

**Physikochemische Charakterisierung
von Gallensalz-Mischmizellen
als Grundlage für
innovative Arzneistoffträgersysteme**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplompharmazeutin Annegret Hildebrand
geb. am 21. Januar 1975 in Freiberg/Sa.

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. R. Neubert
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. A. Blume
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. R. Schubert

Freiberg/Sa., Mai 2002

verteidigt am 13.09.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004059

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004059>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie	3
2.1	Physiologische Bedeutung der Gallensalze	3
2.2	Substanzen	5
2.2.1	Gallensalze	5
2.2.2	Fettsäuren	6
2.2.3	Phospholipide	6
2.3	Selbstaggregation amphiphiler Moleküle	7
2.3.1	Vesikel	9
2.3.2	Mizellen	13
2.3.3	Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung	18
2.4	Pharmazeutische Relevanz der Mischmizellen	21
2.5	Messmethoden	23
2.5.1	Isotherme Titrationskalorimetrie	23
2.5.2	Differentialscanningkalorimetrie	24
2.5.3	Dynamische Lichtstreuung	25
2.5.4	Kleinwinkel-Neutronenstreuung	26
3	Ergebnisse und Diskussion	27
3.1	Gallensalz-Phospholipid-Gemische	27
3.1.1	Verteilung	27
3.1.1.1	Gallensalz-DPPC-Systeme	27
3.1.1.2	Gallensalz-DPPG-Systeme	32

3.1.1.3	Gallensalz-DPPC/DPPG-Systeme	34
3.1.1.4	Gallensalz-SPC-Systeme	35
3.1.1.5	Zusammenfassung	39
3.1.2	Solubilisierung	41
3.1.2.1	Gallensalz-DPPC-Systeme	41
3.1.2.2	Gallensalz-DPPG-Systeme	53
3.1.2.3	Gallensalz-DPPC/DPPG-Systeme	55
3.1.2.4	Gallensalz-SPC-Systeme	61
3.1.2.5	Zusammenfassung	65
3.2	Gallensalz/Fettsäure-Phospholipid-Gemische	68
3.2.1	Demizellisierung	68
3.2.1.1	Na-Oleat	68
3.2.1.2	Gallensalz/Na-Oleat-Gemische	72
3.2.1.3	Gallensalz/Na-Palmitat-Gemische	76
3.2.1.4	Zusammenfassung	79
3.2.2	Verteilung	81
3.2.2.1	Gallensalz/Na-Oleat-DPPC-Systeme	81
3.2.2.2	Gallensalz/Na-Palmitat-DPPC-Systeme	83
3.2.2.3	Zusammenfassung	84
3.2.3	Solubilisierung	85
3.2.3.1	Gallensalz/Na-Oleat-DPPC-Systeme	85
3.2.3.2	Gallensalz/Na-Palmitat-DPPC-Systeme	90
3.2.3.3	Zusammenfassung	94
4	Zusammenfassung	96
A	Methoden und Materialien	100
A.1	Isotherme Titrationskalorimetrie	100
A.1.1	Methode	100
A.1.2	Probenpräparation	102
A.1.2.1	Verteilungsexperimente	103
A.1.2.2	Solubilisierungsexperimente	103

A.1.2.3	Demizellisierungsexperimente	104
A.1.3	Versuchsdurchführung	105
A.1.3.1	Verteilungsexperimente	105
A.1.3.2	Solubilisierungsexperimente	105
A.1.3.3	Demizellisierungsexperimente	106
A.2	Differentialscanningkalorimetrie	106
A.2.1	Methode	106
A.2.2	Probenpräparation	107
A.2.3	Versuchsdurchführung	108
A.3	Dynamische Lichtstreuung	109
A.3.1	Methode	109
A.3.2	Probenpräparation	110
A.3.3	Versuchsdurchführung	111
A.4	Kleinwinkel-Neutronenstreuung	112
A.4.1	Methode	112
A.4.2	Probenpräparation	113
A.4.3	Versuchsdurchführung	113
A.5	Chemikalienverzeichnis	114
B	Thermodynamische Parameter	115
B.1	Na-Oleat	115
B.2	Gallensalz/Na-Oleat-Gemische	116
B.3	Gallensalz/Na-Palmitat-Gemische	119
	Literaturverzeichnis	I

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen:

Abb.:	Abbildung
CA:	Cholsäure
CFB:	Cell Feedback
CHAPS:	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonat
cryo-TEM:	cryo-Transmissionselektronenmikroskopie
CTAC:	Cetyltrimethylammoniumchlorid
DCA:	Desoxycholsäure
DLS:	Dynamische Lichtstreuung (D ynamic L ight S cattering)
DPPC:	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPG:	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol
DRM:	Detergens-resistente Membran (detergent resistant membrane)
DSC:	Differentialscanningkalorimetrie (D ifferential S canning C alorimetry)
EPC:	Ei-Phosphatidylcholin
ESR:	Elektronenspinresonanz
FS:	Fettsäure
GIT:	Gastrointestinaltrakt
Gl.:	Gleichung
GS:	Gallensalz
HCl:	Salzsäure
ITC:	Isotherme Titrationskalorimetrie (I sothermal T itration C alorimetry)
JFB:	Jacket Feedback
LLC:	lamellare Flüssigkristalle (lamellar liquid crystals)
LS:	Lichtstreuung
LUV:	große unilamellare Vesikel (l arge u nilamellar v esicles)
MM:	Mischmizellen
MLV:	multilamellare Vesikel
MV:	Mischvesikel
MVL:	multivesikuläre Liposomen
NaC:	Natrium-Cholat
NaCl:	Natriumchlorid
NaDC:	Natrium-Desoxycholat
NaO:	Natrium-Oleat
NaOH:	Natriumhydroxid
NaP:	Natrium-Palmitat
NG:	Nonylglucosid
NMR:	Kernresonanz-Spektroskopie (N uclear M agnetic R esonance)
OG:	Octylglucosid
OLV:	oligolamellare Vesikel
OTG:	Octylthioglucosid
PC:	Phosphatidylcholin
PL:	Phospholipid

POPC:	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
RO:	Reference Offset
RT:	Raumtemperatur
SANS:	Kleinwinkel-Neutronenstreuung (S mall A nge N eutron S cattering)
sat:	Sättigung
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SPC:	Soja-Phosphatidylcholin
sol:	Solubilisierung
SUV:	kleine unilamellare Vesikel (s mall u nilamellar v esicles)
Tab.:	Tabelle
ULV:	unilamellare Vesikel

Symbole:

A :	Querschnittsoberfläche der Kopfgruppe von Amphiphilen
A_D :	mittlere Moleküloberfläche eines Detergenzmoleküls
A_L :	mittlere Moleküloberfläche eines Lipidmoleküls
a :	große Halbachse der Ellipsoide
α :	Molenbruch des GS im Detergengemisch
b :	kleine Halbachse der Ellipsoide
β :	Gegenionenbindungsgrad
β_W :	Wechselwirkungsparameter
cmc :	kritische Mizellbildungskonzentration (c ritical m icellisation c oncentration)
cmc_{GS} :	kritische Mizellbildungskonzentration von GS
cmc_{mix} :	kritische Mizellbildungskonzentration des Detergengemisches
cmc_{NaO} :	kritische Mizellbildungskonzentration von NaO
cm_t :	kritische Mizellbildungstemperatur (c ritical m icellisation t emperature)
C_p :	Wärmekapazität bei konstantem Druck p
ΔC_p^{demic} :	Änderung der Wärmekapazität der Demizellisierung bei konstantem Druck p
ΔC_p^{mic} :	Änderung der Wärmekapazität der Mizellisierung bei konstantem Druck p
c_{el} :	Elektrolytkonzentration
D_0 :	wechselwirkungsfreier Diffusionskoeffizient
D_{app} :	scheinbarer (apparenter) Diffusionskoeffizient
D_b :	Aggregat-gebundene Detergenkonzentration
D_t :	totale Detergenkonzentration
$D_t^\#$:	Detergenkonzentration für die Phasengrenze
D_t^{sat} :	Detergenkonzentration für die Sättigungsphasengrenze
D_t^{sol} :	Detergenkonzentration für die Solubilisierungsphasengrenze
D_w :	freie Detergenkonzentration in der wässrigen Phase
D_{wbulk} :	Bulkkonzentration des Detergens
D_w^{sat} :	Detergenkonzentration für den Ordinatenschnittpunkt der Sättigungsphasengrenze
D_w^{sol} :	Detergenkonzentration für den Ordinatenschnittpunkt der Solubilisierungsphasengrenze

d_a :	Membrandicke in Richtung der großen Halbachse der Vesikel
d_b :	Membrandicke in Richtung der kleinen Halbachse der Vesikel
E :	elektrische Feldstärke
E_A :	Aktivierungsenergie
e_0 :	Elementarladung
ϵ :	Exzentrizität
ϵ_0 :	elektrische Feldkonstante
ϵ_r :	Dielektrizitätszahl
η :	Viskosität
f_{GS} :	Aktivitätskoeffizient des GS
f_{NaO} :	Aktivitätskoeffizient des NaO
ΔG_{demic} :	Änderung der Freien Enthalpie der Demizellisierung
ΔG_{mic} :	Änderung der Freien Enthalpie der Mizellisierung
$g_1(\tau)$:	Autokorrelationsfunktion der elektrischen Feldstärke
$g_2(\tau)$:	Autokorrelationsfunktion der Streuintensität
ΔH :	Änderung der Enthalpie
ΔH_{demic} :	Änderung der Demizellisierungsenthalpie
ΔH_{mic} :	Änderung der Mizellisierungsenthalpie
ΔH_{dil} :	Änderung der Verdünnungswärme
ΔH^T :	Änderung der Transferenthalpie
$\Delta H_{GS}^{mic \rightarrow mm}$:	Änderung der Transferenthalpie für GS aus Mizellen in MM
$\Delta H_{GS}^{mic \rightarrow ves}$:	Änderung der Transferenthalpie für GS aus Mizellen in Vesikel
$\Delta H_{PL}^{mic \rightarrow ves}$:	Änderung der Transferenthalpie für PL aus Mizellen in Vesikel
I :	Streuintensität
K :	Gleichgewichtskonstante
k :	Geschwindigkeitskonstante
k_B :	BOLTZMANN-Konstante
L :	Lipidkonzentration
L_{syr} :	Lipidkonzentration in der Injektionsspritze (syr: syringe)
L_α :	flüssigkristalline Phase
L_β :	Gelphase
L_c :	kristalline Phase
l :	Länge des lipophilen Molekülteils von Amphiphilen
l_G :	Gesamtlänge von Stäbchenmizellen
l_P :	Persistenzlänge von Stäbchenmizellen
λ :	Wellenlänge
M_r :	relative molare Masse
μ :	chemisches Potential
n_A :	Aggregationszahl
n_S :	Stöchiometriezahl
n :	Stoffmenge
PP:	Packungsparameter von Amphiphilen
P :	Verteilungskoeffizient
P_0 :	intrinsischer Verteilungskoeffizient
P_{av} :	mittlerer Verteilungskoeffizient
p :	Druck

$P_{\beta'}$:	Ripple-Phase
ψ_0 :	Oberflächenpotential
Q :	Reaktionswärme
q :	Streuvektor
R :	Gaskonstante
R_e :	effektives molares Detergens/Lipid-Verhältnis
R_e^{sat} :	effektives molares Detergens/Lipid-Verhältnis für die Sättigungsphasengrenze
R_e^{sol} :	effektives molares Detergens/Lipid-Verhältnis für die Solubilisierungsphasengrenze
R_h :	hydrodynamischer Radius
r :	Radius
ρ :	Nichtidealitätsparameter
ΔS_{demic} :	Änderung der Demizellierungsentropie
ΔS_{mic} :	Änderung der Mizellierungsentropie
σ :	Oberflächenladungsdichte
T :	Temperatur
T_m :	Hauptphasenumwandlungstemperatur
T_p :	Vorumwandlungstemperatur
T_s :	Subumwandlungstemperatur
$t_{1/2}$:	Halbwertszeit
Θ :	Streuwinkel
τ :	Zeitintervall
V :	Volumen des lipophilen Molekülteils von Amphiphilen
$V_{spezif.}$:	spezifisches Volumen
v_{inj} :	Injektionsvolumen
W :	molare Wasserkonzentration
x_b :	Molenbruch des gebundenen Detergens
x_{GS} :	Molenbruch des GS in den Mischmizellen
x_m :	Molenbruch des gebundenen Detergens in den Mischmizellen
x^{sat} :	Molenbruch des Detergens für die Sättigungsphasengrenze
x^{sol} :	Molenbruch des Detergens für die Solubilisierungsphasengrenze
x_w :	Molenbruch des freien Detergens in der wässrigen Phase
z :	elektrische Ladungszahl

Kapitel 1

Einleitung

Die bedeutenden Fortschritte in der Entwicklung hochpotenter Wirkstoffe erfordern die Optimierung vorhandener und die Kreation neuer Arzneistoffträgersysteme. Das Ziel der galenischen Forschung besteht in der Bereitstellung von gut verträglichen Formulierungen mit hoher Bioverfügbarkeit, minimaler Toxizität und geringen Nebenwirkungen.

Die Verwendung von kolloidalen Vehikelsystemen auf der Basis physiologisch relevanter Substanzen bietet dafür einen entscheidenden Ansatzpunkt. Zunehmendes Interesse richtet sich vor allem auf Liposomen und Gallensalz-Mischmizellen. Dabei dient die Funktion dieser Aggregate als Transportsysteme bei der Verdauung von Nahrungsfetten im menschlichen Organismus als Vorbild. Der Einsatz solcher Aggregate als Arzneistoffträger ist besonders für lipophile, schlecht wasserlösliche Wirkstoffe und auch durch die Einschlußmöglichkeiten in kolloidalen Strukturen für Problemarzneistoffe geeignet.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Gallensalz-Lipid-Wechselwirkungen und der damit verbundenen kolloidalen Systeme sowie die Charakterisierung der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung und der dabei auftretenden Aggregate, Vesikel und Mischmizellen, hinsichtlich Art, Größe und Struktur. Die Realisierung der physikochemischen Studien erfolgt mit einer Kombination von thermodynamischen Verfahren, der Isothermen Titrationskalorimetrie und der Differentialscanningkalorimetrie, und optischen Streumethoden, der Dynamischen Lichtstreuung und der Kleinwinkel-Neutronenstreuung.

Der erste Teil der Untersuchungen beschäftigt sich mit binären Mischungen von Gallensalzen und Phospholipiden. Dazu werden das primäre Gallensalz Natrium-Cholat bzw. das sekundäre Gallensalz Natrium-Desoxychololat eingesetzt. Die Phospholipid-Komponenten synthetischen Ursprungs mit gesättigten Alkylketten umfassen ein zwitterionisches Phosphatidylcholin und zur Ermittlung des Ladungseinflusses ein negativ geladenes Phosphatidylglycerol sowie Mischungen der beiden Lipide. Weiterhin wird das natürlich vorkommende, pharmazeutisch relevante Soja-Lecithin mit ungesättigten Alkylketten verwendet.

Die durchgeführten Verteilungsstudien ermöglichen die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten und der thermodynamischen Parameter des Transfers von Gallensalzmolekülen aus der wässrigen in die Lipidphase. Die Solubilisierungsstudien dienen der Beschreibung der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet Untersuchungen an ternären Mischungen von Gallensalzen, Phospholipiden und Fettsäure-Salzen, den Natriumsalzen der Öl- und der Palmitinsäure. Die Basis für die Charakterisierung der ternären Systeme bilden Kenntnisse über die Mizellbildung der einzelnen Detergentien und der Detergensgemische mit den Gallensalzen und den Fettsäure-Salzen, die aus den entsprechenden Experimenten erhalten werden. Die Verteilungs- und Solubilisierungsstudien liefern Informationen über die Wechselwirkungen in diesen ternären Gemischen.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die biophysikalisch-biochemische Natur der Gallensalz-Lipid-Wechselwirkungen zu gewinnen, das Verständnis der physiologischen Prozesse bei der Verdauung der Nahrungslipide zu erleichtern und grundsätzliche Erkenntnisse für die Entwicklung innovativer Arzneistoffträgersysteme im kolloidalen Größenbereich, so z.B. im Hinblick auf den gezielten Wirkstofftransport im Organismus, das sogenannte „drug targeting“, zu ermitteln.

Kapitel 2

Theorie

2.1 Physiologische Bedeutung der Gallensalze

Die Hauptaufgabe des Gastrointestinaltraktes (GIT) besteht in der Resorption von Nahrungsbestandteilen [1,2]. Mit einem Anteil von ca. 40% ist Fett die wichtigste Energiequelle des menschlichen Körpers [3], die sich größtenteils aus Triglyceriden und geringen Mengen Phospholipiden, Cholesterol und dessen Estern, pflanzlichen Sterolen und Vitaminen zusammensetzt [4].

Erste Untersuchungen zur Fettverdauung wurden 1849 von BERNARD durchgeführt [5]. Der Verdauungsprozess wird in die luminale und die mucosale Phase eingeteilt. Erstere beinhaltet die mechanische Dispergierung und Bildung einer feinen Emulsion, die enzymatische Esterhydrolyse (Lipolyse) und die Solubilisierung der Lipide (Abb. 2.1) [2]. Die mucosale Phase umfasst die Passage der zwei Resorptionsbarrieren, der 100-700 μm dicken „unbewegten Wasserschicht“ und der Mucosa, sowie die Resorption der Spaltprodukte in das Blut- bzw. Lymphsystem.

Durch die mechanische Dispergierung gelangt eine feine Emulsion mit einem Tröpfchendurchmesser von ca. 0,5 μm in das Duodenum [6], wo eine Mischung mit Pankreas-, Gallen- und Dünndarmflüssigkeiten stattfindet [4]. Die Freisetzung von Gallenflüssigkeit sowie die Lipase/Colipase-, Phospholipase A₂- und Cholesterolesterase-Sekretion werden durch das Hormon Cholecystokinin-Pankreozymin induziert.

Die Gallenflüssigkeit, von der täglich 600-800 ml sezerniert werden, besteht aus ca. 84% Wasser, 11% Gallensäuren, 3% Phospholipiden, 1% Cholesterol und weiteren Komponenten, z.B. Bilirubin, Proteinen und Ionen [7, 8]. Der Gallensäure-Pool des Menschen enthält 3-5 g, die 6-10 mal täglich im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren. Die geringe Gallensäureexkretion (0,5 g/Tag) wird durch De-novo-Synthese aus Cholesterol

in den Hepatozyten ausgeglichen [9]. Dort erfolgt die Bildung der primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure. Die Coenzym-A-Thioester werden durch eine mikrosomale Cholyl-Coenzym-A-Glycin-Taurin-Aminotransferase zu Taurin- oder Glycin-konjugaten verknüpft. Es existieren auch geringe Mengen an Glucuron- bzw. Schwefelsäurekonjugaten. Insgesamt liegen 70-80% der Gallensäuren als Konjugate vor [10]. Im Dünndarm entstehen die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithocholsäure unter Mitwirkung einer bakteriellen 7α -Dehydroxylase [11,12]. Die Gallensäuren kommen im Duodenum in Form der Na^+ -Salze in einer Konzentration von 7-20 mM vor.

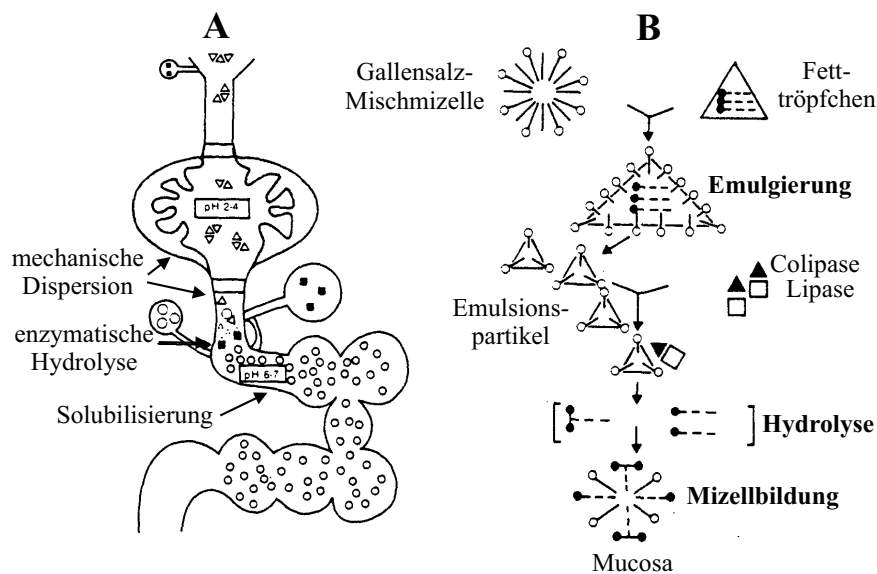


Abb. 2.1: Verdauungsprozesse im Gastrointestinaltrakt: Dispersion, Hydrolyse und Solubilisierung der Nahrungsfette [4]

Die Gallensalze (GS) bilden mit der Colipase und Ca^{2+} -Ionen einen Komplex, der an die Emulsionströpfchen bindet und den Angriff der Lipase an der *sn*-1- und *sn*-3-Position der Triglyceride ermöglicht [13]. Dabei werden Fettsäuren und 2-Monoacylglyceride erzeugt. Die Phospholipase A_2 spaltet Phospholipide an der *sn*-2-Position in Fettsäuren und Lyso-Phospholipide. Die Cholesterolesterase erzeugt Fettsäuren und Cholesterol [2].

Die Spaltprodukte der Lipolyse werden anschließend durch die Gallensalze unter Bildung von Mischmizellen solubilisiert, die als Transportvehikel für die Passage der „unbewegten Wasserschicht“ und der Mucosa dienen [14]. Die „unbewegte Wasserschicht“, die die Mucosa vor der Zerstörung durch Gallensalz-bedingte Membransolubilisierung schützt [15], ist durch ein saures Mikroklima gekennzeichnet, das die Dissoziation der Mischmizellen und somit die Freigabe der Fettspaltprodukte zur Resorption bewirkt [2]. Während für langkettige Fettsäuren, Sterole und Monoglyceride die „unbewegte Wasserschicht“ die Hauptbarriere darstellt, ist für kurz- und mittelkettige Fettsäuren die Mucosamembran das limitierende Hindernis [16].

Die besser löslichen kurz- und mittelkettigen Verbindungen werden größtenteils bereits aus dem Magen resorbiert und gelangen Albumin-gebunden über den Pfortaderweg zur Leber [14]. Die langkettigen Säuren hingegen werden im Jejunum mit Hilfe von Fettsäurebindenden Proteinen [17, 18] wegen eines Na^+ -Gradienten aktiv resorbiert [19]. Auch für Sterole und Phospholipide wurden im Jejunum Carrierproteine ermittelt [19–21].

Die GS werden in Monomerform rückresorbiert und dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt. Dieser wurde für die GS 1870 von SCHIFF entdeckt [22]. Während die Resorption der Fettspaltprodukte im Jejunum abgeschlossen ist, erfolgt die aktive Rückresorption der freien und konjugierten GS erst im terminalen Ileum [23]. Konjugierte GS können aufgrund ihrer niedrigen pK_a -Werte (2-4) und des Vorliegens in protonierter Form nur aktiv absorbiert werden. Dafür existieren verschiedene GS-Transportsysteme: Na^+ -abhängige Transporter für monovalente GS bzw. für divalente sulfatierte und glucuronidierte GS und Na^+ -unabhängige multispezifische Transporter für organische Anionen [24–26]. Im gesamten Dünndarm bis hin zum Kolon werden die freien GS wegen ihrer höheren pK_a -Werte (5-6) zusätzlich durch passive Transportprozesse rückresorbiert.

2.2 Substanzen

2.2.1 Gallensalze

Die zur Gruppe der Steroide gehörenden Gallensäuren besitzen als C-24-Carbonsäuren ein gesättigtes Cyclopentanophenanthren-Grundgerüst. Die Ringe A/B sind *cis*-verknüpft, die Ringe B/C und C/D weisen eine *trans*-Verknüpfung auf. Daraus ergibt sich die Zugehörigkeit zur Klasse der 5β -Cholestane [27]. Es handelt sich um Hydroxyderivate der nicht natürlich vorkommenden Cholansäure mit ein bis drei Hydroxylgruppen an den Positionen C-3, C-7 bzw. C-12. Die beiden Methylgruppen an C-10 und C-13 sowie die Seitenkette an C-17 sind β -ständig [28].

