vol. 41, no. 2, pp. 175–183, 1991.
- [59] G. Urbina-Villalba, "An algorithm for emulsion stability simulations: Account of flocculation, coalescence, surfactant adsorption and the process of ostwald ripening," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 761–804, Mar. 2009.
- [60] T. Nii and F. Ishii, "Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 39, no. 1–2, pp. 57–63, 2004.

- [61] W. J. Souza *et al.*, "EFFECT OF WATER CONTENT, TEMPERATURE AND AVERAGE DROPLET SIZE ON THE SETTLING VELOCITY OF WATER-IN-OIL EMULSIONS," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 32, no. 2, pp. 455–464, Apr. 2015.
- [62] S. Maaß, N. Paul, and M. Kraume, "Influence of the dispersed phase fraction on experimental and predicted drop size distributions in breakage dominated stirred systems," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 76, pp. 140–153, Jul. 2012.
- [63] A. Håkansson, C. Trägårdh, and B. Bergenståhl, "Dynamic simulation of emulsion formation in a high pressure homogenizer," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 64, no. 12, pp. 2915–2925, Jun. 2009.
- [64] M. Placzek and M. Kosela, "Microscopic methods in analysis of submicron phospholipid dispersions," *Acta Pharm.*, vol. 66, no. 1, pp. 1–22, 2016.
- [65] D. K. Sarker, *Pharmaceutical emulsions: a drug developers toolbag*. Wiley-Blackwell, 2013.
- [66] G. Muschiolik and E. Dickinson, "Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 16, no. 3. Blackwell Publishing Inc., pp. 532–555, 01-May-2017.
- [67] J. C. Russ, *Image analysis of food microstructure*. CRC Press, 2004.
- [68] J. G. Delgado-Linares, A. A. A. Majid, E. D. Sloan, C. A. Koh, and A. K. Sum, "Model water-in-oil emulsions for gas hydrate studies in oil continuous systems," in *Energy and Fuels*, 2013, vol. 27, no. 8, pp. 4564–4573.
- [69] D. J. McClements, "Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 47, no. 7. pp. 611–649, Sep-2007.
- [70] G. Van Dalen, "Determination of the water droplet size distribution of fat spreads using confocal scanning laser microscopy," *J. Microsc.*, vol. 208, no. 2, pp. 116–133, Nov. 2002.
- [71] M. Instruments, "DYNAMIC LIGHT SCATTERING COMMON TERMS DEFINED," 2011.
- [72] "Disperse Systeme: Geometrische Eigenschaften," in *Lebensmittelphysik*, Springer-Verlag, 2006, pp. 59–86.
- [73] P. B. Kowalczyk and J. Drzymala, "Physical meaning of the Sauter mean diameter of spherical particulate matter," *Part. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 6, pp. 645–647, Nov. 2016.

- [74] G. T. Vladisavljević and H. Schubert, "Influence of process parameters on droplet size distribution in SPG membrane emulsification and stability of prepared emulsion droplets," *J. Memb. Sci.*, vol. 225, no. 1–2, pp. 15–23, Nov. 2003.
- [75] S. Unnikrishnan, J. Donovan, R. Macpherson, and D. Tormey, "In-process analysis of pharmaceutical emulsions using computer vision and artificial intelligence," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 166, pp. 281–294, Feb. 2021.
- [76] S. Unnikrishnan, J. Donovan, R. MacPherson, and D. Tormey, "An Integrated Histogram-Based Vision and Machine-Learning Classification Model for Industrial Emulsion Processing," *IEEE Trans. Ind. Informatics*, vol. 16, no. 9, pp. 5948–5955, Sep. 2020.
- [77] M. Yaghoobi, P. Zaheri, S. H. Mousavi, B. Arabi Ardehali, and T. Yousefi, "Evaluation of mean diameter and drop size distribution of an emulsion liquid membrane system in a horizontal mixer-settler," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 167, pp. 231–241, Mar. 2021.
- [78] P. Jokela, P. D. L. Fletcher, R. Aveyard, and J.-R. Lu, "The use of computerized microscopic image analysis to determine emulsion droplet size distributions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 134, no. 2, pp. 417–426, Feb. 1990.
- [79] M. S. Alhajeri, Z. Wu, D. Rincon, F. Albalawi, and P. D. Christofides, "Machine-learning-based state estimation and predictive control of nonlinear processes," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 167, pp. 268–280, Mar. 2021.
- [80] A. K, "Size-distribution of droplets in emulsions by statistical mechanics calculation," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 360, no. 1, pp. 256–261, Aug. 2011.
- [81] B. A. Lewis and D. M. Engelman, "Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles.," *J. Mol. Biol.*, vol. 166, no. 2, pp. 211–7, May 1983.
- [82] Z. V Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. E. S. Dahms, and D. T. Cramb, "Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy.," *Biophys. J.*, vol. 86, no. 6, pp. 3783–93, Jun. 2004.
- [83] S. Hénon and J. Meunier, "Microscope at the Brewster angle : Direct observation of firstorder phase transitions in monolayers Microscope at the Brewster transitions in monolayers angle : Direct observation of first-order," vol. 936, no. 1991, pp. 1–5, 1991.
- [84] D. Hoenig and D. Moebius, "Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy," *J. Phys. Chem.*, vol. 95, no. 12, pp. 4590–4592, 1991.

- [85] S. Härtel, M. L. Fanani, and B. Maggio, "Shape Transitions and Lattice Structuring of Ceramide-Enriched Domains Generated by Sphingomyelinase in Lipid Monolayers," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 1, pp. 287–304, 2005.
- [86] R Core Team. and R Development Core Team, "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria," *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. 2013.
- [87] C. B. Casper, D. Verreault, E. M. Adams, W. Hua, and H. C. Allen, "Surface Potential of DPPC Monolayers on Concentrated Aqueous Salt Solutions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 8, pp. 2043–2052, 2016.

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	14. Juni 1986
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Beruflicher Werdegang

Ab 11/21	Merz Pharma , Dessau Sachkundige Person
11/19 bis 10/21	Merz Pharma , Dessau Wissenschaftlicher Mitarbeiter Qualitätskontrolle
11/18 bis 10/19	Merz Pharma , Dessau Trainee Global Engineering
09/15 bis 08/18	IADP , Halle Promotionsstudent
07/15 bis 11/18	Vital Apotheke , Halle Apotheker
03/2015 bis 06/2015	Kupferberg Apotheke , Hettstedt Apotheker

Ausbildung

03/2015	Abschluss als Diplom-Pharmazeut (Note 2,2) Universität Halle-Wittenberg
10/2008 bis 10/2013	Studium der Pharmazie Universität Halle-Wittenberg Titel der Diplomarbeit: <i>„Charakterisierung von Asparagus officinalis Extrakten zur Nutzung in dermalen Formulierungen“</i> (Note 1,3) 1. Preis für die beste Diplomarbeit 2014/2015
10/2006 bis 10/2007	Studium der Mechatronik FH Merseburg
06/2005	Abitur (Note 2,1) Georg-Cantor Gymnasium, Halle

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, gemäß § 5 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultäten I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und inhaltlich oder wortwörtlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht

Ich habe bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen und diese Arbeit wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen in- oder ausländischen Fakultät zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Halle, den 09.01.2021

Felix Otto