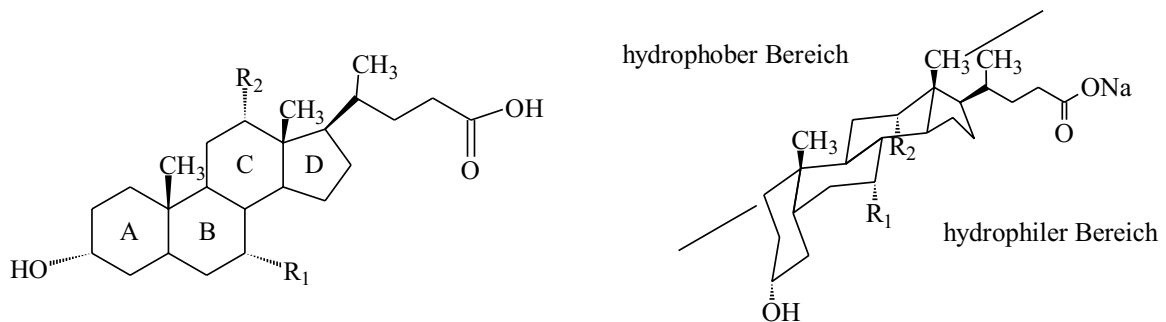


Abb. 2.2: Strukturformel der Gallensalze (links) und Darstellung mit hydrophobem und hydrophilem Molekülbereich (rechts); (NaC): $R_1 = R_2 = \text{OH}$, NaDC: $R_1 = \text{H}$ und $R_2 = \text{OH}$ [29]

Die Abb. 2.2 zeigt die Strukturformeln der hier verwendeten Na^+ -Salze von Cholsäure ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihydroxy- 5β -cholan-24-säure; CA) bzw. von Desoxycholsäure ($3\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy- 5β -cholan-24-säure; DCA), Na^+ -Cholat (NaC) und Na^+ -Desoxycholat (NaDC).

2.2.2 Fettsäuren

Langkettige, unverzweigte Carbonsäuren kommen in der Natur ubiquitär als Bestandteile von Fetten, Ölen und Wachsen vor und werden als Fettsäuren (FS) bezeichnet [30]. Es erfolgt eine Unterteilung in gesättigte FS mit *all-trans*-Konfiguration und ungesättigte FS mit *cis*-ständigen Doppelbindungen. In dieser Arbeit wurden die Na^+ -Salze der gesättigten Palmitinsäure mit 16 C-Atomen (Hexadecansäure: $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$), Na-Palmitat (NaP), und der einfach ungesättigten Ölsäure mit 18 C-Atomen und einer Doppelbindung an C-9 (*Z*-9-Octadecensäure: $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$), Na-Oleat (NaO), eingesetzt (Abb. 2.3).



Abb. 2.3: Strukturformeln der Fettsäure-Salze Na-Palmitat und Na-Oleat

2.2.3 Phospholipide

Die Phospholipide (PL) werden in Glycero- und Sphingo-PL unterteilt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Glycero-PL verwendet. Dabei handelt es sich um Derivate der *sn*-Glycero-3-phosphatidsäure. Die *sn*-3-Position des Glycerols ist mit Phosphorsäure und diese wiederum mit einer organischen Base, einer Aminosäure oder einem Alkohol verestert, woraus sich die unterschiedlichen PL-Klassen ergeben, z.B. Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -serin, -glycerol oder -inositol [31].

Die Positionen *sn*-1 und *sn*-2 sind über Ester- oder Etherbindungen mit Fettsäuren verknüpft. Das am häufigsten in der Natur vorkommende PL ist das zwitterionische Phosphatidylcholin (PC), auch als Lecithin bezeichnet. Es wird aus Eigelb oder Sojabohnen isoliert und enthält eine Mischung von gesättigten FS (z.B. Palmitinsäure), bevorzugt an *sn*-1, und ungesättigten FS (z.B. Ölsäure), meist an *sn*-2. Das Soja-Lecithin (SPC), das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist im Vergleich zum Ei-Lecithin (EPC) in stärkerem Maße ungesättigt.

Weiterhin kam das gesättigte 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC) mit zwei C-16-Alkylketten zum Einsatz, das z.B. in den Alveolarbläschen der Lunge vorkommt. Untersuchungen erfolgten ebenfalls mit dem gesättigten, negativ geladenen

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG), das hauptsächlich in Chloroplastenmembranen höherer Pflanzen und in Zellmembranen grampositiver Bakterien zu finden ist [32]. Die hier benutzten Dipalmitoylverbindungen (Abb. 2.4) sind synthetischen Ursprungs.

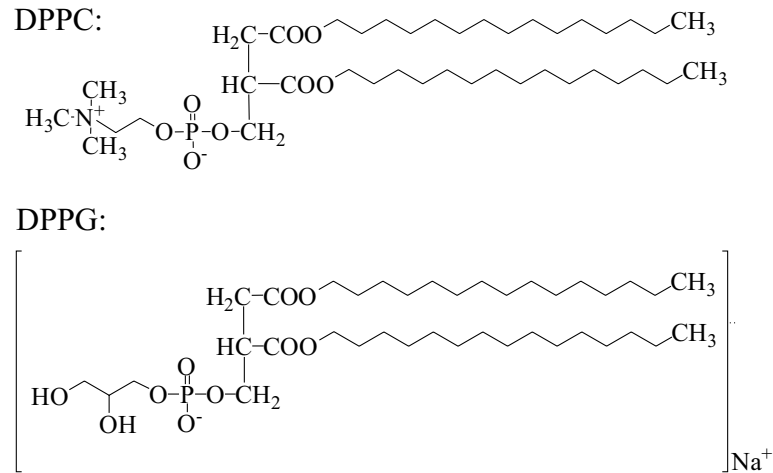


Abb. 2.4: Strukturformeln der Phospholipide DPPC und DPPG

2.3 Selbstaggregation amphiphiler Moleküle

Die Einteilung der heterogenen Stoffklasse der Lipide wurde von SMALL [33, 34] und CAREY [35] vorgenommen und ist in Abb. 2.5 zusammengefasst. Eine besondere Bedeutung kommt den Amphiphilen zu. Der aus dem Griechischen stammende Begriff „amphiphil“ steht nach HARTLEY [36] für Substanzen, die sowohl lipophile Kohlenwasserstoffstrukturen als auch polare, hydrophile Teile ionischen oder nichtionischen Charakters besitzen [37].

Der Transfer von Lipidmolekülen in ein wässriges Medium führt zu einer energetisch ungünstigen Entropieabnahme und einer positiven Enthalpie [38]. Das Lösungsmittel Wasser, welches ein molekulares Netzwerk mit Tetraederstruktur bildet, wird in der Umgebung der Lipidmoleküle zu einer Umorientierung mit einer geringstmöglichen Einbuße an Wasserstoffbrückenbindungen gezwungen [39]. Die treibende Kraft der Selbstaggregation ist bei Raumtemperatur der Entropiegewinn als dominante Größe der Freien Enthalpie, da die Enthalpie nahe null ist. Bei höheren Temperaturen hingegen tritt der Enthalpieterm in den Vordergrund [40]. Dieses Phänomen wird als „hydrophober Effekt“ bezeichnet [41].

Amphiphile Moleküle richten sich in wässriger Umgebung an der Wasser-Luft-Grenzfläche aus (Abb. 2.6), um dieser Entropieabnahme entgegenzuwirken [41]. Die Anreicherung der amphiphilen Moleküle an der Grenzfläche führt zu einer maximalen Packungsdichte und der Ausbildung von Monoschichten.

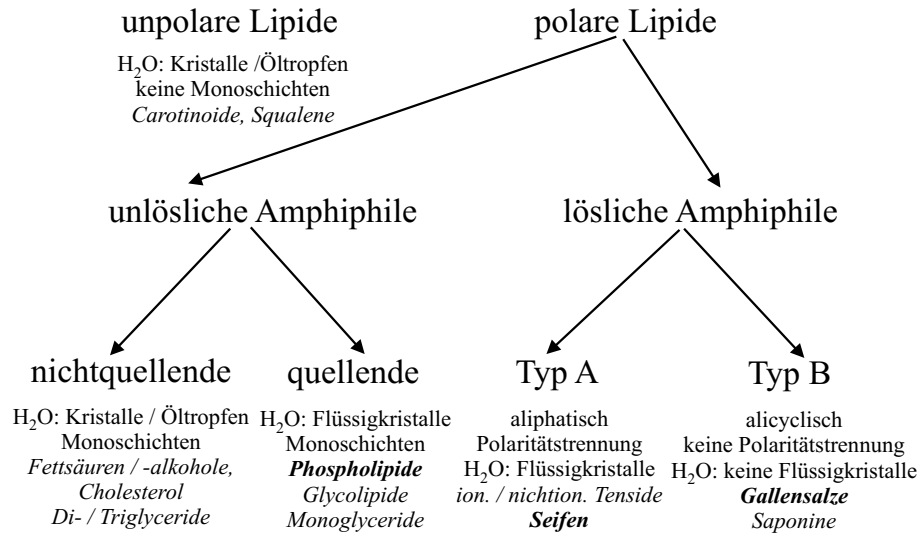


Abb. 2.5: Einteilung von Lipiden; hervorgehoben - in dieser Arbeit verwendete Amphiphile [34]

Die weitere Erhöhung über eine für jedes Amphiphil charakteristische Konzentration hinaus bedingt dessen Selbstaggregation [42]. Die treibende Kraft ist ein Minimum an Freier Energie, das durch die Abschirmung der hydrophoben Molekülstrukturen der amphiphilen Moleküle vom Wasser zustande kommt. Dabei treten entgegengesetzt wirkende Kräfte mit unterschiedlichen Reichweiten auf: van der Waals-Anziehung ($\sim 150 \text{ \AA}$) und elektrostatische Abstoßung ($\sim 25 \text{ \AA}$) sowie hydrophile, abstoßende ($\sim 30 \text{ \AA}$) und hydrophobe, anziehende ($\sim 60 \text{ \AA}$) Solvatationskräfte [43].

Die wichtigsten, durch Selbstaggregation gebildeten Assoziat sind Vesikel (Abschnitt 2.3.1) und Mizellen (Abschnitt 2.3.2). Demzufolge werden Membran- und Mizell-bildende Amphiphile unterschieden.

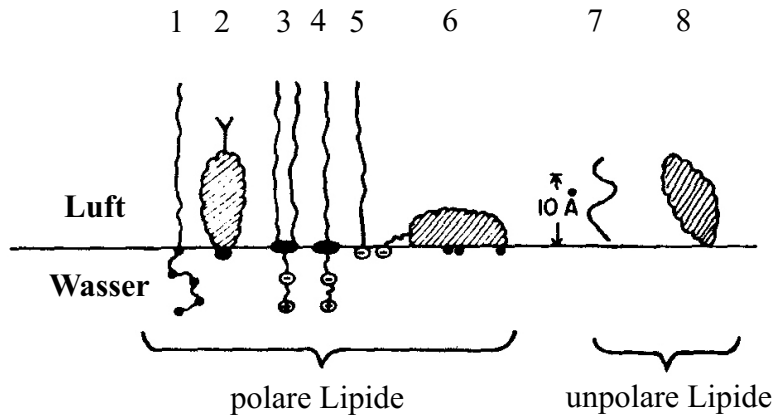


Abb. 2.6: Anordnung polarer (1-6) und unpolarer (7,8) Lipidmoleküle an der Wasser-Luft-Grenzfläche: 1) nichtionische, polare Lipide, 2) Cholesterol, 3) Phospholipide, 4) Lyso-Phospholipide, 5) ionische, polare Lipide, 6) Gallensalze, 7) aliphatische Lipide, z.B. *n*-Octadecan, 8) alicyclische Lipide, z.B. Cholestan [35]

Die Aggregatstruktur wird durch die folgenden geometrischen Kenngrößen des Moleküls bestimmt: Volumen V und Länge l des lipophilen Molekülteils sowie Querschnittsoberfläche A der hydrophilen Kopfgruppe. Nach ISRAELACHVILI [44] erfolgt die Zusammenfassung unter dem Begriff Packungsparameter PP :

$$PP = \frac{V}{A \cdot l} \quad (2.1)$$

Die Packungsgeometrie ist von den molekularen Eigenschaften und der damit verbundenen spontanen Krümmung abhängig [45]. Die Mizell-bildenden Amphiphile sind durch relativ voluminöse Kopfgruppen im Verhältnis zum lipophilen Molekülteil gekennzeichnet.

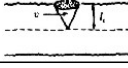

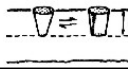



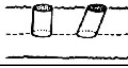
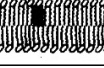
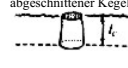

Packungsparameter	Packungsform	Aggregatstruktur
$PP < 1/3$	Kegel 	sphärische Mizellen 
$1/3 < PP < 1/2$	abgeschnittener Kegel 	zylindrische Mizellen 
$1/2 < PP < 1$	abgeschnittener Kegel 	flexible Bilayer Vesikel 
$PP \sim 1$	Zylinder 	planare Bilayer 
$PP > 1$	umgekehrter abgeschnittener Kegel 	inverse Mizellen 

Abb. 2.7: Packungsparameter mit kritischer Packungsform und resultierender Aggregatstruktur nach ISRAELACHVILI [46]

Sie ergeben sphärische oder zylindrische Aggregate mit kleinen Krümmungsradien. Die Membran-bildenden Amphiphile hingegen haben für die Mizellbildung zu kleine Kopfgruppen. Es entstehen planare Doppelschichten, die sich zur Vermeidung von energetisch ungünstigen Kanten zu Vesikeln mit großen Krümmungsradien formieren. Bei Amphiphilen mit ionischen Gruppen wird die Aggregation zusätzlich durch die Ladung beeinflusst [47].

2.3.1 Vesikel

Phospholipide gehören zur Gruppe der unlöslichen, quellenden Amphiphile (Abb. 2.5). Sie sind in Wasser mit einer cmc im 10^{-10} M-Bereich fast nicht löslich, können es aber in begrenztem Umfang durch Quellung aufnehmen. Die Selbstaggregation von PL in der wässrigen Phase führt zur Ausbildung von Vesikeln [30], die auch als Liposomen bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um konzentrisch angeordnete, geschlossene, lamellare PL-Doppelschichten mit unterschiedlicher Größe und Lamellenzahl sowie einem wässrigen Innenraum. Auf dieser Grundlage erbrachte die Klassifizierung von Vesikeln durch die „New York Academy of Science“ (1970) die drei in der Abb. 2.8 B gezeigten Liposomentypen [48], die Größen im Bereich von wenigen nm bis zu einigen μm aufweisen. Die Aggregate differieren hinsichtlich ihrer spontanen Krümmung, der Bindungsstarrheit und des Einschlussvolumens [49]. Die Liposomentypen besitzen folgende Charakteristika [50]:

- SUV „kleine unilamellare Vesikel“
eine Doppelschicht, $\varnothing = 20\text{-}50\text{ nm}$, große Krümmung, metastabiler Zustand
- LUV „große unilamellare Vesikel“
eine Doppelschicht, $\varnothing = 50\text{-}>10000\text{ nm}$, kleine Krümmung, stabiler Zustand
- MLV „multilamellare Vesikel“
einige-viele Doppelschichten, $\varnothing - >10000\text{ nm}$, stabiler Zustand

Die MLV mit wenigen Doppelschichten werden in der Literatur z.T. auch als „oligo-lamellare Vesikel“ (OLV) bezeichnet. Der Zusammenschluss von mehreren Vesikeln ergibt „multivesikuläre Liposomen“ (MVL). Die Dicke der Lipiddoppelschichten beträgt etwa 5 nm, die des H₂O-haltigen Interlamellarraumes ca. 10 nm [51].

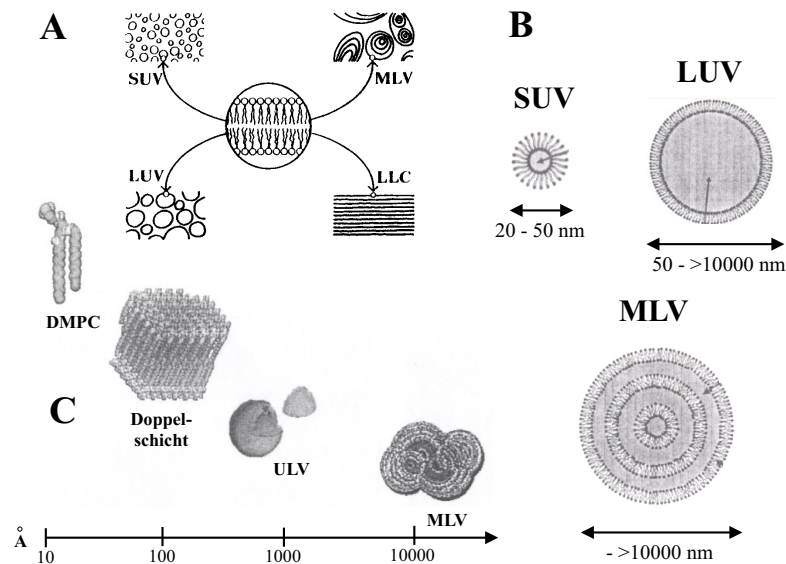


Abb. 2.8: A) Aggregation von PL-Doppelschichten in SUV, LUV, MLV, LLC (lamellare Flüssigkristalle) [32]; B) Darstellung von SUV, LUV und MLV mit Größenangaben [50]; C) Größenverhältnisse vom PL-Einzelmolekül über Doppelschichten und ULV (unilamellare Vesikel) bis zu MLV in Å [32]

Glycero- und Sphingo-PL sind die Hauptkomponenten von Biomembranen. Die Doppelschichten sind mit stärker hydrophoben integralen (intrinsischen) und stärker hydrophilen peripheren (extrinsischen) Proteinen assoziiert, die in der Regel eine α -Helix-Struktur haben. Die Membranproteine sind so angeordnet, dass eine minimale Deformation der Membran resultiert [50]. Das „Fluid-Mosaik“-Membranmodell nach SINGER und NICOLSON [52] beschreibt die Struktur von Biomembranen. Die sich im flüssigkristallinen Zustand befindlichen PL-Doppelschichten besitzen eine unterschiedliche Zusammensetzung und Fluidität. So erfordert die unmittelbare Umgebung der Proteine eine spezielle Konfiguration und Mobilität der Lipidmoleküle [53]. Die äußere und die innere Monoschicht variie-

ren in der Zusammensetzung hinsichtlich der Art der PL-Kopfgruppen und -Alkylketten und bedingen dadurch eine Membranasymmetrie [54]. Häufig sind Zuckerstrukturen an die Lipid- und Proteinkomponenten von Biomembranen gebunden, um molekulare Erkennungsprozesse durch diese Glycolipide und -proteine zu ermöglichen. Die Verwendung von PL-Vesikeln als Membranmodelle wurde erstmals 1968 von BANGHAM [55] beschrieben.

Eine besondere Eigenschaft von PL ist das Auftreten von thermotroper und lyotroper Mesomorphie. Der Übergang aus der kristallinen in die flüssige Phase findet nicht direkt statt, sondern durchläuft verschiedene Temperatur- bzw. Lösungsmittel-induzierte Zwischenzustände, die Mesophasen. Diese weisen eine Kombination von Eigenschaften der Kristalle und der Flüssigkeiten, Gitterordnung und Fließfähigkeit, auf und werden deshalb nach LEHMANN seit Beginn des 20. Jahrhunderts als „Flüssigkristalle“ bezeichnet [56,57].

An dieser Stelle wird nur auf die für die Untersuchungen wichtigen lyotropen Mesophasen eingegangen, deren Nomenklatur von LUZATTI geprägt wurde [58]: L – lamellar, H – hexagonal und Q – kubisch, I – normale Phasen und II – inverse Phasen, c – kristallin, β – gelartig und α – flüssigartig. Zur Erläuterung des thermischen Phasenverhaltens der PL dient DPPC als Beispiel. Dieses PL bildet bei einem H₂O-Gehalt von 15-45% bevorzugt lamellare Phasen. Das Phasenverhalten wird durch Eigenschaften der Alkylketten wie Länge, Sättigungsgrad und Asymmetrie, der Kopfgruppen wie Polarität, Größe und Protonierungsgrad sowie durch Änderungen von Temperatur, Druck, pH-Wert, Elektrolytkonzentration und Hydratation beeinflusst [58]. Die Phasenumwandlungen in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Wassergehalt, die erstmals 1967 von CHAPMAN et al. [30] kalorimetrisch untersucht wurden, sind in den Abb. 2.9 und 2.10 dargestellt.

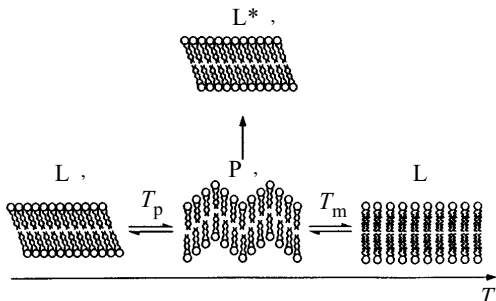


Abb. 2.9: Lyotrope Mesomorphie der Phospholipide: Vor- und Hauptphasenumwandlung [32]

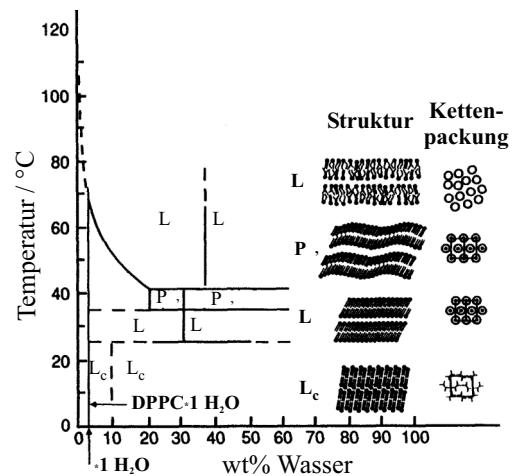


Abb. 2.10: DPPC-Phasendiagramm mit der Abhängigkeit von Temperatur und Wassergehalt [58]

Unterhalb der Subumwandlungstemperatur $T_s = 25^\circ\text{C}$ liegt DPPC in der kristallinen, lamellaren Phase L_c vor. Es handelt sich hierbei um echte Kristalle mit hoher Nah- und Fernordnung [31]. Bei T_s findet die Transformation in die Gelphase $L_{\beta'}$ statt. Diese ist durch stärker hydratisierte Lipidmoleküle und eine beschleunigte Alkylkettenrotation gekennzeichnet. Der Index „ ‘ “ ist für geneigte Alkylketten. Durch die Neigung entsteht mehr Platz für die Kopfgruppen, wodurch einer Packungsfehlpassung entgegengewirkt wird. Diese Umwandlung gehört nach LAGGNER und KRIECHBAUM [59] zu den homologen Phasenumwandlungen, bei denen sich unter Beibehaltung der Symmetrie nur die Gitterdimensionen ändern. Bei $T_p = 36^\circ\text{C}$ erfolgt die Vorumwandlung in die gerippte, nicht geneigte $P_{\beta'}$ -Phase. Diese Rippelstruktur steigert die Kopfgruppenfluidität unter Erhalt der Kettenordnung und zeichnet sich durch eine beschleunigte Kopfgruppenrotation aus. Diese Phase tritt nur bei PL mit hydrophilen, hydratisierten Kopfgruppen (z.B. PC und PG) und Alkylketten mit 12-22 C-Atomen auf [58]. Schließlich kommt es bei $T_m = 41,4^\circ\text{C}$ zur Hauptphasenumwandlung, dem „Kettenschmelzen“. Bei dieser heterologen Umwandlung mit einer Änderung von Symmetrie und Gitterdimension [59] entsteht die flüssigkristalline L_α -Phase mit in den Monoschichten frei beweglichen Molekülen [60]. Dieser Vorgang wird durch *trans-gauche*-Isomerisierungen, d.h. ein Abknicken der Alkylketten an beliebiger Stelle, initiiert, die 10^{-12} - 10^{-10} s dauern und sich in der Membranebene fortpflanzen. Diese Umwandlung führt zu einer lateralen Expansion, einer Änderung der Packung und einer Fluiditäts- und Mobilitätssteigerung der Lipide. Die Membrandicke nimmt ab, während das Volumen und die Wasserschichtdicke zunehmen [61].

Bei einem H_2O -Gehalt von weniger als 15% kann die Bildung von kubischen Phasen stattfinden. Diese optisch isotropen, hochviskosen Phasen sind bikontinuierlich mit periodisch minimierten Oberflächen oder mizellar durch die kubische Packung verschiedener Mizelltypen [58]. Normale H_I und inverse H_{II} hexagonale Phasen kommen insbesondere bei PL mit kleinen, kaum hydratisierten Kopfgruppen und Anziehungskräften im Kopfgruppenbereich vor, z.B. bei Phosphatidylethanolaminen. Ein höherer H_2O -Gehalt als 45% resultiert in der Separation einer H_2O -Phase, oberhalb 70% H_2O entstehen Myelinstrukturen [62].

Die Vesikelherstellung erfolgt durch mechanische Methoden wie Extrusion, Hochdruckhomogenisation und Ultraschallbehandlung, aber auch durch Detergensentfernung mittels Verdünnung, Gelchromatographie oder Dialyse [63]. Bei der hier verwendeten Ultraschallmethode werden größtenteils SUV und geringe Mengen MLV-Fragmente erhalten. Der Ultraschalleinfluss bedingt die SUV-Bildung durch einen Zweistufen-Prozess [64]: erst entstehen unter Zerstörung der MLV instabile Fragmente, dann schließt sich ein spontaner Ringschluss durch den Einfluss der Kantenenergie und der elastischen Energie [65] an. Die Charakterisierung der Vesikelgrößen und der Größenverteilung gelingt durch Lichtstreuung, Elektronenmikroskopie, Gelfiltration und Ultrazentrifugation [58].

2.3.2 Mizellen

Unter dem Begriff „Mizelle“, der 1913 von MCBAIN [29] geprägt wurde, werden kolloidale Aggregate verstanden, die sich spontan ohne Energieaufwand aus Detergensmolekülen in Lösungen bilden und thermodynamisch stabil sind [27].

Diese Selbstaggregation erfolgt nur oberhalb einer für jedes Detergens charakteristischen Konzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc), und oberhalb einer bestimmten Temperatur, der kritischen Mizellbildungstemperatur (cmt) [35]. Unterhalb der cmc enthält die Lösung nur Detergensmonomeren und unterhalb der cmt trübe, kristalline Suspensionen. Die cmc zeichnet sich durch die Änderung der kolligativen Eigenschaften der Lösung aus, z.B. Leitfähigkeit, osmotischer Druck, Grenzflächenspannung und Trübung [66]. Die cmt ist am „Klarwerden“ der Suspension erkennbar. Der Schnittpunkt von cmc - und cmt -Kurve wird als „KRAFFT-Punkt“ bezeichnet [29] (Abb. 2.11).

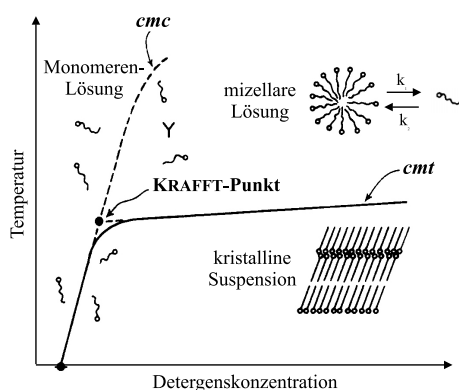


Abb. 2.11: Mizellbildung in Abhängigkeit von der Detergenskonzentration und der Temperatur [35]

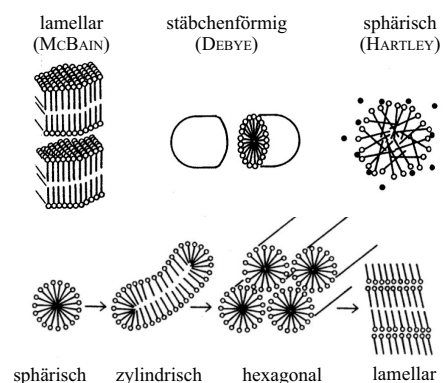


Abb. 2.12: Modellvorstellungen zur Struktur von Mizellen [67]

Die Aggregation bedingt eine Anordnung der Moleküle, bei der sich die hydrophoben Teile, die durch van der Waals-Kräfte zusammengehalten werden, vom Wasser abgeschirmt im Mizellkern befinden, während sich die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Phase orientieren. Die Form der Mizellen (Abb. 2.12) wird durch die Eigenschaften des Detergens, z.B. Kettenlänge, Kopfgruppe und Ladung, dessen Konzentration sowie äußere Einflussgrößen wie pH -Wert, Temperatur und Ionenstärke des Mediums bestimmt [68]. Als limitierender Faktor der Mizellbildung ist die Packungsdichte der Kopfgruppen anzusehen, die durch die Hydratation bzw. bei ionischen Detergentien durch die elektrostatische Abstoßung gegeben ist [69].

Im Folgenden wird die Mizellbildung der Gallensalze näher beschrieben. Diese zählen zu den Typ B-Detergentien, die wegen ihrer strukturellen Besonderheit keine klare Polaritätstrennung, d.h. keine typische „Kopf-Schwanz-Struktur“ der klassischen Detergentien,

besitzen [70]. Lange Zeit wurde auch davon ausgegangen, dass sie keine lyotrope Mesomorphie aufweisen [71]. Neuere Untersuchungen von MARQUES et al. [72] zeigen die Existenz von flüssigkristallinen Phasen mit Hexagonalstruktur. Das GS-Molekül (Abb. 2.2) hat eine konvexe, lipophile Seite mit den Methylgruppen und eine konkave, hydrophile Seite mit den Hydroxylgruppen und der negativ geladenen Kopfgruppe.

Die Aufklärung der GS-Eigenschaften begann mit Studien von EKWALL et al. [73] um 1950. Das GS-Molekül ist 20 Å lang, 6-7 Å breit und hat ein Volumen von 530 Å³ [28]. Untersuchungen an Monoschichten ergaben für Di- und Trihydroxy-GS eine Molekülfläche von 1,1 nm² an der Wasser-Luft-Grenzfläche [74, 75], während bei der Adsorption auf hydrophoben Oberflächen NaC 3 nm² und NaDC 2 nm² beanspruchen [76, 77]. In der Tab. 2.1 sind einige wesentliche Kenngrößen der beiden untersuchten GS aufgeführt.

Tab. 2.1: Charakterisierung der Gallensalze NaC und NaDC - Literaturangaben ([78] u. [79–81]: Lichtstreuung; [82]: Röntgenstreuung; [83]: Dichte/Viskosität; [84]: ITC (0,1 M NaCl, 25° C); [85]: Leitfähigkeit; [86]: Viskosität (H₂O, 25° C))

Parameter	NaC	NaDC
pK_a [27]	4,98	5,17
molare Mizellmasse/g·mol ⁻¹ [78]	1200-3000	3000-4000
$V_{spezif.}/ml·g^{-1}$ [83]	0,74-0,76	0,75-0,78
cmc/mM [84]	11,5	4,0
$cmt/°C$ [27]	< 0	< 0
Wasserlöslichkeit/%(m/m) [29]	45 %	40 %
Dimerisationskonstante/l·mol ⁻¹ [85]	100	160
$R_h/Å$ [79–82]	10-16	20-60
Aggregationszahl n_A [84]	5,5	12,3
Gegenionenbindungsgrad β [84]	0,15	0,3
Viskosität $\eta/mPas$ [86]	1,03	0,95

Die Mizellbildung der GS wird von SMALL [87, 88] und von MAZER et al. [80] auf der Grundlage von Experimenten mittels Lichtstreuung und Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) durch das „Primär-Sekundär-Mizell-Modell“ beschrieben. In wässrigen Lösungen von Di- und Trihydroxy-GS bilden sich zuerst kleine, sphärische Primärmizellen aus 2-10 Monomeren über hydrophobe Bindungen, bei denen die konvexen, hydrophoben Seiten zueinander orientiert sind. Die Aggregationszahlen n_A der GS sind im Vergleich zu den klassischen Detergentien sehr klein [89–92]. Bei höheren Detergens- und Salzkonzentrationen des Mediums entstehen insbesondere bei den Dihydroxy-GS durch die Polymerisation der Primärmizellen über Wasserstoffbrückenbindungen größere, stäbchenförmige Sekundärmizellen (NaDC: Radius $r = 9-12$ Å, Länge $l = 116$ Å) [93, 94] mit wesentlich höheren Aggregationszahlen. Die von OAKENFULL und FISHER [95–98] vermutete Bildung

der Primärmizellen über hydrophile Bindungen konnte durch Messungen der Dichte [99] und der Translationsmobilitäten [100, 101] sowie durch Licht- [102, 103] und Röntgenstreuung [104] widerlegt und das Modell von SMALL bestätigt werden. Neuere Studien mit Elektronenspinresonanz (ESR) und Neutronenstreuung ergaben eine ellipsoide Gestalt der Primärmizellen mit einer kleinen (NaC u. NaDC: $a = 8 \text{ \AA}$) und einer großen (NaC: $b = 18 \text{ \AA}$; NaDC: $b = 32 \text{ \AA}$) Halbachse [105, 106]. Die dem Wasser ausgesetzte hydrophobe Oberfläche der GS-Mizellen ist für NaC (70 \AA^2) mit drei Hydroxylgruppen wesentlich geringer als für NaDC (160 \AA^2) mit zwei Hydroxylgruppen [80]. Kristallographische Studien ergaben für Dihydroxy-GS eine Helixstruktur mit Trimer- [107–110] und für Trihydroxy-GS eine elliptische Zylinderstruktur mit Dimer-Basiseinheiten [111–113].

Eine Vielzahl von Untersuchungen beschäftigte sich mit der *cmc*-Bestimmung von GS-Lösungen, bei der eine Reihe von Messmethoden zum Einsatz kamen, so z.B. Lichtstreuung [78, 114, 115], Kalorimetrie [84, 116–120], NMR- [121], ESR- [97] und Fluoreszenzspektroskopie [121, 122], Gelfiltrationschromatographie [123], Oberflächenspannungs- [124, 125], Gefrierbruch- [90, 126], Dampfdruck- [127], Membranpotential- [128] und Diffusionsmessungen [129]. Die angegebenen Werte liegen für das Trihydroxy-GS NaC im Bereich von 8 bis 16 mM und sind somit größer als für das Dihydroxy-GS NaDC mit 3 bis 13 mM.

Im Gegensatz zu den Typ A-Detergentien ist die *cmc* der GS ein breiter Konzentrationsbereich [130, 131] und nimmt bei 20°C ein Minimum an. Mit zunehmender Temperatur steigt die *cmc*, die Größe der Sekundärmizellen sinkt [29]. Die Mizellbildungstendenz nimmt oberhalb 60°C wegen des geringeren Dielektrikums des wässrigen Mediums und der somit gesteigerten elektrostatischen Abstoßung deutlich ab [132], über 70°C liegen nur noch Monomeren vor [88]. Der *pH*-Wert der Lösung hat wenig Einfluss auf die Mizellbildung, solange er nicht den *pK_a*-Wert erreicht und eine Präzipitation erfolgt [29].

Eine wichtige Rolle spielt weiterhin die Ionenstärke der Lösung: wenn diese steigt, wird die *cmc* aufgrund einer besseren elektrostatischen Abschirmung der geladenen Kopfgruppen und einer dadurch verringerten Monomerenlöslichkeit zu tieferen Werten verschoben [132]. Dieser Effekt ist bei den Dihydroxy-GS stärker als bei den Trihydroxy-GS ausgeprägt [124]. Die *cmc* wird auch durch die Position der Hydroxylgruppen und die Art der Konjugation beeinflusst. Als weitere charakteristische Abweichungen von den klassischen Detergentien sind der stark apolare Mizellinnenraum wegen des Fehlens der Palisadenstruktur [133] und der kleinere Gegenionenbindungsgrad zu nennen [100].

Des Weiteren wird die Problematik der GS-PC-Mischmizellen näher behandelt. Mischmizellen (MM) bestehen aus zwei oder mehr Komponenten, wovon mindestens eine Komponente ein lösliches Amphiphil (Abb. 2.5) sein muss. Nach CAREY und SMALL [29] werden folgende vier MM-Typen unterschieden:

- Typ A MM mit unpolaren Lipiden: Das Solubilisat befindet sich im Mizellkern. GS sind wesentlich schlechter geeignet als klassische Detergentien.
- Typ B MM mit polaren, unlöslichen, nichtquellenden Amphiphilen (z.B. Cholesterol, FS): Das Solubilisat ist zwischen den Detergensmolekülen interkaliert. Auch in dem Fall nehmen klassische Detergentien mehr Solubilisatmoleküle auf als GS.
- Typ C MM mit polaren, unlöslichen, quellenden Amphiphilen (z.B. PL): Das Solubilisat ist zwischen den Detergensmolekülen angeordnet. GS können große Mengen solubilisieren (z.B. ein Mol GS solubilisiert zwei Mol PC). Diese MM besitzen eine gesteigerte Solubilisierungskapazität für Cholesterol bzw. FS und haben deshalb die größte Bedeutung bei der Solubilisierung von Nahrungsfetten.
- Typ D MM mit polaren, löslichen Amphiphilen (andere Detergentien): Die *cmc* der MM ist immer kleiner als die der Einzelkomponenten. Im Gegensatz zu den Typen A-C sind beide Komponenten am *cmc*-Wert beteiligt. Die *cmc* der MM liegt allerdings näher am Wert der Komponente mit der kleineren *cmc*.

Erste Modelle zur Struktur von GS-PC-MM, die zum MM-Typ C gehören, wurden Ende der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts von SMALL [88, 134] und von DERVICHIAN [135] erstellt (Abb. 2.13). Bei diesem „disc“-Modell wird von einer Scheibchenform der GS-PC-MM ausgegangen. Die PC-Moleküle befinden sich mit den Alkylketten zueinander orientiert im Inneren, während die GS-Moleküle einen Ring in der Peripherie bilden. Auf der Grundlage von Lichtstreu-Experimenten erweiterten MAZER et al. [79, 136–138] das „disc“-Modell zum „mixed disc“-Modell. Die GS-Moleküle bilden hierbei nicht nur die Umrandung, sondern sie sind auch im Inneren zwischen den PC-Molekülen als über Wasserstoffbrücken gebundene Dimere eingelagert.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurde die Vorstellung von der Scheibchenform durch die der Stäbchenform ersetzt. Die Ergebnisse von MÜLLER [139] mit Röntgenstreuung, von ULMIUS et al. [140] mit NMR, von HJELM et al. [141–144] mit Neutronenstreuung (SANS), von NICHOLS und OZAROWSKI [145] mit Größenausschlusschromatographie sowie von EGELHAAF et al. [146] mit Lichtstreuung erbrachten eine deutliche Abweichung vom „mixed disc“-Modell.

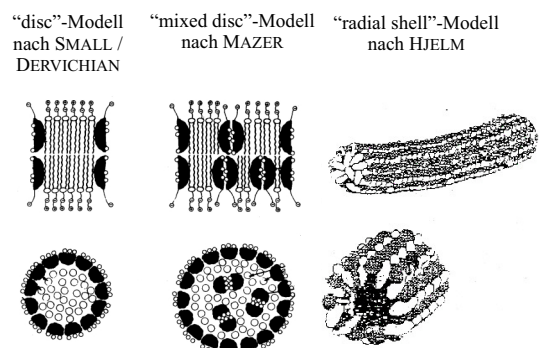


Abb. 2.13: Modellvorstellungen zur Struktur von GS-PC-MM nach SMALL [134] bzw. DERVICHIAN [135], MAZER [79] und HJELM [142]

Die GS-PC-MM wurden von nun an als lange, flexible Stäbchen betrachtet, die einen Radius $r = 27 \text{ \AA}$ [141,147] und eine vom molaren PC/GS-Verhältnis abhängige, variierende Länge von 50-1000 \AA [143] besitzen. Bei diesem „radial shell“-Modell [144, 148] sind die PC-Moleküle im Zylinder radial angeordnet. Die GS-Moleküle sind mit ihrer Längsachse parallel zur Stäbchenachse im Zylinder verteilt und bilden wegen ihrer hohen spontanen Krümmung die Endkappen der Stäbchen.

Diese Modellvorstellung konnte von LONG et al. [149, 150] durch Licht- und Neutronenstreu-Experimente an GS-PC-Gemischen unter Einführung des „core-shell“-Modells bestätigt werden. Der Radius von 27 \AA setzt sich aus dem 17 \AA dicken Kern und der 10 \AA dicken Hülle zusammen. Die Endkappen werden von jeweils sechs GS-Molekülen gebildet. PETERSEN et al. [151] ermittelten für die flexiblen Stäbchenmizellen eine Persistenzlänge von 180 \AA . Die Unwahrscheinlichkeit der Annahme des „mixed disc“-Modells wurde durch Lichtstreu-Untersuchungen von COHEN et al. [152] bewiesen, da die Scheibchen-MM eine Dicke von weniger als 1 nm besitzen müssten, die PC-Doppelschichten aber 4 nm dick sind.

Die Größe und die Gestalt der flexiblen Stäbchen-MM wird durch deren Radius r , die Persistenzlänge l_P und die Gesamtlänge l_G beschrieben [153]. Während der Radius annähernd konstant bleibt, sind die Persistenz- und die Gesamtlänge von der Konzentration, vom molaren PC/GS-Verhältnis sowie von äußeren Einflussfaktoren, insbesondere der Temperatur und der Ionenstärke des Mediums, abhängig [154].

Die Röntgen- und Mikroskopieuntersuchungen von SMALL et al. [155–157] ergaben das in der Abb. 2.14 gezeigte ternäre Phasendreieck für GS-PC/ H_2O . Neben der isotropen, mizellaren Phase bei hohem GS-Anteil und der lamellaren Phase bei hohem PC-Anteil werden zwei weitere flüssigkristalline Phasen gebildet: die hexagonale und die kubische Phase. Es treten auch Gebiete auf, in denen zwei oder drei Phasen koexistieren. COHEN et al. [158] identifizierten mit Lichtstreuung und Gelfiltration Zweiphasengebiete mit Lamellar-Hexagonal- und Mischmizellar-Hexagonal-Charakter.

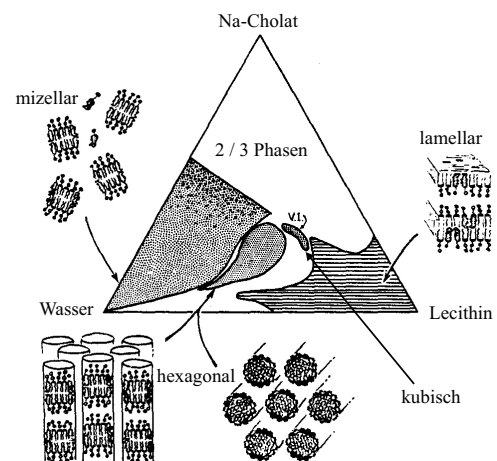


Abb. 2.14: Ternäres Phasendiagramm [156] für NaC-PC/ H_2O mit mizellarer, lamellarer, hexagonaler und kubischer Phase sowie Mehrphasengebieten

Eine besondere Bedeutung kommt außer den physiologisch wichtigen GS-PC-MM vom Typ C auch jenen vom Typ D zu, insbesondere Mischungen aus GS und klassischen Detergentien, z.B. Seifen wie Na-Oleat (NaO). In ternären NaC/NaO/H₂O-Gemischen [33] können die fünf verschiedenen, in der Abb. 2.15 dargestellten Phasen auftreten. Die in dieser Arbeit verwendeten NaC/NaO-Gemische befanden sich ausschließlich in der isotropen, mischmizellaren Phase.

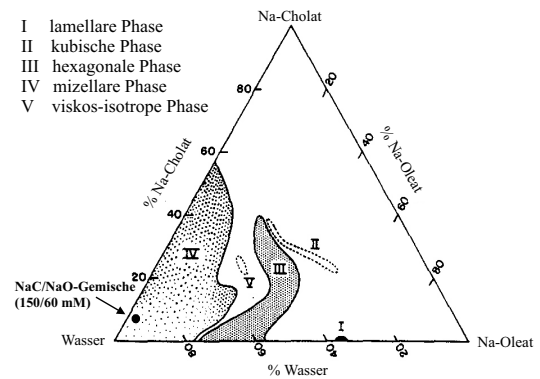


Abb. 2.15: Ternäres Phasendiagramm [33] für NaC/NaO/H₂O, schwarzer Punkt: in dieser Arbeit verwendetes Gemisch mit den höchsten Detergensanteilen

2.3.3 Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung

Die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung (Abb. 2.16), auch unter dem Begriff „Membransolubilisierung“ bekannt, beschreibt den Übergang von Lipid-Doppelschichten in Detergens/Lipid-Mischmizellen durch Detergenszusatz. Dieser Prozess wurde von HELENIUS und SIMONS [69] in drei Abschnitte unterteilt: im Abschnitt I werden die Detergensmoleküle in die Doppelschichten eingebaut, und es entstehen Mischvesikel (MV); im Abschnitt II erfolgt die Umwandlung der MV in MM; im Abschnitt III ist die Phasenumwandlung beendet, und die MM werden kleiner. Ein von LASCH [159] eingeführter vierter Abschnitt unterscheidet zwischen Lipid-reichen MM in Abschnitt III und kleineren Detergens-reichen MM in Abschnitt IV.

Die Vesikel nehmen Detergensmoleküle auf, bis sie bei einem kritischen molaren Detergens/Lipid-Verhältnis R_e^{sat} vollständig gesättigt sind. Oberhalb dieser Grenze, der Sättigungsphasengrenze (D_t^{sat}), beginnen die MV bei weiterer Detergenszugabe unter der Bildung von MM zu zerfallen. Nach dem Überschreiten eines zweiten kritischen molaren Detergens/Lipid-Verhältnisses R_e^{sol} , der Solubilisierungsphasengrenze (D_t^{sol}), liegen nur noch MM vor. Die Solubilisierung ist abgeschlossen, und durch weiteren Detergenszusatz ändern sich die Zusammensetzung, die Größe und die Form der MM von zylindrisch zu sphärisch. Im Koexistenzbereich zwischen den beiden Phasengrenzen liegen MV der Zusammensetzung R_e^{sat} und MM der Zusammensetzung R_e^{sol} nebeneinander vor [37, 159–161].

Die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung beruht auf Differenzen in der spontanen Krümmung von Detergentien und Lipiden, d.h. auf Unterschieden in der Freien Energie der Aggregation der beiden Komponenten, in die die Mischungsentropie und die Krümmungs-

energie einfließen [162,163]. Durch den Detergenseinbau in die Vesikel wird die Alkylkettenordnung in den PL-Doppelschichten reduziert [140]. Es kommt zu einer Fluidisierung und zu einer elastischen Ausdehnung der Vesikel [164]. Daraus resultiert eine gesteigerte Permeabilität der Vesikel [75]. Die einzige Ausnahme bei allen bisher untersuchten Detergentien bildet das Triton X-100, das bei subsolubilisierenden Konzentrationen die Packung der Vesikel optimiert [165].

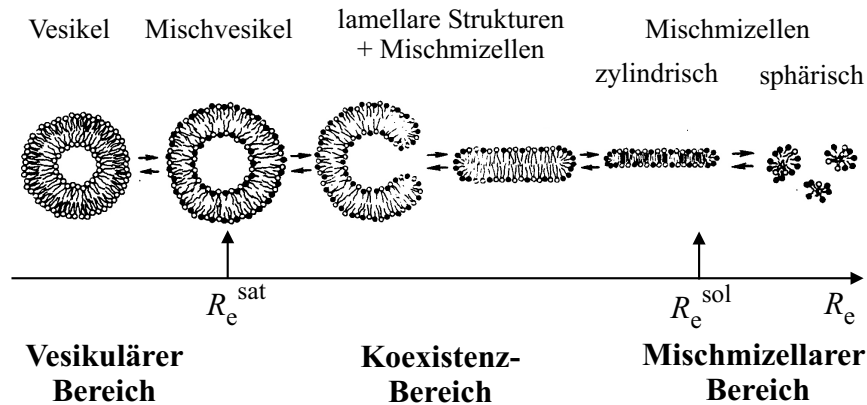


Abb. 2.16: Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung nach LICHTENBERG [47] mit Vesikel-, Koexistenz- und Mischmizellbereich

Durch Stopped-Flow-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Vesikel-Mizell-Umwandlung in GS-PC-Systemen nach einer Kinetik 1. Ordnung verläuft und die Penetration der Vesikel durch die Dihydroxy-GS etwa 500fach stärker als durch die Trihydroxy-GS ist [166]. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ der Membransolubilisierung durch GS beträgt 13-22 ms [167]. NMR-Studien von CABRAL et al. [168] zum Membran-Flip-Flop ergaben die in der Tab. 2.2 aufgeführten Parameter.

Tab. 2.2: Membran-Flip-Flop von Cholsäure (CA) und Desoxycholsäure (DCA) (pH 3,5) [168]

Parameter	CA	DCA
Flip-Flop-Rate $k_{\text{Flip-Flop}} / \text{s}^{-1}$	5	150
Aktivierungsenergie $E_{A \text{ Flip-Flop}} / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	30,1	17,6
Halbwertszeit $t_{1/2 \text{ Flip-Flop}} / \text{ms}$	139	4,6

Die Koexistenz von MV und MM zwischen den beiden Phasengrenzen wurde für GS-PC-Gemische z.B. mit NMR [169], cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) [170], Gelfiltrationschromatographie [171], Lichtstreuung [146, 172, 173], SANS [147, 150, 174] und Kleinwinkel-Röntgenstreuung [175] nachgewiesen. In diesem Bereich finden partielle Solubilisierung und Revesikulierung nebeneinander statt [176]. Ebenso koexistieren beide Aggregatspezies in Mischungen von PC mit anderen Detergentien wie Octylglucosid

(OG), [177–183], Triton X-100 [184–187], Oligo(ethylenoxid)dodecylethern [188–190], Alkylsulfaten [191, 192], Alkyltrimethylammoniumhalogeniden [193–195] und Ethylenoxid-Octylphenolen [196].

Bei der Phasenumwandlung in GS-PC-Gemischen treten verschiedene Intermediate auf. Durch cryo-TEM konnte die Entstehung von planen, an den Kanten durch GS-Moleküle stabilisierten Doppelschichtfragmenten aus geöffneten Vesikeln visualisiert werden, die in lange, flexible, polymerartige Stäbchenmizellen und schließlich in sphärische MM übergehen [170, 197–199]. Nach SCHUBERT et al. [48, 200–202] spielt die Bildung von transienten Poren in den Vesikeln durch die asymmetrische Bindung von GS-Molekülen eine wesentliche Rolle, wodurch Membranspannungen induziert werden [203–205], die bei den Dihydroxy-GS stärker ausgeprägt sind als bei den Trihydroxy-GS [206].

Die Vesikel-Mizell-Umwandlung wird von LICHTENBERG [207] in dem in Abb. 2.17 dargestellten Phasendiagramm zusammengefasst. Die Phasengrenzen für die Sättigung der Vesikel mit Detergens D_t^{sat} und die vollständige Solubilisierung D_t^{sol} ergeben eine Unterteilung in drei Bereiche: 1. den Vesikelbereich, in dem MV und Detergensmonomeren vorliegen, 2. den Koexistenzbereich mit MV, MM und Detergensmonomeren und 3. den Mischmizellbereich, in dem nur MM und Detergensmonomeren vorhanden sind. Die beiden Geraden werden aus folgenden Gleichungen erhalten:

$$D_t^{sat} = R_e^{sat} \cdot L + D_w^{sat} \qquad D_t^{sol} = R_e^{sol} \cdot L + D_w^{sol} \qquad (2.2)$$

Die R_e^{sat} - und R_e^{sol} -Werte stellen die Anstiege der Geraden dar und die D_w^{sat} - und D_w^{sol} -Werte die Ordinatenschnittpunkte. R_e^{sat} entspricht der maximalen Zusammensetzung, bei der MV vorhanden sind, und R_e^{sol} der minimalen Zusammensetzung, bei der MM auftreten können. R_e^{sat} ist ein Maß für die Vesikelstabilität und R_e^{sol} eins für die Solubilisierungseffizienz des Detergens [208]. Die D_w -Größen geben die hypothetischen Detergenskonzentrationen bei der Sättigung und Solubilisierung in Gegenwart von Lipid an [41].

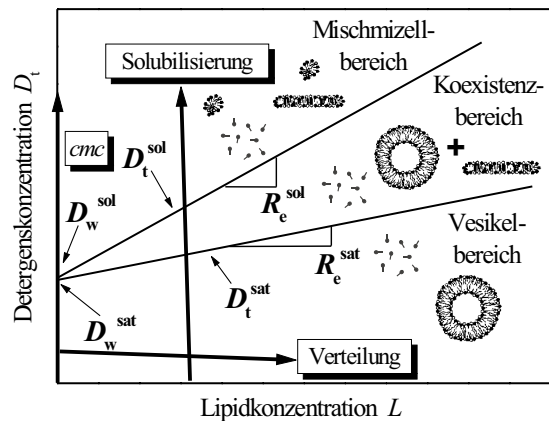


Abb. 2.17: Phasendiagramm mit Detergens- D_t vs. Lipidkonzentration L nach LICHTENBERG für die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung [47] mit Verteilungs-, Solubilisierungs- und Demizellierungsexperiment (cmc)

Der der Solubilisierung entgegengesetzte Prozess, die Mizell-Vesikel-Umwandlung [209], wird zur Membranrekonstitution verwendet, d.h. der Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen durch Detergensentfernung [63]. Bei diesem Vorgang treten auch Scheibchenmizellen in GS-PC-Gemischen als Intermediate auf [210].

2.4 Pharmazeutische Relevanz der Mischmizellen

Der Einsatz von GS-PC-MM als Vehikelsysteme für in Wasser schlecht oder nicht lösliche Wirkstoffe steht seit vier Jahrzehnten im Interesse der pharmazeutischen Forschung [211]. Erste Erfolge konnten Ende der 70er Jahre von der Firma Hoffmann - La Roche AG in der Entwicklung von wässrigen Injektionslösungen für Benzodiazepine wie Diazepam erzielt werden [8, 212].

Diese mischmizellaren Formulierungen zur i.v.-Applikation zeichnen sich durch ihre gute lokale Verträglichkeit, Stabilität, Mischbarkeit und schnelle Arzneistofffreisetzung aus [213]. Die unerwünschten Wirkungen von herkömmlichen Parenteralia mit organischen Lösungsmitteln oder synthetischen Tensiden wie Tween[®] oder Pluronic[®], z.B. Thrombophlebitis, allergische und anaphylaktische Reaktionen, Hämolyse und Injektionsschmerz, sind bei GS-PC-MM drastisch reduziert [214–216]. Diese Vehikel besitzen kein mutagenes, teratogenes und embryotoxisches Potential [217]. Die stark lytische Wirkung der GS wird durch den Zusatz von PC unterdrückt [218]. Deshalb sind die GS-PC-MM nicht Membran-aggressiv, wie durch einen Hämolysetest bewiesen werden konnte [213].

GS-PC-MM eignen sich auch zur parenteralen Applikation von fettlöslichen Vitaminen, z.B. Vitamin E [219], nichtsteroidalen Antiphlogistika [220], Immunmodulatoren [221], Benzbromaron [222] und dem „tissue plasminogen activator“ [223], zur oralen Verabreichung von Vitamin K₁ [224] sowie zur dermalen oder zur transdermalen Anwendung von pharmazeutischen und kosmetischen Wirkstoffen [225, 226]. Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt sind Valium[®] MM [227] mit dem Tranquilizer Diazepam zur i.v.-Applikation und die Vitamin K₁ enthaltenden Präparate Konakion[®] MM 2 mg [228] zur i.v.- und Konakion[®] MM 10 mg [229] zur peroralen Anwendung bei Vitamin K-Mangelzuständen in mischmizellarer Form mit Glycocholsäure und Soja-Lecithin erhältlich. Während die Firma Hoffmann - La Roche AG für die Herstellung der MM-Lösungen die Na⁺-Salze der Gallensäuren verwendet, kommen beim Verfahren der Firma Schering AG die freien Gallensäuren und Alkali- oder Stickstoffbasen zur Neutralisation zum Einsatz [230–232].

Die Vielzahl der Studien zu GS-PC-MM mit inkorporierten Wirkstoffen veranschaulicht ihre Bedeutung als innovatives Arzneistoffträgersystem. Die Wirkung der MM als Resorptionenhancer konnte für Aminoglykosid-Antibiotika [233], Leuprorelin [234] und Hydrocortison [235] nachgewiesen werden. Eine verbesserte Löslichkeit von Taxol [236], Teni-

posid [237] und Retinoiden [238] in mischmizellarer Form erbrachte eine erhebliche Steigerung der Bioverfügbarkeit. HAMMAD und MÜLLER zeigten eine Löslichkeitsverbesserung für Indometacin [239], Clonazepam [240] und Lorazepam [241]. DE CASTRO et al. führten Untersuchungen an Nitrazepam [242] und den β -Blockern Atenolol und Nadolol [243] durch. Die Verwendung von GS-PC-MM ergab eine erhöhte Arzneistoffbindung an α -Glycoprotein, während die an Albumin unbeeinflusst blieb [244]. Mischmizellares Amphotericin B besitzt eine gesteigerte therapeutische Effizienz und Bioverfügbarkeit bei verminderter Toxizität wegen der Abwesenheit der toxischen Monomerform [245, 246].

Die Solubilisierungskapazität von GS-PC-MM für Arzneistoffe wächst mit zunehmendem GS-Anteil und steigendem molarem GS/PC-Verhältnis [247] und verhält sich aufgrund der höheren Lipophilie entgegengesetzt zur Löslichkeit: unkonjugierte GS > Konjugate und Dihydroxy-GS > Trihydroxy-GS [234]. Limitierende Faktoren der Vehikel sind die begrenzte Aufnahmekapazität der Mizellen und die unerwünschte Hilfsstoffsolubilisierung. Stabilitätsproblemen bei der Lagerung von wässrigen MM-Lösungen kann durch Lyophilisation oder Aufbewahrung bei Temperaturen unter 8°C entgegengewirkt werden [248].

Auch einfache GS-Mizellen spielen als Arzneimittel zur Auflösung von Cholesterol-Gallensteinen eine bedeutende Rolle [249, 250]. In der Therapie werden dazu Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure eingesetzt [251]. GS-Mizellen wurden hinsichtlich ihrer Enhancereigenschaften für die Proteinresorption getestet. Für humanes Calcitonin konnten NAKADA et al. eine gesteigerte Resorption und verringerte Degradation nach oraler Applikation feststellen [252]. Die nasale Absorption von Insulin stieg in Gegenwart von GS deutlich an [253], ebenso die von humanem Wachstumshormon unter Verwendung des weniger Membran-schädigenden GS-Derivates Na-Taurodihydrofusidat [254]. Dabei wird die Membrankanal-Funktion der gebildeten Inversmizellen als Mechanismus vermutet.

Die GS dienen nicht nur als Vehikelsysteme, sondern werden auch vielfältig bei biotechnologischen Verfahren für die Solubilisierung von Membranlipiden und Proteinen sowie für die Rekonstitution von Biomembranen genutzt [255–257]. NaC wurde z.B. für die Solubilisierung des Adenylatcyclase-G-Proteins [258] und des Dopaminrezeptors D₁ [259] verwendet. Weiterhin kommen die GS auch bei der Herstellung von Vesikeln durch Detergensentfernung zur Anwendung [125, 202]. Dies geschieht durch Verdünnung, Dialyse, Gelausschlusschromatografie und Temperatur-/Drucksprung-Methoden [209]. SABOUNY et al. gelang die Herstellung von SUV, die aufgrund ihrer geringeren Phagozytose-Anfälligkeit im Vergleich zu LUV längere Verweilzeiten im Organismus aufweisen [260].

2.5 Messmethoden

In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen der verwendeten Messmethoden und die damit zu erhaltenden Kenngrößen kurz vorgestellt. Die ausführliche Beschreibung der Messgeräte und der experimentellen Bedingungen ist im Anhang A enthalten.

2.5.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die beiden Methoden der Kalorimetrie, die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und die Differentialscanningkalorimetrie (DSC), ermöglichen die Untersuchung von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Biomakromolekülen im wässrigen Milieu [60, 261]. Diese Verfahren nutzen die bei physikalischen oder chemischen Reaktionen freigesetzte bzw. absorbierte Wärme q als universelle Messgröße [262, 263].

Die ITC liefert thermodynamische Parameter biochemischer Wechselwirkungen und molekularer Erkennungsprozesse. Sie eignet sich für viele biologisch relevante Makromolekül-Ligand-Interaktionen, z.B. Enzym-Substrat, Enzym-Arzneistoff, Hormon-Rezeptor, Protein-DNA, Protein-Zucker, Protein-Lipid oder auch Lipid-Detergens [264–266]. Diese Methode gestattet die Erstellung von Bindungs- und Verteilungskurven. Sie weist gegenüber anderen Messverfahren folgende Vorteile auf: die Probe muss nicht homogen und optisch klar sein, sie wird nicht zerstört (nicht invasive Methode), es ist keine Markierung oder Immobilisierung erforderlich. Die Zeitdauer für die Gleichgewichtseinstellung ist relativ kurz [267]. Die Experimente erfolgen unter isothermen Bedingungen. Aus einer Messung kann ein komplettes thermodynamisches Profil folgendermaßen erstellt werden [268]:

Die Reaktionsenthalpie ΔH , die aufgrund des 1. Hauptsatzes der Thermodynamik von der Temperatur T , dem Druck p und der Zusammensetzung ξ abhängig ist ($H = H(T, p, \xi)$), wird bei der ITC direkt gemessen [262]. Bei allen anderen Methoden kann ΔH nur aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K über die van't Hoff-Beziehung ermittelt werden (R - Gaskonstante) [269]:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (2.3)$$

Die partielle Ableitung der Enthalpieänderung nach der Temperatur entspricht der Änderung der Wärmekapazität ΔC_p . Ein Beitrag zu ΔC_p ist der Grenzfläche der dem Wasser ausgesetzten hydrophoben Strukturen proportional und liefert Informationen über die Wechselwirkungen der hydrophoben bzw. hydrophilen Molekülstrukturen mit Wasser [46]:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T}\right)_p \quad (2.4)$$

Aus dem ITC-Experiment werden neben ΔH auch die Gleichgewichtskonstante K (bis 10^9 M^{-1} [270, 271]) und die Stöchiometrie der Reaktion n_S bestimmt [272]. Um Aussagen über die Richtung einer spontanen Zustandsänderung zu erhalten, wird als weiterer Parameter die Änderung der Entropie ΔS aus dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik genutzt. Aus dem Zusammenhang zwischen Enthalpie und Entropie ergibt sich nach der GIBBS-HELMHOLTZ-Gleichung die Änderung der Freien Enthalpie ΔG :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.5)$$

Die partielle Ableitung von ΔG nach der Stoffmenge n_i bei konstantem Druck p und konstanter Temperatur T stellt nach GIBBS das chemische Potential μ_i dar:

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p,T} \quad (2.6)$$

ΔG entspricht bei Phasen mit mehreren Komponenten dem Ausdruck:

$$\Delta G = \sum_i \nu_i \mu_i \quad (2.7)$$

Bei idealen Mischungen gilt für die Abhängigkeit von μ_i vom Molenbruch x_i :

$$\mu_i = \mu_i^o + RT \cdot \ln x_i \quad (2.8)$$

Da im Gleichgewicht die chemischen Potentiale von zwei Phasen gleich sind ($\mu_i' = \mu_i''$), ergibt sich unter Gleichgewichtsbedingungen zwischen ΔG^o und K der Zusammenhang:

$$\Delta G^o = -RT \cdot \ln K \quad (2.9)$$

Auf der Grundlage der oben aufgeführten Gleichungen (siehe auch [273, 274]) ermöglicht die Methode eine vollständige thermodynamische Charakterisierung von physikalisch-chemischen Vorgängen [275]. Sie wird auch für die Untersuchung zusätzlicher Einflussfaktoren, wie der Temperatur, des pH -Wertes und der Ionenstärke des Mediums verwendet.

2.5.2 Differentialscanningkalorimetrie

Die DSC-Methode eignet sich zur Untersuchung temperaturinduzierter Zustandsänderungen von Biopolymeren, z.B. Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlehydraten und Lipiden. Es können Konformationsänderungen, Schmelzvorgänge, Aggregations- und Hydratationsprozesse charakterisiert, Einflüsse von pH -Wert, Ionenstärke und Lösungsmittel bestimmt sowie kinetische, Stabilitäts- und Reversibilitätsdaten erhalten werden. Die DSC ist insbesondere für Phospholipidsysteme die Methode der Wahl, um die Identität und Reinheit der Substanzen, die thermo- und lyotrope Mesomorphie, den Einfluss des Vesikeltyps,

der Kettenlänge und der Kopfgruppe, die Mischungseigenschaften sowie den Effekt von hydro-, amphi- und lipophilen Liganden zu untersuchen [60, 276].

Bei diesem Verfahren erfolgt ein kontinuierliches Aufheizen oder Abkühlen der Probe mit der Heizleistung als Messgröße. Die molare Wärmekapazität bei konstantem Druck C_p wird als Temperaturfunktion aufgezeichnet [277, 278]. Die typischen Umwandlungspeaks, deren integrierte Fläche die Umwandlungsenthalpie ΔH darstellt (Gl. 2.4), ergeben sich durch temperaturinduzierte Strukturänderungen in der Probe.

Weitere Parameter können mit den im Abschnitt 2.5.1 angeführten thermodynamischen Grundlagen berechnet werden. Das Peakmaximum entspricht der Umwandlungstemperatur T_m [279, 280], die als „Indikator“ für die Thermostabilität der Probe betrachtet werden kann [281]. Die Peaks besitzen in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Probe verschiedene Formen: scharf und schmal für die Phasenumwandlung von Phospholipiden (Abb. A.4), breit verlaufend für die Denaturierung von Proteinen [263]. Die Peakform und die Halbwertsbreite stellen ein Maß für die Kooperativität der Umwandlung dar [282].

2.5.3 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS), die auch unter den Begriffen „Photonenkorrelationspektroskopie“ oder „Quasielastische Lichtstreuung“ bekannt ist, liefert Informationen über die Größenverteilung der Partikel einer Probe. Die Lichtstreuung resultiert aus der Diffusion der Teilchen infolge der BROWN'schen Molekularbewegung. Die DLS nutzt die Wechselwirkungen zwischen der elektromagnetischen Strahlung mit Wellenlängen im Bereich von 450-700 nm und den Ladungsverteilungen der Teilchen [283].

Bei der DLS werden die zeitlichen Schwankungen der Streuintensität bis in den ns-Bereich detektiert, die aus Konzentrationsfluktuationen durch die Diffusion von Teilchen resultieren. Bei der Methode erfolgt die Messung der Streuintensitäten zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten t und $t + \tau$. Daraus kann die Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ der Streuintensität I berechnet werden. Die Intensitätsautokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ steht mit der elektrischen Feldstärke E $g_1(\tau)$ im Zusammenhang [284]:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(0) \cdot I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} = 1 + \chi |g_1(\tau)|^2 \qquad g_1(\tau) = \frac{\langle E(0) \cdot E(\tau) \rangle}{\langle |E|^2 \rangle} \quad (2.10)$$

$g_1(\tau)$ wird durch folgende Exponentialfunktion beschrieben, die den Diffusionskoeffizient D und den Streuvektor q beinhaltet:

$$g_1(\tau) = e^{-Dq^2\tau} \quad (2.11)$$

In den Streuvektor q fließen die Wellenlänge λ und der Streuwinkel Θ ein [284]:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{\Theta}{2} \quad (2.12)$$

Bei den durchgeführten DLS-Experimenten ist der Streuvektor durch die definierten Werte für den Streuwinkel und die Wellenlänge konstant. Aus dem Diffusionskoeffizient lässt sich der hydrodynamische Radius der Partikel R_h über die STOKES-EINSTEIN-Beziehung unter Verwendung der BOLTZMANN-Konstante k_B und der Viskosität η des Mediums ermitteln [285]:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (2.13)$$

Es handelt sich hierbei um den wechselwirkungsfreien Diffusionskoeffizienten D_0 , der die Interaktionen der Teilchen mit den Nachbarpartikeln bzw. den Lösungsmittelmolekülen vernachlässigt und nur für sphärische Partikel gilt. Die Berücksichtigung von interpartikulären Wechselwirkungen für die Bestimmung des scheinbaren Diffusionskoeffizienten D_{app} erfordert die Einbeziehung eines zweiten Terms in Gl. 2.13, der aber bei der Annahme des Modells der „Harten Kugel“ entfallen kann [286] und deshalb nicht aufgeführt wird. Die Verteilung des Diffusionskoeffizienten wird durch multiexponentielle Kurvenanpassung analysiert (Abschnitt A.3.3).

2.5.4 Kleinwinkel-Neutronenstreuung

Die Kleinwinkel-Neutronenstreuung (SANS) ist eine geeignete Methode, um Informationen über die Größe, Form und Struktur von kolloidalen Teilchen zu gewinnen. Sie nutzt die Wechselwirkungen zwischen Neutronen und Atomkernen der Probe. Wie bei der statischen Lichtstreuung (LS) wird auch bei der SANS die Streuintensität ermittelt, die dem differentiellen Streuquerschnitt $d\Sigma/d\Omega$ entspricht. Es handelt sich um die Anzahl der Neutronen, die pro Zeiteinheit im Raumwinkelelement gestreut werden [287].

Im Gegensatz zur LS liegen die Wellenlängen bei der Neutronen- und Röntgenstreuung im Å-Bereich. Die SANS weist für die Untersuchung biochemischer Fragestellungen, bei denen vorzugsweise leichte Elemente wie C, H, O, N und P vorhanden sind, den Vorteil auf, dass sie nicht wie die Röntgenstreuung auf große Elektronendichteunterschiede angewiesen ist. Der Kontrast zwischen Wasserstoff und Deuterium ist bei der SANS ausreichend. Daher eignet sich bei dieser Methode deuteriertes Wasser (D_2O) als Lösungsmittel [288].

Mit der SANS wird im Vergleich zur LS wegen der Vergrößerung des Streuvektors q eine bessere Auflösung und damit die Charakterisierung der Molekülstrukturen bis in den Å-Bereich erzielt. Die SANS-Methode liefert im Gegensatz zur LS auch Aussagen über interpartikuläre Wechselwirkungen des Systems.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Gallensalz-Phospholipid-Gemische

3.1.1 Verteilung

3.1.1.1 Gallensalz-DPPC-Systeme

Die Verteilung der Detergentien NaC und NaDC in DPPC-Vesikeln wurde mittels ITC (Methode: siehe Abschnitt A.1.1) untersucht. In der Abb. 2.17 ist zu erkennen, dass das Verteilungsexperiment ausschließlich im Vesikelbereich des Phasendiagramms stattfindet. Die Detergentskonzentration liegt deutlich unterhalb der *cmc*, so dass nur GS-Monomeren in der Lösung vorhanden sind. Diese werden in die Vesikel eingebaut, ohne die Doppelschichten zu zerstören. Es entstehen MV, deren physikochemische Eigenschaften sich mit zunehmendem Anteil an inkorporierten GS-Molekülen ändern.

Je ein Beispiel für ein Verteilungsexperiment mit NaC und NaDC in H₂O ist in der Abb. 3.1 dargestellt. Bei diesem Versuch wird eine hochkonzentrierte DPPC-Dispersion aus der Injektionsspritze in die Messzelle titriert, die eine Lösung mit GS-Monomeren enthält. Die Lipidzugabe erfolgt mit 50 Injektionen à 5 μ l.

Bei jeder DPPC-Injektion wird durch den Einbau der GS-Moleküle Wärme freigesetzt, wie aus den exothermen Peaks in den Wärmefluss-Zeit-Diagrammen (Abb. 3.1 A', A'') ersichtlich ist. Mit steigender Lipidkonzentration in der Messzelle bis 3,5 mM sinkt der Anteil an freiem GS durch die Verdünnung und den Einbau in die Vesikel. Dadurch nimmt die Reaktionswärme Q kontinuierlich ab und nähert sich einem konstanten Wert, der Verdünnungswärme der Vesikel. Die Reaktionswärme Q als Funktion der Lipidkonzentration L (Abb. 3.1 B', B'') wird durch die Integration der Fläche der Titrationspeaks erhalten.

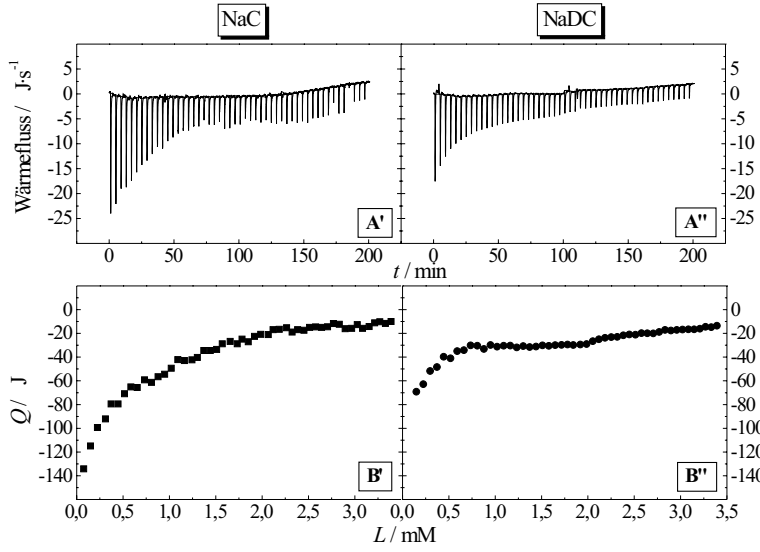


Abb. 3.1: ITC-Verteilungsexperiment: Titration ($50 \times 5 \mu\text{l}$) von einer DPPC-Dispersion (20 mM) in NaC- (10 mM, links), NaDC-Lösung (4 mM, rechts) in H_2O , pH 7,5, bei 60°C : A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L

Für die Charakterisierung der Verteilungsexperimente wird der Verteilungskoeffizient P bestimmt, der als das Verhältnis der Molenbrüche von Aggregat-gebundenem (x_b) und in der wässrigen Phase frei vorhandenem (x_w) Detergens definiert ist:

$$P = \frac{x_b}{x_w} \quad (3.1)$$

Beide Molenbrüche können unter Beachtung der Lipidkonzentration L , der Aggregat-gebundenen und der freien Detergenskonzentrationen D_b bzw. D_w sowie der molaren Wasserkonzentration W ($= 55,5 \text{ M}$) beschrieben werden:

$$x_b = \frac{D_b}{D_b + L} \quad x_w = \frac{D_w}{D_w + W} \quad (3.2)$$

Aufgrund der negativen Ladung der GS-Moleküle führen deren Adsorption an bzw. deren Einbau in die PL-Membranen zu einer negativen Aufladung der Vesikeloberfläche. Deshalb muss der Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Ermittlung der Verteilungskoeffizienten und der Transferenthalpien ΔH^T für den Transfer von Detergensmolekülen aus der wässrigen Phase in die Doppelschichten berücksichtigt werden. Die Berechnung der Oberflächenladungsdichte σ der Membran erfolgt nach KUCHINKA und SEELIG [289]:

$$\sigma = z \cdot e_0 \cdot \frac{\frac{D_b}{L \cdot A_L}}{1 + \frac{D_b \cdot A_D}{L \cdot A_L}} \quad (3.3)$$

mit der elektrischen Ladungszahl des Detergens z , der Elementarladung e_0 , der mittleren Oberfläche eines Lipidmoleküls A_L ($A_{L-DPPC} \approx 65 \text{ \AA}^2$ [290]) und der eines Detergensmoleküls A_D ($A_{D-GS} \approx 40 \text{ \AA}^2$ [291]). Daraus wird mit der GRAHAME-Gleichung [46] für 1:1-Elektrolyte das Oberflächenpotential ψ_0 berechnet:

$$\psi_0 = -k_B \cdot \frac{T}{e_0} \cdot \operatorname{acosh} \left(\frac{\sigma^2}{4\varepsilon_0\varepsilon_r RT \cdot 1000 \cdot c_{el}} + 1 \right) \quad (3.4)$$

mit der elektrischen Feldkonstante ε_0 , der Dielektrizitätszahl von Wasser ε_r und der Elektrolytkonzentration c_{el} . Unter Einbeziehung der Elektrostatik und der Annahme einer nichtidealen Mischung [292] ergibt sich für den scheinbaren Verteilungskoeffizienten P :

$$P = P_0 \cdot e^{-\frac{z \cdot e_0 \cdot \psi_0}{k_B \cdot T}} \cdot e^{-\rho \frac{(1-x_b)^2}{R \cdot T}} \quad (3.5)$$

Dabei ist P_0 der intrinsische Verteilungskoeffizient für das Detergens in Lipidgegenwart. Der erste Exponent beinhaltet die Korrektur der Elektrostatik und der zweite Exponent die der nichtidealen Mischung mit dem Nichtidealitätsparameter ρ . Die Konzentration an Aggregat-gebundenem Detergens D_b kann als Funktion von D_t und L ausgedrückt werden:

$$D_b = \frac{1}{2}(D_t - L) - \frac{W}{2P} + \sqrt{\frac{1}{4}(D_t + L)^2 - \frac{1}{2}(D_t - L) \cdot \frac{W}{P} + \frac{1}{4} \left(\frac{W}{P} \right)^2} \quad (3.6)$$

Die Bulkkonzentration des Detergens D_{wbulk} wird aus den D_t - und D_b -Werten errechnet:

$$D_{wbulk} = D_t - D_b \quad (3.7)$$

Daraus lässt sich unter Berücksichtigung der GOUY-CHAPMAN-Theorie [293] die Detergenskonzentration an der Membranoberfläche D_w ermitteln:

$$D_w = D_{wbulk} \cdot e^{-\frac{z \cdot e_0 \cdot \psi_0}{k_B \cdot T}} \quad (3.8)$$

Die Konzentrationsänderung an gebundenem Detergens als Funktion des zugegebenen Phospholipids wird aus der Ableitung erhalten, die sich numerisch aus den Konzentrationen D_b und L nach der n -ten und der darauffolgenden Vesikelinjektion $n+1$ berechnet:

$$\frac{\Delta D_b}{\Delta L} = \frac{D_{b(n+1)} - D_{b(n)}}{L_{n+1} - L_n} \quad (3.9)$$

Die molare Reaktionswärme ΔH setzt sich aus der Transferenthalpie ΔH^T des Einbaus von GS-Molekülen in die Vesikel und der Verdünnungswärme ΔH_{dil} der PL-Dispersion zusammen, die wie im Abschnitt A.1.3.1 beschrieben, bestimmt wurde:

$$\Delta H = \frac{\Delta D_b}{\Delta L} \cdot \Delta H^T + \Delta H_{dil} \quad (3.10)$$

Die ΔH_{dil} -Werte sind geringe Wärmemengen, die bei der Verdünnung von Lösungen durch die Vergrößerung des Molekülabstandes entstehen [294]. Diese werden in separaten Messungen ermittelt (Abschnitt A.1.3). Die experimentell erhaltene Reaktionswärme Q entspricht dem Produkt aus der molaren Reaktionswärme ΔH , der Lipidkonzentration in der Injektionsspritze L_{syr} und dem Injektionsvolumen v_{inj} :

$$Q = \Delta H \cdot L_{syr} \cdot v_{inj} \quad (3.11)$$

Der Verteilungskoeffizient P und die Transferenthalpie ΔH^T ergeben sich als Parameter aus den oben aufgeführten Gleichungen durch eine nichtlineare Kurvenanpassung (Abschnitt A.1.3) der experimentell ermittelten Q -Werte als Funktion der Lipidkonzentration. Die Ergebnisse der Verteilung von NaC und NaDC in DPPC-Vesikeln in H_2O und 0,1 M NaCl sind in der Abb. 3.2 dargestellt. Mit der Gl. 2.9 können die Änderungen der Freien Enthalpie $\Delta G_{\#}^T$ für den intrinsischen und den mittleren Verteilungskoeffizienten P_0 bzw. P_{av} durch $\Delta G_{\#}^T = -RT \cdot \ln P_{\#}$ errechnet werden (Index '#' steht für '0' oder 'av' (average); 'av' entspricht der 25. Zugabe von 50 Injektionen bzw. der 12. Zugabe von 25 Injektionen). Die Entropieänderung $\Delta S_{\#}^T$ wird über die GIBBS-HELMHOLTZ-Gleichung (Gl. 2.5) bestimmt. Die erhaltenen thermodynamischen Größen für die Verteilung von NaC und NaDC in DPPC-Vesikeln sowie die Mizellisierung [84] der beiden GS in H_2O und 0,1 M NaCl sind in der Tab. 3.1 zusammengefasst.

Die Transferenthalpien ΔH^T für den Transfer von GS-Molekülen aus der wässrigen Phase in die DPPC-Vesikel sind negativ, aber die Beträge gering im Vergleich zu den Mizellisierungsenthalpien ΔH_{mic} für den Transfer von GS-Molekülen in Mizellen bei 60°C. Die Beträge der Änderung der Freien Enthalpie sind für den Einbau von GS in DPPC-Vesikel (ΔG^T) deutlich größer als für die Mizellisierung (ΔG_{mic}). Bei der Verteilung wird der Einfluss des GS-Anteils auf ΔG^T erkennbar. Dies gilt am stärksten für NaC in H_2O . Mit steigender GS-Konzentration in den Vesikeln sinken die ΔG^T -Beträge von $\Delta G_0^T = -43,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ auf $\Delta G_{av}^T = -24,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Diese Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung ist auf die negative Aufladung der Vesikeloberfläche durch den GS-Einbau zurückzuführen, wodurch die GS-Konzentration in der unmittelbaren Membranumgebung sinkt. Dies verdeutlichen die Verteilungskoeffizienten. Während P_0 ein konstanter, hypothetischer Wert ist, wird P_{av} mit steigendem GS-Anteil in den Vesikeln kleiner. Auch führt das nichtideale Mischungsverhalten zu einer Verringerung von P_{av} . Dieser Effekt konnte schon von KELLER et al. [292] bei dem nichtionischen Detergens OG festgestellt werden. In 0,1 M NaCl wurden größere ΔH^T -Beträge als in H_2O erhalten. Der Einfluss der erhöhten Ionenstärke des Mediums ist bei NaDC stärker ausgeprägt als bei NaC.

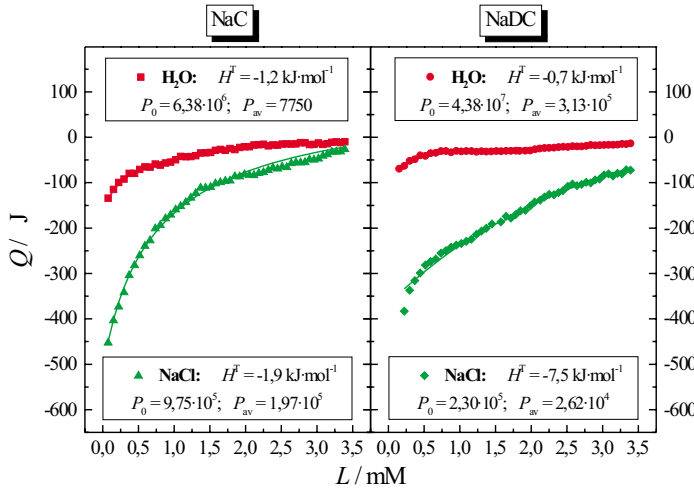


Abb. 3.2: Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L für die Verteilung von NaC (10 mM bzw. 4 mM) und NaDC (4 mM bzw. 1 mM) in DPPC-Vesikeln (20 mM) bei 60°C in H₂O bzw. 0,1 M NaCl: intrinsische, mittlere Verteilungskoeffizienten P_0 , P_{av} , Transferenthalpien ΔH^T ; Punkte: experimentelle Daten, Linien: berechnete Daten für 50x5 μ l

Aus dem Verlauf der Verteilungskurven in der Abb. 3.2 geht die Auswirkung der Ionenstärke auf die Verteilung hervor. Durch die stärkere Abschirmung der negativ geladenen GS-Kopfgruppen in NaCl im Vergleich zu H₂O werden die elektrostatischen Effekte reduziert, wodurch größere Werte für P_{av} und ΔG_{av}^T durch den Einbau von GS-Molekülen in die Vesikel zu erwarten sind. Dies trifft für NaC zu, für NaDC allerdings wurde ein gegensätzliches Verhalten ermittelt. Die Kurven im Q - L -Diagramm (Abb. 3.2) weisen charakteristische Unterschiede im Verteilungsverhalten auf. Die NaC-DPPC-Systeme zeigen einen kontinuierlichen Kurvenverlauf, die Kurven der NaDC-DPPC-Systeme hingegen besitzen eine Diskontinuität mit einem anfänglich steileren und anschließend schwächerem Anstieg. Daraus kann auf unterschiedliche Verteilungsmechanismen für die beiden GS geschlossen werden, die auf die strukturellen Differenzen und die damit verbundenen Unterschiede in der Hydrophilie zurückzuführen sind.

Die Entropiezunahme ist für den Transfer der GS-Moleküle aus der wässrigen Phase in die Vesikel bedeutend größer als für den in die Mizellen. Durch die starke Temperaturabhängigkeit von ΔH (Gl. 2.4) ist der Wert bei 30°C für die Mizellisierung von ionischen Detergentien wie den GS null. Die ΔC_p^{mic} -Werte betragen für diesen Prozess -260 bis -360 J·mol⁻¹·K⁻¹. Negative Werte charakterisieren die Abschirmung der hydrophoben Oberflächen vom Wasser durch die Aggregation. Die ΔH^T -Beträge weisen für die Verteilung kleinere Werte als für die Mizellbildung bei 60°C auf, weil der Nulldurchgang von ΔH zu höheren Temperaturen verschoben ist bzw. die ΔC_p -Werte für die Verteilung geringer sind. Eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von ΔH^T , ΔC_p und die exakte Bestimmung des Nulldurchgangs konnten wegen der hohen Hauptphasenumwandlungstemperatur von DPPC ($T_m=41,4^\circ\text{C}$ [295]) für den Einbau von GS-Molekülen in die Vesikel nicht erfolgen.

Tab. 3.1: Thermodynamische Parameter für die Verteilung von NaC und NaDC in DPPC-Vesikeln sowie für die Mizellbildung (Index 'mic') [84] von NaC und NaDC jeweils in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C

	NaC + DPPC in H ₂ O	NaC + DPPC in NaCl	NaDC + DPPC in H ₂ O	NaDC + DPPC in NaCl
P_0	$6,38 \cdot 10^6$	$9,75 \cdot 10^5$	$4,38 \cdot 10^7$	$2,30 \cdot 10^5$
P_{av}	7750	$1,97 \cdot 10^5$	$3,13 \cdot 10^5$	$2,62 \cdot 10^4$
$\Delta H^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-1,2	-1,9	-0,7	-6,7
$\Delta G_0^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-43,4	-38,2	-48,7	-34,2
$\Delta G_{av}^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-24,8	-33,8	-35,0	-28,3
$T\Delta S_0^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	42,2	36,3	48,1	27,5
$T\Delta S_{av}^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	23,6	31,9	34,4	21,6
$\Delta H_{mic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-7,0	-7,2	-10,3	-13,0
$\Delta G_{mic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-22,0	-23,0	-23,4	-26,4
$T\Delta S_{mic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	15,2	15,6	13,1	13,4

Die Daten von OLLILA und SLOTTE [296] eignen sich nicht zu einer vergleichenden Betrachtung, da hierbei die elektrostatischen Effekte beim Einbau von NaC- und NaDC-Molekülen in PC-Vesikel nicht berücksichtigt wurden. Neuere Ergebnisse zur Verteilung von GS in ungesättigten POPC-Vesikeln ergaben folgende ΔC_p -Werte: $-46 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaC/H₂O, $-91 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaC/NaCl, $-150 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaDC/H₂O und $-302 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaDC/NaCl [297]. Demzufolge scheint in den PC-Vesikeln einerseits mehr hydrophobe GS-Oberfläche dem Wasser ausgesetzt zu sein als in den Mizellen bzw. andererseits auch mehr hydrophobe Lipidoberfläche durch das Eindringen der GS-Moleküle in die Doppelschichten. Dies bedeutet, dass die Mizellen einen effektiveren Schutz der hydrophoben GS-Molekülstrukturen vor dem Wasser ermöglichen.

3.1.1.2 Gallensalz-DPPG-Systeme

Die Verteilung von GS-Molekülen in DPPG-Vesikeln wurde vergleichsweise zu der in DPPC-Vesikeln untersucht. Die Experimente erfolgten in 0,1 M NaCl, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem negativ geladenem Phospholipid DPPG zu gewährleisten. Auch in diesem Fall empfahl sich die Durchführung bei 60°C, da die Umwandlung der Gel- in die flüssigkristalline Phase für DPPG bei $T_m=40,6^\circ\text{C}$ [295] stattfindet.

Ein deutlicher Unterschied im Verteilungsverhalten von NaC und NaDC ist bei DPPG (Abb. 3.3) ebenso erkennbar wie bei DPPC, der sich im zweistufig erscheinenden Kurvenverlauf von NaDC im Q - L -Diagramm widerspiegelt. Die ermittelten thermodynamischen Parameter für die Verteilung in DPPG-Vesikeln sind in der Tab. 3.2 zusammengefasst.

Die Transferenthalpien ΔH^T lassen wie auch bei DPPC in 0,1 M NaCl beachtliche Differenzen zwischen den beiden GS erkennen. Die Beträge sind im Vergleich zu DPPC etwa doppelt so groß. Damit liegt ΔH^T für die NaDC-Verteilung fast bei ΔH_{mic} für die Mizzellbildung von NaDC. Das folgende Verhalten für die ΔH^T -Beträge - DPPG > DPPC - wurde auch für die Verteilung des nichtionischen Detergens OG beobachtet [298]. Im Vergleich zu DPPC ist P_0 bei DPPG wesentlich größer. Die P_0 - und P_{av} -Werte variieren beim DPPG um zwei Zehnerpotenzen, wie am steileren Anstieg zu Beginn der Verteilungskurven für DPPG gegenüber DPPC (Abb. 3.2) zu erkennen ist.

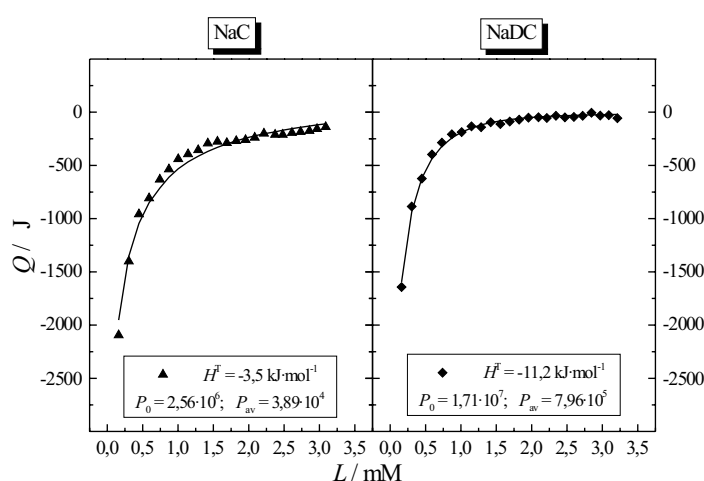


Abb. 3.3: Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L für die Verteilung von NaC (4 mM) und NaDC (1 mM) in DPPG-Vesikeln (20 mM) bei 60°C in 0,1 M NaCl: Transferenthalpien ΔH^T , intrinsische, mittlere Verteilungskoeffizienten P_0 , P_{av} ; Punkte: experimentelle Daten, Linien: berechnete Daten für 25x10 μ l

Die Experimente von KELLER [298] zur Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der Vesikelgröße ergaben höhere P -Werte für stärker gekrümmte Vesikel mit kleineren Durchmessern. Die in dieser Arbeit durchgeführten DLS-Experimente (Abschnitte 3.1.2.1 u. 3.1.2.2) zeigten, dass sich durch die analoge Vesikelherstellung mittels Ultraschall größere DPPC-Vesikel mit $R_h \sim 40$ nm und kleinere DPPG-Vesikel mit $R_h \sim 25$ nm bilden.

Tab. 3.2: Thermodynamische Parameter für die Verteilung von NaC und NaDC in DPPG-Vesikeln in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C

	NaC + DPPG	NaDC + DPPG
P_0	$2,56 \cdot 10^6$	$1,71 \cdot 10^7$
P_{av}	$3,98 \cdot 10^4$	$7,96 \cdot 10^5$
$\Delta H^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-3,5	-11,2
$\Delta G_0^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-40,9	-46,1
$\Delta G_{av}^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-29,3	-37,6
$T \Delta S_0^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	37,4	34,9
$T \Delta S_{av}^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	25,8	26,4

Daraus wird geschlussfolgert, dass die höheren P_0 -Werte von DPPG auf deren geringere Größe bzw. stärkere Krümmung gegenüber DPPC zurückzuführen sind. Im Unterschied zum zwitterionischen DPPC ist bei dem negativ geladenen Lipid der mittlere Verteilungskoeffizient P_{av} für die Inkorporation von NaDC größer als für die von NaC. Demzufolge ist der Einbau von NaDC-Molekülen in die DPPG-Membran stärker begünstigt als der von NaC. Dieses Verhalten wird auch durch die entsprechenden ΔG^T -Werte bestätigt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die GS-Verteilung in ungesättigten POPC-Vesikeln erhalten [297].

3.1.1.3 Gallensalz-DPPC/DPPG-Systeme

Im Folgenden wurde die Verteilung von NaC und NaDC in gemischten DPPC/DPPG-Vesikeln in den molaren Verhältnissen 1:1 und 3:1 untersucht. Die Experimente erfolgten ebenfalls bei 60°C in 0,1 M NaCl. In Analogie zu den Einzelkomponenten DPPC und DPPG zeigen auch diese Gemische die charakteristischen Unterschiede im Verteilungsverhalten der beiden GS (Abb. 3.4): ein kontinuierlicher Kurvenverlauf für den NaC- und ein diskontinuierlicher für den NaDC-Einbau. Die Tab. 3.3 enthält die ermittelten thermodynamischen Parameter für die 1:1- und 3:1-Gemische.

Die Transferenthalpien ΔH^T für die DPPC/DPPG-Mischungen verhalten sich wie die für DPPG mit etwa doppelt so großen Beträgen gegenüber denen von DPPC. Die ΔH^T -Werte der Gemische liegen betragsmäßig etwa dreifach so hoch für die Verteilung von NaDC im Vergleich zu NaC und stimmen annähernd mit denen von DPPG überein. Für die Verteilungskoeffizienten sind bei den gemischten DPPC/DPPG-Vesikeln gleiche Tendenzen wie bei DPPG erkennbar: die P_0 - und P_{av} -Werte differieren jeweils um zwei Zehnerpotenzen und sind für die NaC- kleiner als für die NaDC-Verteilung.

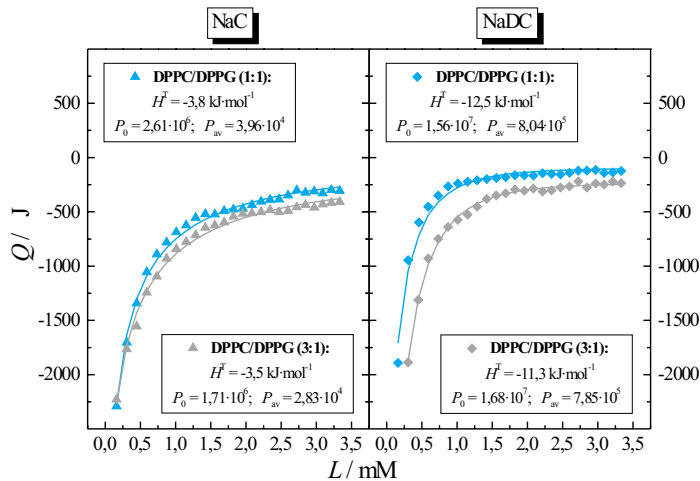


Abb. 3.4: Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L für die Verteilung von NaC (4 mM) und NaDC (1 mM) in DPPC/DPPG(1:1)- bzw. in DPPC/DPPG(3:1)-Vesikeln (20 mM) bei 60°C in 0,1 M NaCl: Transferenthalpien ΔH^T , intrinsische, mittlere Verteilungskoeffizienten P_0 , P_{av} ; Punkte: experimentelle Daten, Linien: berechnete Daten für 25x10 μ l

Die ΔG_0^T - und ΔG_{av}^T -Werte für die beiden Lipidgemische stimmen ebenfalls mit denen für DPPG überein. Die errechneten $T\Delta S_{av}^T$ -Werte betragen für die Verteilung von NaC und NaDC sowohl in den DPPC/DPPG-Mischvesikeln als auch in DPPG-Membranen $\sim 26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und liegen damit über den $T\Delta S_{mic}$ -Werten der GS ($\sim 13\text{-}15 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Tab. 3.3: Thermodynamische Parameter für die Verteilung von NaC und NaDC in gemischten DPPC/DPPG(1:1)- und DPPC/DPPG(3:1)-Vesikeln in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C

	NaC + PC/PG(1:1)	NaDC + PC/PG(1:1)	NaC + PC/PG(3:1)	NaDC + PC/PG(3:1)
P_0	$2,61 \cdot 10^6$	$1,56 \cdot 10^7$	$1,71 \cdot 10^6$	$1,68 \cdot 10^7$
P_{av}	$3,96 \cdot 10^4$	$8,04 \cdot 10^5$	$2,83 \cdot 10^4$	$7,85 \cdot 10^5$
$\Delta H^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-3,8	-12,5	-3,5	-11,3
$\Delta G_0^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-40,9	-45,9	-39,7	-46,1
$\Delta G_{av}^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-29,3	-37,6	-28,4	-37,6
$T\Delta S_0^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	37,1	33,4	36,2	34,8
$T\Delta S_{av}^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	25,5	25,1	24,9	26,3

3.1.1.4 Gallensalz-SPC-Systeme

Die Verteilung der beiden GS NaC und NaDC in SPC-Membranen in H₂O bzw. 0,1 M NaCl wurde ebenfalls mit der ITC untersucht. Da es sich beim SPC um ein natürliches Phospholipidgemisch mit einem Anteil an ungesättigten FS von über 80% handelt, liegt dessen Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m je nach Zusammensetzung zwischen -10°C und -15°C [58]. Dadurch waren bei diesem Lipid neben den Messungen bei 60°C , die dem Vergleich mit den synthetischen PL dienten, auch solche bei 30°C möglich.

Beispiele für je einen Verteilungsversuch mit NaC in H₂O bei 30°C und 60°C sind in der Abb. 3.5 zu sehen. Bei beiden Temperaturen werden exotherme Reaktionswärmen gemessen. Die gleiche Skalierung in den Wärmefluss-Zeit- und den Q - L -Diagrammen lässt den Einfluss der Temperatur auf den Verteilungsprozess erkennen. Bei der höheren Temperatur verläuft die Detergensinkorporation wesentlich stärker exotherm.

Einen Überblick über die erzielten Ergebnisse für die Verteilung von NaC und NaDC in SPC-Vesikeln in H₂O bzw. 0,1 M NaCl bei 30°C und 60°C liefern die Abb. 3.6 und die Tab. 3.4. Die Differenzen im Verteilungsverhalten zwischen dem Trihydroxy-GS und dem Dihydroxy-GS sind wie beim DPPC eindeutig sichtbar. Wie schon bei den synthetischen PL beobachtet, ergibt sich im Fall des NaC-Einbaus ein kontinuierlicher Kurvenverlauf, während beim NaDC-Einbau eine Unterteilung in zwei Prozesse zu erfolgen scheint. Diese werden durch den anfänglich steileren und dann schwächeren Anstieg der NaDC-Verteilungskurven gekennzeichnet.

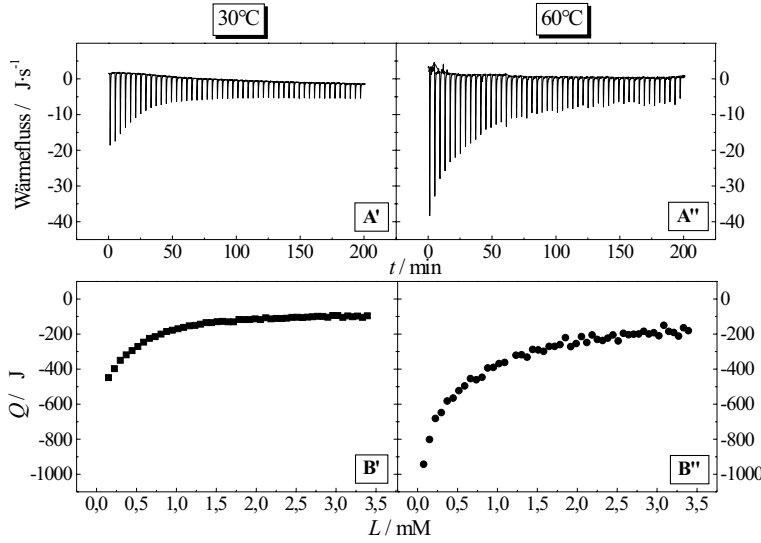


Abb. 3.5: ITC-Verteilungsexperiment: Titration ($50 \times 5 \mu\text{l}$) von einer SPC-Dispersion (20 mM) in eine NaC-Lösung (10 mM) in H_2O , pH 7,5, bei 30°C (links) und 60°C (rechts): A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L

Da die nichtlineare Kurvenanpassung auf einem Verteilungsmodell beruht, dass die GS-Inkorporation in die PL-Membran als einfachen Prozess beschreibt, stimmen die berechneten Werte der Reaktionswärme Q für die NaC-Verteilung besser mit den experimentellen Daten überein als für die NaDC-Verteilung.

Die erhaltenen negativen Transferenthalpien ΔH^T für den Transfer von GS-Molekülen aus der wässrigen Phase in die SPC-Vesikel liegen in der gleichen Größenordnung wie bei den DPPC-Vesikeln. Die Werte sind bei 60°C betragsmäßig größer als bei 30°C . Eine Ausnahme bildet das NaDC-SPC-System in H_2O , bei dem für beide Temperaturen $-0,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ errechnet wurde. In Übereinstimmung mit den DPPC-Resultaten ergaben sich die höchsten ΔH^T -Beträge für die NaDC-Verteilung in 0,1 M NaCl. Bei diesem NaDC-SPC-System in 0,1 M NaCl unterscheiden sich die Transferenthalpien bei 30°C und 60°C um den maximalen Betrag von $\sim 5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, während bei den anderen Systemen die Differenzen geringer sind. Die ΔH^T -Beträge sind beim SPC analog zum DPPC in 0,1 M NaCl größer als in H_2O , aber insgesamt in beiden Medien deutlich kleiner als die Mizellisierungsenthalpien für die Mizellbildung der beiden GS (Tab. 3.1).

Die Beträge für die Änderungen der Freien Enthalpien bei der Verteilung ΔG_0^T und ΔG_{av}^T liegen höher als bei der Mizellbildung ΔG_{mic} und werden ebenso wie die Verteilungskoeffizienten P_0 und P_{av} vom Anteil des gebundenen Detergens in der Membran und der daraus resultierenden negativen Aufladung der Vesikeloberfläche bestimmt. Dies ist an den mit steigender Detergenskonzentration sinkenden ΔG_{av}^T - und P_{av} -Werten zu erkennen.

Ein größerer Verteilungskoeffizient entspricht einem höheren Anteil an Membran-gebundenem Detergens. Die P_0 -Werte für alle untersuchten GS-SPC-Systeme sind ebenso wie für die GS-DPPC-Systeme in H_2O größer als in der Salzlösung.

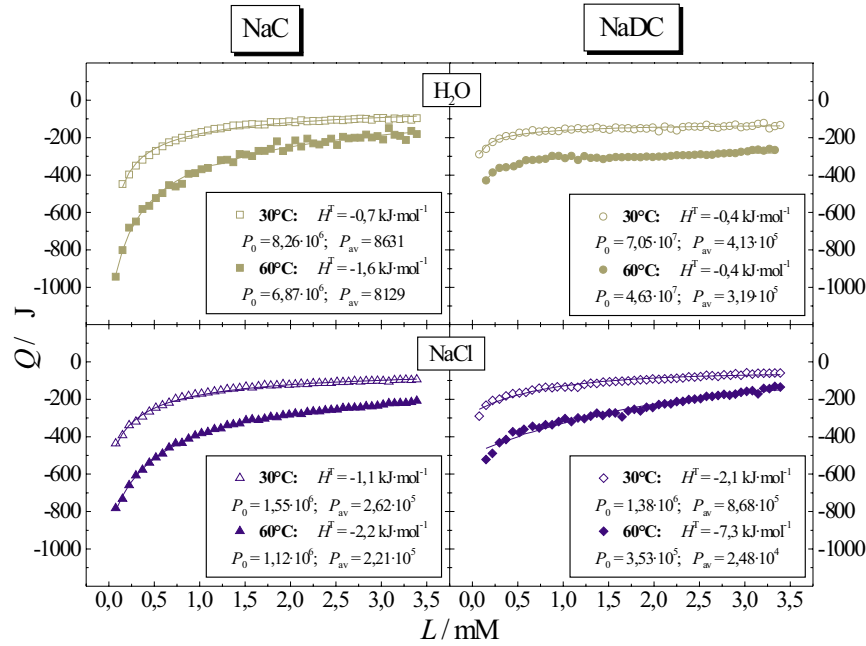


Abb. 3.6: Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L für die Verteilung von NaC (10 mM bzw. 4 mM) und NaDC (4 mM bzw. 1 mM) in SPC-Vesikeln (20 mM) bei 30°C und 60°C in H₂O bzw. 0,1 M NaCl: Transferenthalpien ΔH^T , intrinsische, mittlere Verteilungskoeffizienten P_0 , P_{av} ; Punkte: experimentelle Daten, Linien: berechnete Daten für 50x5 μ l

Daraus wird geschlossen, dass die Verteilung der GS-Moleküle zu Beginn des Detergenzusatzes, bei dem noch keine Vesikeloberflächenladung auftritt, in H₂O im Vergleich zu 0,1 M NaCl begünstigt ist. Die erhöhte Ionenstärke in 0,1 M NaCl und die damit verbundene stärkere Reduzierung der elektrostatischen Effekte führt bei 30°C für NaC und NaDC sowie bei 60°C für NaC zu betragsmäßig größeren ΔG_{av}^T - und P_{av} -Werten in 0,1 M NaCl gegenüber H₂O. Daraus wird eine bessere Verteilung in der Salzlösung abgeleitet. Wie beim DPPC wurde für die NaDC-Verteilung in SPC-Vesikeln bei 60°C ein entgegengesetztes Verhalten beobachtet, das demzufolge nicht nur durch strukturelle Unterschiede zwischen den beiden GS, sondern auch durch den Temperatureinfluss bedingt ist. Dieser ist an den Transferenthalpien und der Differenz zwischen P_0 und P_{av} zu erkennen und bei dem System NaDC-SPC in 0,1 M NaCl am stärksten ausgeprägt. Das Ergebnis wird durch weitere Untersuchungen mit dem ungesättigten POPC belegt [297]. Die errechneten intrinsischen und mittleren P -Werte sind bei 30°C geringfügig höher als bei 60°C. Dies lässt auf einen bei der tieferen Temperatur günstigeren GS-Einbau in die Membran schließen und korreliert mit der geringeren Monomerlöslichkeit bzw. kleineren cmc der GS bei 30°C.

Tab. 3.4: Thermodynamische Parameter für die Verteilung von NaC und NaDC in SPC-Vesikeln in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 30° C und 60° C

	NaC + SPC in H_2O	NaC + SPC in NaCl	NaDC + SPC in H_2O	NaDC + SPC in NaCl
$T = 30^\circ C$				
P_0	$8,26 \cdot 10^6$	$1,55 \cdot 10^6$	$7,05 \cdot 10^7$	$1,38 \cdot 10^6$
P_{av}	8631	$2,62 \cdot 10^5$	$4,31 \cdot 10^5$	$8,68 \cdot 10^5$
$\Delta H^T / kJ \cdot mol^{-1}$	-0,7	-1,1	-0,4	-2,1
$\Delta G_0^T / kJ \cdot mol^{-1}$	-40,1	-35,9	-45,5	-35,6
$\Delta G_{av}^T / kJ \cdot mol^{-1}$	-22,8	-31,4	-32,6	-34,5
$T \Delta S_0^T / kJ \cdot mol^{-1}$	39,5	34,8	45,2	33,5
$T \Delta S_{av}^T / kJ \cdot mol^{-1}$	22,2	30,4	32,2	32,4
$T = 60^\circ C$				
P_0	$6,87 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^6$	$4,31 \cdot 10^7$	$3,53 \cdot 10^5$
P_{av}	8129	$2,21 \cdot 10^5$	$3,19 \cdot 10^5$	$2,48 \cdot 10^4$
$\Delta H^T / kJ \cdot mol^{-1}$	-1,6	-2,2	-0,4	-7,3
$\Delta G_0^T / kJ \cdot mol^{-1}$	-43,6	-38,6	-35,9	-35,4
$\Delta G_{av}^T / kJ \cdot mol^{-1}$	-24,9	-34,1	-35,1	-28,0
$T \Delta S_0^T / kJ \cdot mol^{-1}$	42,0	36,4	35,6	28,0
$T \Delta S_{av}^T / kJ \cdot mol^{-1}$	23,4	31,9	34,7	20,7

Aus der Temperaturabhängigkeit der Transferenthalpie ist die Änderung der molaren Wärmekapazität ΔC_p (Gl. 2.4) berechenbar. Die Werte für die zwei Temperaturen erlauben eine Abschätzung der ΔC_p -Werte, die für NaC-SPC und NaDC-SPC in H_2O sowie NaC-SPC in NaCl durch sehr kleine Beträge gekennzeichnet sind. Im Vergleich dazu ergibt sich für NaDC-SPC in 0,1 M NaCl mit $\Delta C_p = -173 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ein wesentlich größerer Betrag. Dieser negative Wert resultiert aus der für NaDC in 0,1 M NaCl am stärksten ausgeprägten Verringerung der hydrophoben, dem Wasser ausgesetzten GS-Oberfläche durch den Einbau in die Vesikel. Im Vergleich zum POPC mit $\Delta C_p = -302 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ für NaDC in 0,1 M NaCl [297] ist die Abschirmung der hydrophoben Strukturen vor dem Wasser in SPC- weniger effektiv als in POPC-Vesikeln. Dies wird auf die höhere Fluidität und den damit verbundenen größeren Wasseranteil in den Doppelschichten der natürlichen SPC-Membranen zurückgeführt. Ähnliche ΔC_p -Werte lieferten Studien von WENK et al. zur Verteilung der nichtionischen Detergentien OG mit $-313 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ [299] und Octylthioglucoosid (OTG) mit $-409 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ [300] in POPC-Membranen.

3.1.1.5 Zusammenfassung

Die ITC-Experimente zur NaC- und NaDC-Verteilung in synthetischen DPPC-, DPPG-, DPPC/DPPG(3:1)- und DPPC/DPPG(1:1)- sowie in natürlichen SPC-Vesikeln ermöglichen die simultane Bestimmung der Verteilungskoeffizienten und der Transferenthalpien. Für eine vergleichende Betrachtung sind die Verteilungskurven von DPPC, DPPG und den DPPC/DPPG-Mischungen mit NaC und NaDC in NaCl in der Abb. 3.7 und die von DPPC und SPC mit beiden GS in H₂O bzw. NaCl in der Abb. 3.8 gegenübergestellt.

Der Detergenseinbau in die Vesikel führt zu einer elastischen Ausdehnung [164] und einer Störung der Membranordnung [75], die durch eine verringerte Alkylkettenordnung [140], eine gesteigerte Fluidität [169] und Membranpermeabilität [301] gekennzeichnet sind. Die strenge Packung der hydrophoben Alkylketten der Membran wird durch die Inkorporation der Detergensmoleküle aufgelockert, während der PL-Kopfgruppenbereich fast unbeeinflusst bleibt [299]. Studien von HEERKLOTZ et al. [302–304] an Mischungen von Oligo(ethylenoxid)alkylethern (z.B. C₁₂EO_n) mit POPC ergaben für den Detergenseinbau in die Membranen eine laterale Kompression im Kopfgruppenbereich durch die Dehydratation und eine Expansion im PL-Alkylkettenbereich durch die Membranfluidisierung.

Bei allen Systemen verläuft der Verteilungsprozess für das Trihydroxy-GS NaC kontinuierlich, während für das Dihydroxy-GS NaDC eine Unterteilung in zwei Stufen sichtbar wird (senkrechter Strich in Abb. 3.7 und 3.8). NMR-Untersuchungen zeigten, dass die GS-Moleküle asymmetrisch an die Membranen binden [305]. Zuerst lagern sie sich planar an der äußeren Monoschicht an [140], dann erfolgt die senkrechte Inkorporation in die Doppelschichten der Vesikel [203–205] mit einer Anordnung von sechs PL- pro GS-Molekül [202]. NAGATA et al. [166] ermittelten durch Stopped-Flow-Untersuchungen eine 500fach bessere Membranpenetration durch NaDC im Vergleich zu NaC. CABRAL et al. [168] (Tab. 2.2) fanden 50fach höhere Flip-Flop-Raten für DCA gegenüber CA. Dadurch ist der deutlich steilere Anfangsbereich im Kurvenverlauf bei der NaDC-Verteilung erklärbar. Das Membranpenetrationsvermögen des Detergens korreliert mit dessen Mizellbildungstendenz [159,306]. Dies konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Das stärker hydrophobe NaDC mit der geringeren *cmc* weist gegenüber NaC die höheren Verteilungskoeffizienten auf. Der anschließende Kurvenverlauf ist für NaDC flacher als für NaC. Die zwei Stufen bei der NaDC-Verteilung beinhalten zuerst den schnellen Prozess der Adsorption und Inkorporation in die äußere Monoschicht und danach den langsameren Transmembranprozess, dessen Geschwindigkeit mit steigendem GS-Anteil in der Membran zunimmt. Bei der NaC-Verteilung erfolgt durch dessen hydrophileren Charakter eine langsamere Inkorporation. Dadurch ergibt sich ein kontinuierlicher Kurvenverlauf. Der zweistufige Verteilungsablauf wurde bereits von EDWARDS und ALMGREN [307] für Triton X-100-EPC- und Oligo(ethylenoxid)dodecylether-EPC-Systeme nachgewiesen.

Die für die GS-PC-Gemische erhaltene Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der Zusammensetzung der MV stimmt mit den Ergebnissen für Systeme mit den nichtionischen Detergentien OG [308], OTG [309] und $C_{12}EO_n$ [302] überein. Die ΔG^T - und die $T\Delta S^T$ -Werte sind analog dem Verteilungskoeffizienten bei allen Systemen von der Zusammensetzung abhängig. Die Beträge sinken mit steigendem Detergensanteil in den Vesikeln. Die untersuchten GS-PL-Gemische können aber nicht in die von HEERKLOTZ und SEELIG [310] erstellte Einteilung in starke und in schwache Detergentien eingefügt werden, da diese auf einem Modell für nichtionische Detergentien basiert. Die P_0 -Werte und die Differenzen zwischen P_0 und P_{av} (Gl. 3.5) sind sowohl bei den GS-DPPC- als auch bei den GS-SPC-Systemen in H_2O größer als in 0,1 M NaCl.

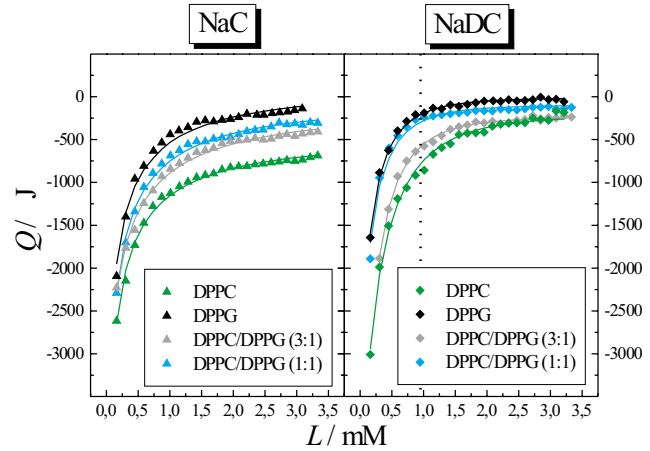


Abb. 3.7: Vergleich der Verteilung bei $60^\circ C$ in 0,1 M NaCl für den Einbau von NaC und NaDC in DPPC-, DPPG- bzw. DPPC/DPPG(3:1)-, DPPC/DPPG(1:1)-Vesikel ($25 \times 10 \mu l$)

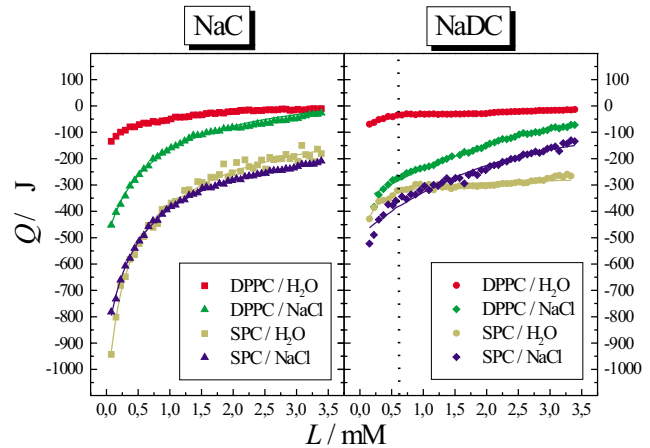


Abb. 3.8: Vergleich der Verteilung bei $60^\circ C$ in H_2O bzw. 0,1 M NaCl für den Einbau von NaC und NaDC in DPPC- bzw. SPC-Vesikel ($50 \times 5 \mu l$)

Die P -Werte für DPPG und dessen Mischvesikel liegen für NaDC höher als für NaC. Die thermodynamischen Größen zeigen kaum Unterschiede zwischen reinen DPPG-Vesikeln und den 1:1- bzw. 3:1-Mischungen von DPPC/DPPG, aber starke Abweichungen im Vergleich zu DPPC. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass unabhängig vom DPPG-Anteil (100%, 50%, 33%) die Anwesenheit der negativen Ladung, die Änderung der Packung sowie der spontanen Krümmung der Vesikel zu den ermittelten Verschiebungen der Parameter gegenüber DPPC führen.

Der Vergleich der Transferenthalpien ergibt für alle untersuchten Systeme geringere Beiträge für die Verteilung ΔH^T als für die Mizellisierung ΔH_{mic} . Eine Mizellbildung ist unter den Verteilungsbedingungen jedoch nicht möglich, da die GS in Konzentrationen weit unterhalb der *cmc* enthalten sind und somit keine Selbstaggregation zu Mizellen in der wässrigen Lösung stattfinden kann. Die ΔH^T -Werte sind für die GS-DPPC- und GS-SPC-Systeme in H_2O betragsmäßig kleiner als in 0,1 M NaCl und die ΔH^T -Differenzen zwischen den beiden Medien bei NaDC stärker ausgeprägt als bei NaC. Die SPC-Gemische zeigen bei 60°C größere ΔH^T -Differenzen zwischen H_2O und 0,1 M NaCl als bei 30°C. Insgesamt besitzen die Systeme mit den zwitterionischen Lipiden DPPC und SPC kleinere ΔH^T -Beiträge als solche, die aus dem negativ geladenen DPPG bestehen oder dieses PL anteilig in den DPPC/DPPG-Gemischen (1:1 und 3:1) enthalten.

3.1.2 Solubilisierung

3.1.2.1 Gallensalz-DPPC-Systeme

Die ITC wurde zur Charakterisierung der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung von GS-PL-Gemischen verwendet. Die Abb. 2.17 zeigt, dass der Solubilisierungsprozess durch alle drei Gebiete des Phasendiagramms verläuft. Die Detergentskonzentration liegt wesentlich über der *cmc*, so dass die vollständige Phasenumwandlung in einem Experiment erfasst wird.

Je ein Beispiel für ein Solubilisierungsexperiment von DPPC mit NaC und NaDC in 0,1 M NaCl ist in der Abb. 3.9 zu sehen. Die hochkonzentrierte GS-Lösung wird mit 50 Injektionen à 5 μ l aus der Spitze in die Messzelle gegeben, die die DPPC-Dispersion einer definierten Konzentration enthält. Im Wärmefluss-Zeit-Diagramm (Abb. 3.9) sind die ersten GS-Zugaben durch endotherme Peaks gekennzeichnet, die bei der Solubilisierung mit NaC (A') deutlich größer als bei der mit NaDC (A'') sind. In diesem Bereich werden die Wärmeeffekte durch die Demizellisierung der GS-Mizellen und die Verteilung der GS-Moleküle in den DPPC-Vesikeln hervorgerufen.

Die durch die Integration der Titrationspeaks erhaltene Reaktionswärme (B', B'') setzt sich aus der Demizellisierungsenthalpie ΔH_{demic} (Abb. 3.9: grüne Kurve) und der Transferenthalpie ΔH^T der Verteilung zusammen. Aus den ΔH -Werten für die Demizellisierung und die Verteilung sowie dem Verteilungskoeffizienten (Tab. 3.1) kann die Enthalpie $\Delta H_{GS}^{mic \rightarrow ves} \sim 5,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für den Anfangsbereich der Solubilisierungskurve (Abb. 3.9: rote Kurve) berechnet werden. Diese beinhalten den Transfer der GS-Moleküle aus den Mizellen in die Vesikel und stimmen gut mit den experimentellen Daten überein. Durch die weitere Zugabe der mizellaren GS-Lösung wird eine deutliche Änderung im Wärmeflussverlauf mit verhältnismäßig großen, exothermen Peaks sichtbar.

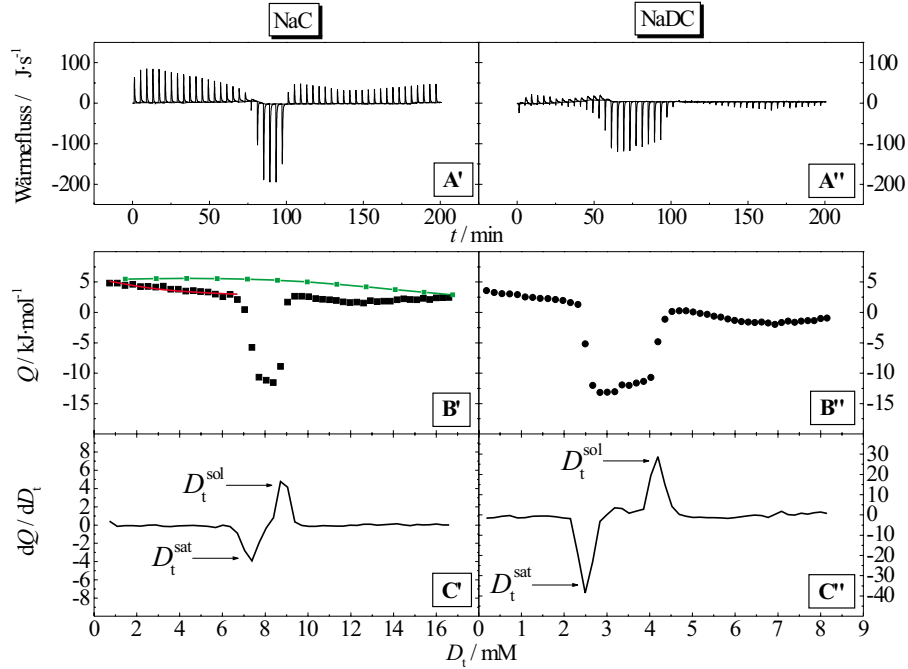


Abb. 3.9: ITC-Solubilisierungsexperiment: Titration ($50 \times 5 \mu\text{l}$) einer NaC- (100 mM, links) bzw. NaDC-Lösung (50 mM, rechts) in eine DPPC-Dispersion (6 mM) in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C : A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) molare Reaktionswärme Q als Funktion der Detergenskonzentration D_t , B') grüne Kurve: Demicellisierung von NaC, rote Kurve: anhand des Verteilungsmodells berechnete Werte für $\Delta H_{GS}^{\text{mic} \rightarrow \text{ves}} \sim 5,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, C) 1. Ableitung von B) mit den Extremstellen D_t^{sat} und D_t^{sol} für Sättigung bzw. Solubilisierung

Die nachfolgenden Injektionen rufen eine zweite Abweichung der enthalpischen Effekte hervor. Für das Experiment mit NaC werden wieder endotherme Peaks und für das mit NaDC sehr kleine, exotherme Peaks beobachtet.

Diese beiden „Knickpunkte“ im Wärmefluss-Zeit-Diagramm entsprechen den zwei Phasengrenzen der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung. Der erste „Knickpunkt“ steht für die kritische Konzentration der Sättigung der Vesikel mit Detergens D_t^{sat} . Die gebildeten MV der Zusammensetzung R_e^{sat} können keine weiteren Detergensmoleküle aufnehmen und beginnen, in MM der Zusammensetzung R_e^{sol} zu zerfallen. In diesem Koexistenzbereich, in dem MV und MM nebeneinander vorliegen, sind die Reaktionsenthalpien in Übereinstimmung mit der Phasenregel annähernd konstant (Abb. 3.9 B) und stammen vom Transfer der GS- und PL-Moleküle von MV zu MM [302]. Die Reaktionsenthalpien können anhand der folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\Delta H = -\frac{x^{\text{sat}}(1-x^{\text{sol}})}{x^{\text{sol}}-x^{\text{sat}}}\Delta H_{GS}^{\text{mic} \rightarrow \text{ves}} + \frac{(1-x^{\text{sol}})(1-x^{\text{sat}})}{x^{\text{sol}}-x^{\text{sat}}}\Delta H_{PL}^{\text{ves} \rightarrow \text{mm}} + \Delta H_{GS}^{\text{mic} \rightarrow \text{mm}} \quad (3.12)$$

$$\text{mit} \quad x^{sat} = \frac{R_e^{sat}}{1 + R_e^{sat}} \quad \text{und} \quad x^{sol} = \frac{R_e^{sol}}{1 + R_e^{sol}} \quad (3.13)$$

Für das Beispiel der Solubilisierung von DPPC mit NaC in 0,1 M NaCl bei 60°C beträgt die Reaktionswärme im Koexistenzbereich (Abb. 3.9 B') $\sim -11 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Unter Verwendung von $\Delta H_{GS}^{mic\rightarrow ves} \sim 5,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $x^{sat} = 0,160$ und $x^{sol} = 0,225$ (R_e -Werte: Tab. 3.5) ergibt sich $-10,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für den ersten Term der Gl. 3.12. Demzufolge sind der zweite und dritte Term der Gl. 3.12 von geringer Bedeutung. Im Fall eines idealen Mischungsverhaltens sollte $\Delta H_{GS}^{mic\rightarrow mm} = 0$ sein.

Der zweite „Knickpunkt“ entspricht der kritischen Konzentration für die Solubilisierung der Vesikel D_t^{sol} , bei der die Umwandlung der MV in MM abgeschlossen ist. Die geringen Wärmemengen oberhalb dieser Grenze entstehen durch nichtideale Mischungsverhältnisse bei der Injektion von GS-Mizellen in die MM-Lösung mit $\Delta H_{GS}^{mic\rightarrow mm} \neq 0$ und Verdünnungswärmen.

Für eine exakte Bestimmung der beiden Phasengrenzen (Abb. 3.9 C) empfiehlt sich die Bildung der ersten Ableitung der Reaktionswärme nach der totalen Detergenskonzentration dQ/dD_t . Die Extrema entsprechen den zwei kritischen Konzentrationen: Minimum $\equiv D_t^{sat}$ und Maximum $\equiv D_t^{sol}$. Diese werden für die Erstellung des Phasendiagramms verwendet (Abb. 3.10). Dafür wurden die Solubilisierungsexperimente bei verschiedenen DPPC-Konzentrationen in einem Bereich von 0,5-10 mM durchgeführt. Die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung der GS-DPPC-Systeme konnte wegen der relativ hohen Hauptphasenumwandlungstemperatur von DPPC nur bei 60°C untersucht werden. Neben den durch ITC ermittelten sind auch die durch DLS-Experimente erhaltenen Phasengrenzen eingefügt, auf die im Verlauf dieses Abschnitts noch näher eingegangen wird.

Aus den Phasendiagrammen ist erkennbar, dass die zwei Phasengrenzen mit einer Differenz von etwa 1-2 mM relativ dicht beieinander liegen. Die R_e -Werte ergeben sich aus dem Anstieg der Geraden, und die D_w -Werte sind die Ordinatenschnittpunkte (Abschnitt 2.3.3 u. Gl. 2.2). Sie sind in der Tab. 3.5 aufgelistet. Auf den ersten Blick wird ein klarer Unterschied zwischen den Systemen mit dem Trihydroxy-GS NaC und dem Dihydroxy-GS NaDC deutlich. Die Phasengrenzen befinden sich für NaDC im Vergleich zu NaC bei wesentlich geringeren Detergenskonzentrationen. Die Solubilisierung von DPPC erfolgt durch das stärker hydrophobe NaDC mit kleineren Detergenskonzentrationen als durch das stärker hydrophile NaC. Dieses Verhalten korreliert mit den cmc -Werten der beiden GS: $cmc_{NaDC} = 10,5 \text{ mM}$ u. $cmc_{NaC} = 19,5 \text{ mM}$ bei 60°C in H₂O [84].

Die Differenz zwischen den jeweiligen D_w^{sat} - und D_w^{sol} -Werten beträgt etwa 1 mM. Bei Lipidkonzentrationen $< 1,5 \text{ mM}$ für die NaC-DPPC- und $< 1 \text{ mM}$ für die NaDC-DPPC-Systeme in H₂O treten Abweichungen von der Linearität der Phasengrenzen auf.

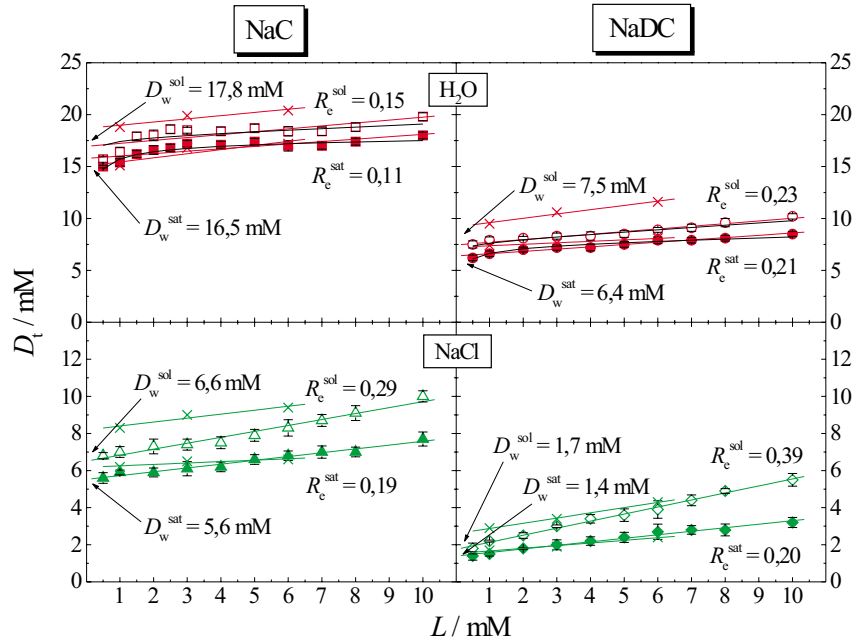


Abb. 3.10: Phasendiagramme für NaC-DPPC- und NaDC-DPPC-Systeme in H_2O bzw. $0,1\text{ M NaCl}$, $pH\ 7,5$, bei 60°C : Detergenskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L ; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} (geschlossene Symbole), D_t^{sol} (offene Symbole) mit linearer Regression (farbige Linien) bzw. Anpassung nach dem Modell von ROTH et al. [311] (schwarze Linien bei H_2O -Systemen [312]), Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat} , R_e^{sol} und Ordinatenschnittpunkte D_w^{sat} , D_w^{sol} ; DLS-Phasengrenzen (Kreuze)

Die tatsächlichen D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte liegen tiefer als die durch die Geradengleichungen ermittelten. In diesen Bereichen scheint das Aggregationsverhalten von der Zusammensetzung abhängig zu sein. Eine Beobachtung dieses Phänomens ist wegen des ITC-Detektionslimits unterhalb einer Lipidkonzentration von $0,5\text{ mM}$ nicht mehr möglich. Nach dem ursprünglichen 3-Stufen-Modell von LICHTENBERG [47, 207] besitzen die beiden Phasengrenzen (Abb. 2.16) den gleichen Ordinatenschnittpunkt: $D_w^{sat} = D_w^{sol} = D_w$. Solubilisierungsstudien mit anderen Detergentien, z.B. OG [292, 309, 313] und $C_{12}EO_8$ [304], zeigten auch die festgestellte Abweichung der Messdaten vom theoretischen Verhalten. Das Modell wurde von ROTH et al. [176, 311] für den Bereich niedriger Lipidkonzentrationen unter Berücksichtigung der finiten Größe der MM und der „Überschussenergie der Endkappen“ der zylinderförmigen MM erweitert. In den MM erfolgt durch die Umordnung der Moleküle eine GS-Anreicherung und eine PL-Verarmung in der Endkappenregion. Die nach diesem Modell berechneten Phasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC in H_2O stimmen insbesondere im Bereich niedriger Lipidkonzentrationen bei beiden GS besser mit den experimentellen Daten überein als die durch lineare Regression erhaltenen D_t -Geraden (Abb. 3.10). Während die R_e^{sol} -Werte von der linearen Regression

und dem Modell von ROTH et al. [311] relativ ähnlich sind, werden für R_e^{sat} wesentlich kleinere Werte bei Einbeziehung der „Endkappenenergie“ mit einem Wert von $2\epsilon = 20\text{--}22\text{ kT}$ im Vergleich zur linearen Regression erhalten (Tab. 3.5). Die 2ϵ -Werte sind umso kleiner, je größer die spontane Krümmung des Detergens ist. Sie hängen somit von der Geometrie des Detergens ab. Die ziemlich starren GS-Moleküle ergeben demnach mit $20\text{--}22\text{ kT}$ höhere Werte gegenüber denen von aliphatischen Alkylglucosiden OG mit $19,5\text{ kT}$ und Heptylglucosid mit 18 kT [311].

Tab. 3.5: ITC-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC und NaDC in H_2O bzw. $0,1\text{ M NaCl}$, pH 7,5, bei 60°C ; durch lineare Regression bzw. für H_2O nach dem Modell von ROTH et al. [311] in Klammern

	NaC + DPPC in H_2O	NaC + DPPC in NaCl	NaDC + DPPC in H_2O	NaDC + DPPC in NaCl
R_e^{sat}	0,11 (0,022)	0,19	0,21 (0,082)	0,20
R_e^{sol}	0,15 (0,13)	0,29	0,23 (0,21)	0,39
D_w^{sat}/mM	16,5 (18,0)	5,6	6,4 (8,0)	1,4
D_w^{sol}/mM	17,8 (18,0)	6,6	7,5 (8,0)	1,7

Für die Untersuchung des Ionenstärkeinflusses erfolgten die Messungen in $0,1\text{ M NaCl}$. Die höhere Ionenstärke des Mediums trägt durch die Reduzierung der elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen GS-Kopfgruppen zu einer Begünstigung der Aggregation bzw. einer Stabilisierung der Mizellen bei. Dies kann anhand der cmc -Werte belegt werden, die bei 60°C in H_2O wesentlich größer als in NaCl sind - NaC: $19,5\text{ mM} \rightarrow 14,2\text{ mM}$ und NaDC: $10,5\text{ mM} \rightarrow 4,1\text{ mM}$ [84]. Die Lage der Phasengrenzen und der D_w -Werte ist, verglichen mit H_2O , in NaCl zu geringeren Detergenkonzentrationen verlagert. Gegenüber H_2O verlaufen die Phasengrenzen in NaCl nicht annähernd parallel, sondern verbreitern sich mit steigender Lipidkonzentration, und weichen kaum von der Linearität ab. Die mit der Gl. 2.2 erhaltenen R_e^{sat} -Werte stimmen in beiden Medien etwa überein. Die R_e^{sol} -Werte hingegen liegen in NaCl um einiges höher (Tab. 3.5).

Die Trübungs- und DLS-Experimente von MEYUHAS et al. [314] ergaben an NaC-EPC-Gemischen mit steigender Ionenstärke abnehmende D_w -Werte. Die R_e -Werte ($R_e^{sat}=0,34$ u. $R_e^{sol}=0,63$) blieben aber im Gegensatz zu den für GS-DPPC-Systeme erzielten Ergebnissen von der Salzkonzentration unbeeinflusst. Dies ist vermutlich auf den hohen Anteil an ungesättigten FS im EPC zurückzuführen, so dass die EPC-Vesikel gegenüber dem GS-Angriff stabiler sind. Bei den meisten Untersuchungen, die in der Regel mit den oben genannten Methoden durchgeführt wurden, kam EPC zum Einsatz. Als R_e^{sat} - und R_e^{sol} -Werte wurden für NaC-EPC-Systeme nach PATERNOSTRE et al. [315] $0,3$ und $0,9$, nach

WALTER et al. [170] 0,25 und 0,67 bzw. für NaDC-EPC-Systeme nach LICHTENBERG et al. [169, 316] 0,25 und 0,75, nach ELORZA et al. [317] 0,3 und 1,0 sowie nach ZITA [318] 0,09 und 0,9 festgestellt. Darauf wird im Abschnitt 3.1.2.4 zur Solubilisierung von ungesättigten SPC-Membranen noch näher eingegangen.

Die für die GS-DPPC-Systeme ermittelten R_e -Werte befinden sich unter denen für nicht-ionische Detergentien. Bei $C_{12}EO_6$ -POPC-Gemischen fanden HEERKLOTZ et al. [319] $R_e^{sat}=1,5$ und $R_e^{sol}=5,0$ bei 25°C . Bei den von WENK und SEELIG [309] untersuchten OG-POPC-Mischungen konnten $R_e^{sat}=1,3$ und $R_e^{sol}=2,8$ bei 28°C gemessen werden. Die Solubilisierungsstudien von KELLER et al. [292] an OG-DPPC-Systemen bei 70°C ergaben $R_e^{sat}=1,5$ und $R_e^{sol}=1,9$. Der höchste für die Solubilisierung von DPPC mit GS erzielte R_e^{sol} -Wert beträgt für NaDC in NaCl 0,39. Da R_e die Detergens/Lipid-Zusammensetzung der Mischaggregate widerspiegelt, wird deutlich, dass die GS Membranen wesentlich effektiver als nicht-ionische Detergentien solubilisieren. Der in den MV und MM enthaltene, für die Sättigung bzw. Solubilisierung der Vesikel erforderliche Detergensanteil ist bei den GS viel geringer als bei OG [313] oder $C_{12}EO_n$ [320].

Die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung wurde ebenfalls mit der DLS-Methode untersucht, um nähere Informationen zur Partikelgröße der Mischaggregate zu erhalten sowie die Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen mit einer geeigneten Referenzmethode zur ITC zu bestimmen. Die Titration der mizellaren GS-Lösung zu einer DPPC-Dispersion erfolgte mit $20 \mu\text{l}$ -Zugaben bei 55°C , um oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur von DPPC zu arbeiten. Die nach jeder GS-Injektion ermittelten Autokorrelationsfunktionen sind in der Abb. 3.11 dargestellt und lassen für die drei Bereiche des Phasendiagramms klare Unterschiede im Verlauf erkennen, deren markierte Grenzen aus dem ITC-Experiment übernommen wurden. Für einige ausgewählte GS-Zugaben dieses Beispiexperimentes enthält die Abb. 3.12 die Streuintensitätskurven in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius R_h .

Die reinen DPPC-Vesikel mit einem durchschnittlichen R_h -Wert von ~ 50 nm besitzen aufgrund der Ultraschallherstellung eine breitere Verteilung im Vergleich zu extrudierten Vesikeln. Die initiale Größe der DPPC-Vesikel bewegte sich bei den Experimenten zwischen 30 und 60 nm. Durch die GS-Zugabe sinkt die Partikelgröße im MV-Bereich des Beispiexperimentes (Abb. 3.12) auf $R_h \sim 30$ nm. Im Koexistenzbereich treten neben größeren Aggregaten mit $R_h \sim 15$ nm auch sehr kleine Partikel mit $R_h \sim 1,5$ nm auf. Im MM-Bereich nimmt die Partikelgröße mit steigendem Detergensanteil weiter ab, bis ein konstanter R_h -Wert erreicht wird. Dieser beträgt sowohl bei den NaC-DPPC- als auch bei den NaDC-DPPC-Gemischen $\sim 1,5$ nm.

Diese Werte können insbesondere in der Nähe der Phasengrenzen und im Koexistenzbereich nur als Anhaltspunkte dienen, da die Vesikel-Mizell-Umwandlung verschiedene

Intermediate (Abb. 2.16), z.B. geöffnete Vesikel und stäbchenförmige MM, aufweist. Deren genaue Größe und Form ist mit der DLS nicht ermittelbar, da die Größenanalyse auf der Basis der STOKES-EINSTEIN-Beziehung (Gl. 2.13) von sphärischen Partikeln ausgeht.

Die Ergebnisse der DLS-Experimente der NaC-DPPC- und NaDC-DPPC-Systeme in H₂O bzw. NaCl werden für die drei untersuchten DPPC-Konzentrationen in der Abb. 3.13 gezeigt. Die DLS-Phasengrenzen sind durch den Beginn bzw. das Ende des steil abfallenden Kurvenabschnittes gekennzeichnet und ergeben sich aus den Schnittpunkten der extrapolierten Kurvenabschnitte. Die senkrechten Linien entsprechen den durch ITC bestimmten Phasengrenzen D_t^{sat} für 1 mM und D_t^{sol} für 6 mM DPPC. Daraus lässt sich eine gute Übereinstimmung der mit beiden Methoden erhaltenen Phasengrenzen erkennen.

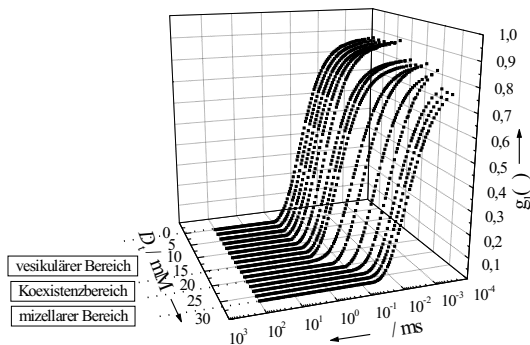


Abb. 3.11: DLS-Solubilisierungsexperiment: Titration (15x20 μ l) von DPPC-Vesikeln (6 mM) mit einer NaC-Lösung (150 mM) in H₂O, pH 7,5, bei 55°C: Autokorrelationsfunktionen bei steigender Detergentskonzentration D_t

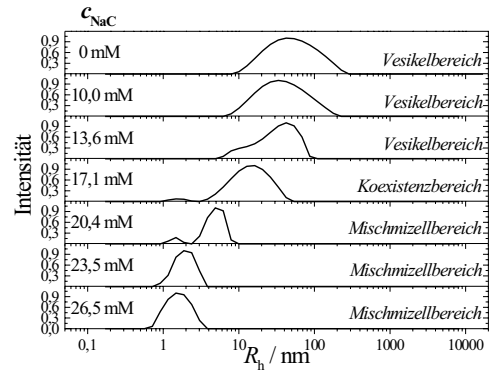


Abb. 3.12: DLS-Partikelgrößenverteilungskurven (ungewichtet) für die Solubilisierung von DPPC-Vesikeln (6 mM) mit NaC (150 mM) in H₂O, pH 7,5, bei 55°C: Änderung der Partikelgrößenverteilung mit steigender Detergentskonzentration D_t

Im MV-Bereich unterhalb von D_t^{sat} sinkt die Größe der Vesikel mit steigender GS-Zugabe. Bei den meisten Trübungs- und DLS-Studien mit anderen Detergens-PC-Gemischen, z.B. mit OG [178, 179, 181, 182, 298], Triton X-100 [184, 185], Alkylsulfaten [191, 192], Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTAC) [193] und dem zwitterionischen GS-Derivat 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonat (CHAPS) [321], konnte eine Zunahme der Vesikelgröße durch den Zusatz von Detergens ermittelt werden. Für OG-PC-Systeme stellten PATERNOSTRE et al. [315] hingegen eine Abnahme der Partikelgröße fest. In dieser Region des Phasendiagramms werden die Vesikel teilweise solubilisiert. Da die Detergenskonzentration für die Vesikel-Mizell-Umwandlung noch nicht ausreicht, sind die gebildeten MM instabil. Es erfolgt eine Revesikulierung [181]. Die gebildeten MV werden größer oder kleiner, je nachdem, ob sich die initiale Größe der Vesikel unter- oder oberhalb ihrer Gleichgewichtsgröße befindet [322].

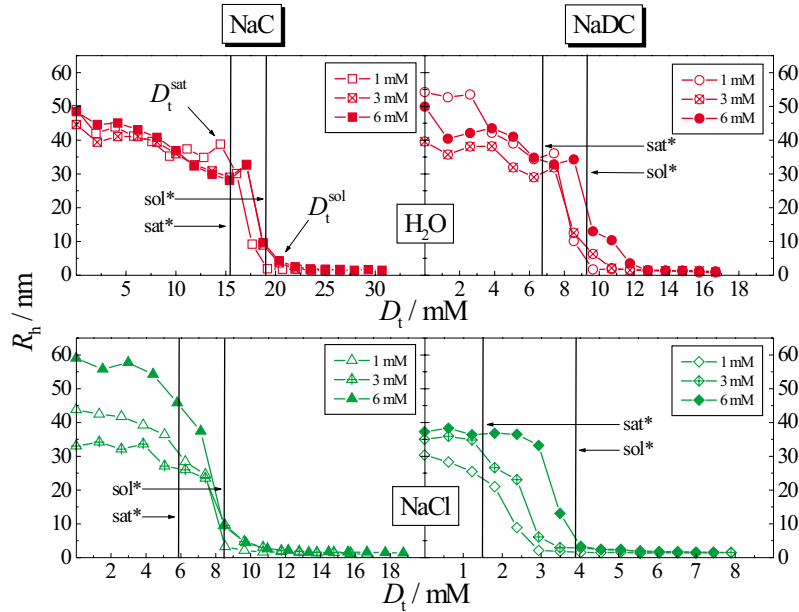


Abb. 3.13: DLS-Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC- und NaDC-Lösungen in H_2O (150, 100 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100, 50 mM), pH 7,5, bei $55^\circ C$: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergentskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung (sat^* : 1 mM DPPC) und Solubilisierung (sol^* : 6 mM DPPC)

Ein starkes Vesikelwachstum ist beim Einbau von GS-Molekülen nicht zu erwarten, da die für die GS-DPPC-Gemische ermittelten R_e -Werte (Tab. 3.5 u. 3.6) viel kleiner sind als die für die oben genannten Detergentien. Die vollständige Solubilisierung von PC-Vesikeln erfordert deutlich weniger GS-Anteil im Vergleich zu anderen Detergentien. Die Vesikelgröße vor Beginn des Solubilisierungsprozesses liegt mit $R_h \sim 30$ nm noch wesentlich über der minimalen Größe der durch Ultraschall hergestellten PC-SUV. Der kritische Radius beträgt etwa 11 nm, unterhalb dem die energetisch ungünstigen Aggregate zu MLV fusionieren [188]. DLS-Messungen von MAZER et al. [138, 323, 324] erbrachten für GS-PC-MV eine Partikelgröße von $R_h \sim 12-15$ nm, die nur wenig von der minimalen Größe der reinen SUV abweicht.

Im MM-Bereich oberhalb von D_t^{sol} sinkt die Größe der Mizellen mit steigender GS-Zugabe bis auf $R_h \sim 1,5$ nm. Die Detergens-reichen MM besitzen eine höhere spontane Krümmung. Die Zylinder- bzw. Persistenzlänge der stäbchenförmigen MM nimmt ab. Es kommt zu einer Annäherung an eine sphärische Mizellform [146]. Die von MAZER et al. ermittelte minimale Größe von GS-PC-MM liegt im Bereich von $R_h \sim 1,5-3,5$ nm [323], die von reinen GS-Mizellen bei $R_h \sim 1,0-1,5$ nm [79, 80, 137].

Die DLS-Phasengrenzen sind in der Abb. 3.10 zu denen der ITC-Experimente hinzugefügt. Die Tab. 3.6 fasst die durch DLS erhaltenen R_e - und D_w -Werte zusammen. Während die

D_w^{sat} -Werte bei beiden Methoden gut korrelieren, liegen die D_w^{sol} -Werte der DLS etwas höher als die der ITC und haben eine breitere D_w -Differenz für die Lichtstreuungsmessungen. Dies ist auf die größeren Injektionsvolumina von 20 μl bei der DLS-Titration zurückzuführen, die aufgrund der experimentellen Gegebenheiten (Abschnitt A.3.2) nicht weiter reduziert werden konnten. Die bei der ITC verwendeten Injektionsschritte von 5 μl gestatten eine wesentlich höhere Auflösung und exaktere Bestimmung der Phasengrenzen.

Tab. 3.6: DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC und NaDC in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C

	NaC + DPPC in H_2O	NaC + DPPC in NaCl	NaDC + DPPC in H_2O	NaDC + DPPC in NaCl
R_e^{sat}	0,31	0,08	0,14	0,14
R_e^{sol}	0,37	0,21	0,41	0,28
D_w^{sat}/mM	15,0	6,2	7,2	1,5
D_w^{sol}/mM	18,7	8,2	9,2	2,6

Im Vergleich zur ITC ergeben sich bei den DLS-Messungen in H_2O leicht höhere und in NaCl etwas niedrigere R_e -Werte. Die Abweichungen besitzen allerdings keine größere Bedeutung, da die Werte in der gleichen Größenordnung sind. Die ITC ermöglichte eine genauere Bestimmung der Phasengrenzen, da diesen mehr Datenpunkte als denen der DLS zugrunde gelegt sind.

Da die DLS-Methode keine exakten Informationen zur Struktur der Aggregate in der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung liefert, wurden für die Aufklärung der verschiedenen Aggregationstypen SANS-Messungen am System NaDC-DPPC in 0,1 M NaCl bei 60°C durchgeführt. Die Gemische enthielten DPPC-Dispersionen mit einer konstanten Konzentration von 6 mM und einem variierenden NaDC-Anteil zwischen 1,5 und 10 mM. Der Abb. 3.14 A sind die für die fünf untersuchten NaDC-DPPC-Gemische erhaltenen Streukurven als Funktion des Streuvektors q zu entnehmen.

Die Interpretation der SANS-Spektren [325] erfolgte für die niedrigste (1,5 mM: Abb. 3.14 B) und die höchste (10 mM: Abb. 3.14 F) NaDC-Konzentration unter Anwendung des Vesikel-Mizell-Modells [326] und für die intermediären NaDC-Konzentrationen (3,5 mM: Abb. 3.14 C; 5,5 mM: Abb. 3.14 D; 7,5 mM: Abb. 3.14 E) auf der Basis der GUINIER-Analyse [327, 328]. Der Exponent des Streuvektors, die sogenannte q -Domäne, enthält Informationen über den Aggregattyp [190]. Während q^{-2} auf die Streuung von Vesikeln hinweist, ergibt sich q^{-1} aus der Streuung von stäbchenförmigen Mizellen und q^0 aus der von sphärischen Mizellen.

Dem NaDC-DPPC-System mit 1,5 mM NaDC (B), das sich im MV-Bereich des Phasendiagramms befindet, wird das Modell der konzentrischen Ellipsoide zugrunde gelegt. Diese Ellipsoide sind durch ihre große Halbachse a und kleine Halbachse b gekennzeichnet, die je einen Wert für die innere (Index'1') und äußere (Index'2') Monoschicht der Vesikel besitzen. Aus dieser Differenz kann die Membrandicke in Richtung der großen d_a und der kleinen d_b Halbachse abgeleitet werden. Es wurden folgende Werte ermittelt: $a_1 = 128,3 \pm 3,6$ nm, $a_2 = 134,8 \pm 3,7$ nm, $b_1 = 57,0 \pm 1,0$ nm und $b_2 = 59,9 \pm 1,0$ nm sowie $d_a = 6,5$ nm und $d_b = 2,9$ nm. Die verschiedenen Membrandicken der beiden Halbachsen deuten auf eine unterschiedliche Detergensdichte in der Membran hin. Die Exzentrizität, die Verschiebung gegenüber dem Mittelpunkt, beträgt $\epsilon = 2,25$, woraus die Deformation der Vesikel von sphärischer zu ellipsoider Gestalt hervorgeht. Die Polydispersität, die durch eine Gauß-Verteilung beschrieben wird, hat einen Wert von 0,28.

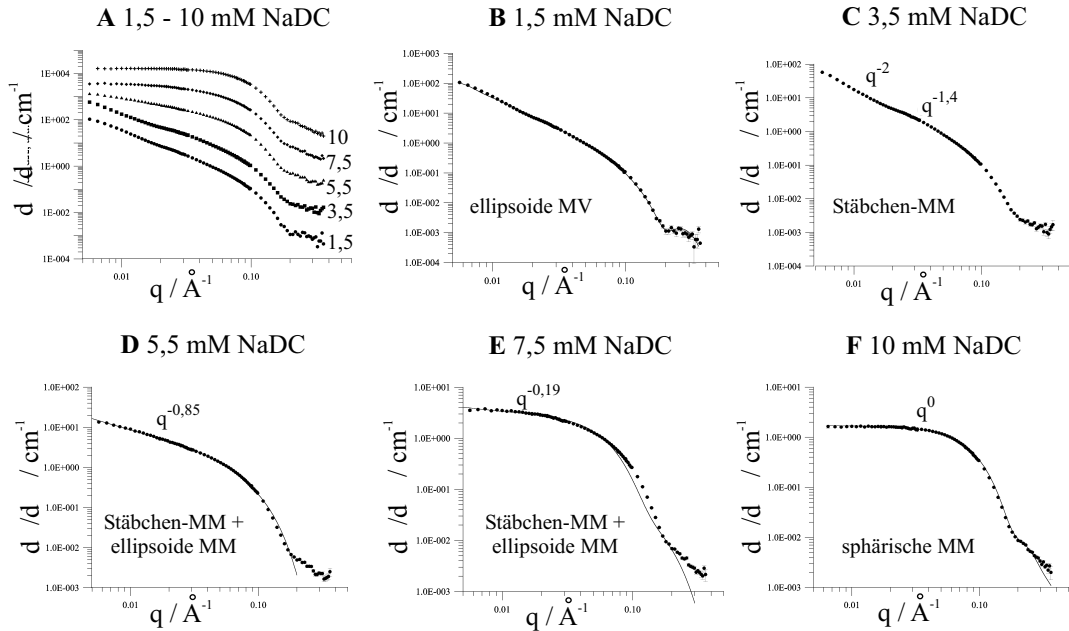


Abb. 3.14: SANS-Streukurven zur Solubilisierung von DPPC-Vesikeln (6 mM) mit NaDC (Zusatz von 1,5; 3,5; 5,5; 7,5; 10 mM) in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C: Streuintensität $d\Sigma/d\Omega$ vs. Streuvektor q

Die Streukurven der Mischungen mit 3,5, 5,5 und 7,5 mM NaDC verdeutlichen ein komplexes Streuverhalten und wurden deshalb unter Verwendung der GUINIER-Analyse ausgewertet. Das NaDC-DPPC-System mit 3,5 mM NaDC (C), das in den Koexistenzbereich des Phasendiagramms einzuordnen ist, kann in zwei q -Regionen unterteilt werden. Dies entspricht dem Streuverhalten von flexiblen, polymerartigen Mizellen. Aus dem Schnittpunkt der beiden q -Regionen [151] wird die Persistenzlänge $l_p = 19$ nm berechnet, die mit der von HJELM et al. [142] (17 nm) bzw. der von PEDERSEN et al. [151] (18 nm) erhaltenen korreliert. Diese Ergebnisse werden durch kombinierte Lichtstreu- und cryo-

TEM-Resultate mit $l_p = 22$ nm von EGELHAAF et al. [198, 199] gestützt. Der ellipsoide Querschnitt der Stäbchenmizellen mit einer Exzentrizität von 1,6 wird durch $a = 3,3$ nm und $b = 2,1$ nm beschrieben. Ähnliche Werte wurden von LONG et al. [149, 150] für GS-PC-Systeme gewonnen, wobei die Enden der Stäbchen-MM jeweils sechs GS-Moleküle besitzen und der Mizellkern von einer 1 nm dicken Hydrathülle umgeben ist. Bei diesem, dem Koexistenzbereich entstammenden Gemisch konnte nur eine Aggregatspezies von polymerartigen Mizellen ermittelt werden.

Das NaDC-DPPC-System mit 5,5 mM NaDC (D), das wie die beiden Systeme mit 7,5 bzw. 10 mM zum MM-Bereich des Phasendiagramms gehört, besteht mit $q^{-0,85}$ aus einer Mischung von stäbchenförmigen und ellipsoiden Mizellen. Die stäbchenförmigen MM haben im Gegensatz zu den Gemischen mit 3,5 mM NaDC einen sphärischen Querschnitt mit einem Radius von 2,3 nm. Die ellipsoiden Mizellen werden durch die große Halbachse $a = 9,5$ nm, die kleine Halbachse $b = 2,1$ nm sowie eine Exzentrizität von $\epsilon = 4,5$ charakterisiert. Diese Werte stimmen sehr gut mit SANS-Daten von HJELM et al. [142] überein, die für die Ellipsoidparameter $a = 10,9$ nm und $b = 2,2$ nm erhielten.

Das NaDC-DPPC-System mit 7,5 mM NaDC (E) mit $q^{-0,19}$ zeigt eine deutliche Annäherung an eine sphärische Mizellform. Die Exzentrizität der hierbei auftretenden ellipsoiden MM sinkt auf $\epsilon = 3$, da die große Halbachse mit $a = 6,3$ nm gegenüber dem 5,5 mM-System kleiner ist. Die kleine Halbachse b ist wiederum 2,1 nm lang. Ellipsoide Mizellen kommen sowohl im Gemisch mit 5,5 mM als auch in dem mit 7,5 mM NaDC vor. Das Verhältnis der Konzentrations-Volumen-Produkte beider Systeme (5,5 mM : 7,5 mM) hat einen Wert von 0,1. Das Gemisch mit dem höheren NaDC-Anteil von 7,5 mM enthält demzufolge die zehnfache Menge an ellipsoiden Mizellen im Vergleich zum 5,5 mM-System. Daraus wird abgeleitet, dass mit steigendem GS-Anteil in den MM die Umwandlung von stäbchenförmigen in ellipsoide Mizellen fortschreitet. Der Hauptanteil der MM hat bei 5,5 mM NaDC eine stäbchenförmige und bei 7,5 mM NaDC eine ellipsoide Gestalt.

Das NaDC-DPPC-System mit 10 mM NaDC (F) wurde auf der Basis des konzentrischen Ellipsoid-Modells ausgewertet. In diesem Fall ergab sich eine Exzentrizität von $\epsilon = 1$, die auf eine sphärische Gestalt der MM hinweist. Als Mizellradius wurden 2,2 nm errechnet. Dieser Wert korreliert gut mit den durch DLS erhaltenen R_h -Werten für den MM-Bereich von 1,5 nm. Der Mizellradius entspricht dabei etwa der halben Membrandicke [329] von reinen DPPC-Vesikeln. Diese Membrandicke beträgt 4,3 nm [147]. Die Polydispersität hat einen Wert von 0,23. Der von HJELM et al. [143] berechnete Mizellradius ist 2,5 nm.

Bei den SANS-Experimenten von HJELM et al. [141–144] wurden die mischmizellaren GS-PC-Lösungen bis in den Vesikelbereich verdünnt. Durch diesen Experimentieransatz konnten die oben beschriebenen Aggregatspezies in umgekehrter Reihenfolge erhalten werden. Auch bei diesen Studien wurden nur flexible, polymerartige MM als Intermediate

ermittelt. Eine Koexistenz von MV und MM ist nicht nachgewiesen worden, sondern das Auftreten von Polymer-Netzwerken bei der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung [143]. Auch SANS-Experimente von EGELHAAF et al. [330, 331] lassen auf die Existenz von Polymer-Netzwerken als Intermediärstrukturen bei GS-PC-Systemen schließen. Die dabei vorgenommene Verdünnung von GS-PC-MM lieferte zusätzliche Informationen über die Kinetik der Umwandlung: die Transformation der MM in Intermediate geschieht sehr schnell, die in Vesikel recht langsam [174, 332].

Die durchgeführten ITC-, DLS- und SANS-Studien ermöglichen die Charakterisierung der Solubilisierung von DPPC-Membranen durch den Zusatz von GS-Mizellen. Bei den Experimenten mit diesen Verfahren kamen ausschließlich Vesikel in der fluiden, flüssig-kristallinen L_α -Phase zum Einsatz. Die Untersuchungen der Phasenumwandlung in der Gelphase sind mit den oben genannten Messmethoden wegen der langsamen Kinetik von Detergenseinbau und Membran-Flip-Flop schwierig. Deshalb wurde der Effekt von GS auf DPPC-Vesikel zusätzlich mit der DSC untersucht. Die Abb. 3.15 enthält die DSC-Thermogramme der NaC-DPPC- und der NaDC-DPPC-Systeme in H_2O bzw. 0,1 M NaCl.

Für beide Medien sind die Aufheizkurven von reinen DPPC-Vesikeln und von GS-DPPC-Gemischen mit unterschiedlichem GS-Anteilen dargestellt. Die Zusammensetzung der Gemische orientierte sich an den durch ITC ermittelten Phasendiagrammen.

Die unterste Aufheizkurve von reinen DPPC-Vesikeln lässt das typische Wärmekapazitätsprofil mit der Vorumwandlung ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) bei $T_p=36^\circ C$ und der Hauptphasenumwandlung ($P_{\beta'} \rightarrow L_\alpha$) bei $T_m=41,4^\circ C$ erkennen. Die Anwesenheit von geringen GS-Mengen führt bereits zur Verschiebung des Hauptumwandlungspeaks zu tieferen Temperaturen sowie zum vollständigen Verschwinden des Vorumwandlungspeaks. Ähnliche Resultate lieferten die Experimente von ZITA [318] mit NaDC-DPPC sowie von TOMOAI COTISEL und LEVIN [333] an Ursodesoxycholat-DPPC-Gemischen.

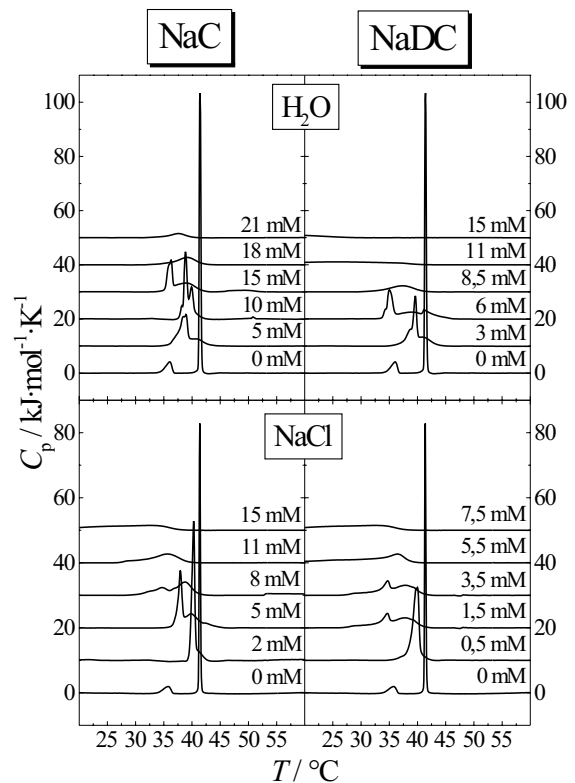


Abb. 3.15: DSC-Wärmekapazitätskurven von DPPC (6 mM) mit unterschiedlichen Anteilen an NaC bzw. NaDC in H_2O oder 0,1 M NaCl, pH 7,5, im Temperaturbereich $20-60^\circ C$

Bei höheren GS-Konzentrationen treten zwei Peaks auf: ein schärferer bei niedrigerer und ein breiterer bei höherer Temperatur. Das ist auf das Vorliegen von Vesikeln in zwei verschiedenen Phasen, der Gel- und der flüssigkristallinen Phase, zurückzuführen. POLOZOVA et al. [334] und FORTE et al. [335] fanden bei GS-DPPC-Systemen ebenfalls eine derartige Aufspaltung in verschiedene Peaks. Mit steigendem GS-Anteil wird T_m zu tieferen Temperaturen im Vergleich zu reinem DPPC verschoben. Es kommt zu einer Verbreiterung der Peaks, d.h. einer Verringerung der Kooperativität der Phasenumwandlung, und einer Abnahme der der Umwandlungsenthalpie entsprechenden Peakfläche. Dieses Verhalten wurde auch bei DSC-Studien von MÜLLER [336], von SPINK et al. [337, 338] an Mischungen von DPPC mit Taurin-konjugierten GS sowie von BAYERL et al. [339] an Gemischen von NaC bzw. NaDC mit DPPC festgestellt.

Der Hauptumwandlungspeak verschwindet aber im Gegensatz zur Phasenumwandlung im flüssigkristallinen Zustand erst bei wesentlich höheren GS-Konzentrationen. Die MV enthalten in der Gelphase deutlich weniger Detergens. Beim Aufheizen erfolgt die Umwandlung von Gelphasen-Vesikeln, die mit MM koexistieren, in den mischmizellaren Zustand.

3.1.2.2 Gallensalz-DPPG-Systeme

Für die Untersuchung des Einflusses der PL-Kopfgruppe auf die Solubilisierung durch GS wurde das negativ geladene DPPG ausgewählt. Die Durchführung der ITC-Experimente erfolgte analog denen mit dem neutralen DPPC bei 60°C in 0,1 M NaCl. Zur Erstellung der Phasendiagramme wurden DPPG-Dispersionen mit definierten Konzentrationen in einem Bereich zwischen 0,5 und 10 mM vermessen. Die Ermittlung der beiden kritischen Detergenskonzentrationen D_t^{sat} und D_t^{sol} geschah wie oben beschrieben.

In der Abb. 3.16 sind die Phasendiagramme für die Solubilisierung von DPPG durch NaC und NaDC dargestellt. Die R_e^{sat} - und R_e^{sol} - sowie die D_w^{sat} - und D_w^{sol} -Werte konnten aus den Anstiegen bzw. Ordinaten Schnittpunkten der Phasengrenzen durch lineare Regression erhalten werden, da wie bei den DPPC-Systemen in 0,1 M NaCl ein annähernd lineares Verhalten auftritt. Die Kenngrößen für die Sättigung und die Solubilisierung sind in der Tab. 3.7 zusammengefasst. Der Abstand der Phasengrenzen zueinander wird in der NaCl-Lösung mit steigender Lipidkonzentration breiter. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Solubilisierung des neutralen DPPC wird auch bei der des negativ geladenen DPPG der Unterschied zwischen den beiden GS sichtbar. Die D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte liegen für das stärker hydrophobe Dihydroxy-GS mit der kleineren cmc von 4,1 mM unterhalb derer des stärker hydrophilen Trihydroxy-GS mit der größeren cmc von 14,2 mM (cmc -Werte: 0,1 M NaCl, 60°C [84]). Der Vergleich der D_w -Werte ergibt für die DPPG-Solubilisierung eine geringere Differenz zwischen NaC und NaDC von $\sim 3,5$ mM gegenüber der DPPC-Solubilisierung mit $\sim 4,5$ mM Unterschied zwischen NaC und NaDC.

Die beiden Phasendiagramme zeigen, dass auch im Fall der DPPG-Solubilisierung eine Differenz zwischen D_w^{sat} und D_w^{sol} auftritt, die aber geringer als die bei den DPPC-Phasengrenzen ist. Die Ordinatenschnittpunkte der Phasengrenzen liegen bei DPPG tiefer als bei DPPC. Da diese Parameter mit der Bildung der MM korrelieren, wird deutlich, dass die DPPG-Vesikel-Mizell-Umwandlung bei niedrigeren Detergenskonzentrationen abläuft.

Der Vergleich der R_e -Werte lässt analog dem DPPC größere Unterschiede zwischen R_e^{sat} und R_e^{sol} bei den NaDC-DPPG- gegenüber den NaC-DPPG-Systemen erkennen. Im Gegensatz zum DPPC besitzen die NaDC-DPPG- kleinere und die NaC-DPPG-Gemische größere R_e -Werte. Da R_e dem Detergens/Lipid-Verhältnis der gemischten Aggregate entspricht, kann daraus abgeleitet werden, dass weniger NaDC-, aber mehr NaC-Moleküle zur Solubilisierung der DPPG-Vesikel im Vergleich zu den DPPC-Vesikeln erforderlich sind.

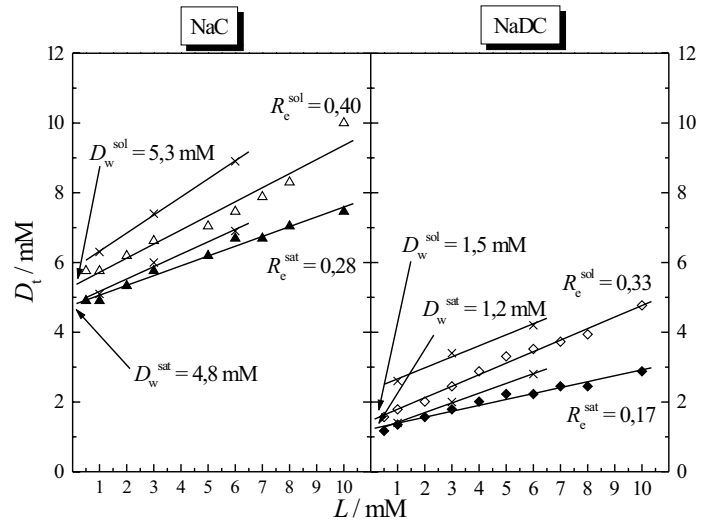


Abb. 3.16: Phasendiagramme für NaC-DPPG- und NaDC-DPPG-Systeme in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C: Detergenskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L ; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} (geschlossene Symbole), D_t^{sol} (offene Symbole), Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat} , R_e^{sol} , Ordinaten-schnittpunkte D_w^{sat} , D_w^{sol} ; DLS-Phasengrenzen (Kreuze)

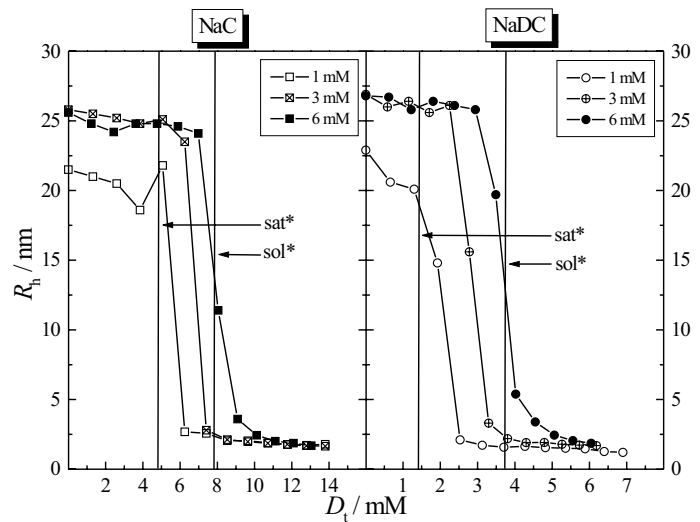


Abb. 3.17: DLS-Solubilisierung von DPPG-Vesikeln mit NaC- und NaDC-Lösungen in 0,1 M NaCl (100, 50 mM), pH 7,5, bei 55°C: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergenskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat*: 1 mM, sol*: 6 mM DPPG)

Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die DPPG-Solubilisierung bei niedrigeren GS-Konzentrationen als die von DPPC erfolgt. Dieses Ergebnis stimmt mit Resultaten von KELLER [298] überein, der für die zur Solubilisierung erforderliche OG-Konzentration die gleiche Tendenz - DPPG < DPPC - ermittelte. Die elektrostatische Abstoßung zwischen den GS-Molekülen und der negativ geladenen DPPG-Membran scheint kein limitierender Faktor für die Vesikel-Mizell-Umwandlung zu sein, da in diesem Fall die DPPG-Vesikel stabiler gegenüber dem Detergensangriff wären als die DPPC-Vesikel. Die Packung der Lipidmoleküle in der Membran und die damit verbundene spontane Krümmung der Vesikel besitzt höchstwahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss [340].

Dies wird anhand der durchgeführten DLS-Experimente zur Solubilisierung von DPPG mit den beiden GS deutlich (Abb.3.17). Die DPPC- als auch die DPPG-Vesikel wurden mittels Ultraschall unter den gleichen Bedingungen präpariert. Die erhaltenen DPPG-Vesikel weisen eine kleinere Ausgangsgröße von etwa 25 nm gegenüber den DPPC-Vesikeln auf. Dies deutet auf eine größere spontane Krümmung der DPPG-Vesikel hin. Die in der Abb.3.17 eingefügten ITC-Phasengrenzen lassen eine gute Übereinstimmung der mit ITC und DLS bestimmte D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte erkennen. Im Gegensatz zum DPPC sinkt die Vesikelgröße bei den GS-DPPG-Gemischen im MV-Bereich kaum ab. Im MM-Bereich wird wie bei den GS-DPPC-Systemen ein R_h -Wert von $\sim 1,5$ nm erreicht.

Die durch die DLS-Experimente erhaltenen R_e - und D_w -Werte sind in der Tab. 3.7 aufgelistet. Der Vergleich der beiden Methoden erbringt keine Unterschiede in den D_w^{sat} -Werten. Die D_w^{sol} - und die R_e -Werte hingegen, die durch DLS ermittelt wurden, sind etwas größer als die ITC-Werte. Dies ist wiederum auf die höheren Injektionsvolumina bei den DLS-Versuchen zurückzuführen.

Tab. 3.7: ITC-, DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPG-Vesikeln mit NaC und NaDC in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C

	NaC + DPPG	NaDC + DPPG
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,28 / 0,35	0,17 / 0,26
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,40 / 0,52	0,33 / 0,32
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	4,8 / 4,8	1,2 / 1,1
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	5,3 / 5,8	1,5 / 2,3

3.1.2.3 Gallensalz-DPPC/DPPG-Systeme

Im Folgenden wird die Solubilisierung von DPPC/DPPG-Gemischen in den molaren Verhältnissen 3:1 und 1:1 durch die beiden GS NaC und NaDC in 0,1 M NaCl bei 60°C behandelt. Die Gesamtlipidkonzentration lag ebenfalls im Bereich von 0,5 bis 10 mM.

Die Abb. 3.18 zeigt die Phasendiagramme für die Solubilisierung der gemischten Vesikel im Verhältnis 3:1. Die Phasengrenzen weisen eine lineare Abhängigkeit und eine Verbreiterung mit zunehmender Lipidkonzentration auf. Dieses Verhalten korreliert mit dem bei DPPC und DPPG ermittelten in 0,1 M NaCl.

Zwischen den beiden GS ist ein deutlicher Unterschied in der Lage der Phasengrenzen sichtbar. Die D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte sind für NaC bei wesentlich höheren GS-Konzentrationen als für NaDC, wie bereits bei der Solubilisierung der Einzelkomponenten DPPC und DPPG beobachtet wurde. Beim Vergleich mit den beiden reinen Lipiden wird festgestellt, dass sich die Phasengrenzen der gemischten DPPC/DPPG(3:1)-Systeme etwa 3-4 mM oberhalb derer von DPPG als auch von DPPC befinden.

Die Differenz der D_w -Werte liegt bei den NaC-haltigen Gemischen zwischen DPPG und DPPC, bei den NaDC-haltigen ist sie mit 0,1 mM kleiner als bei den Einzelkomponenten.

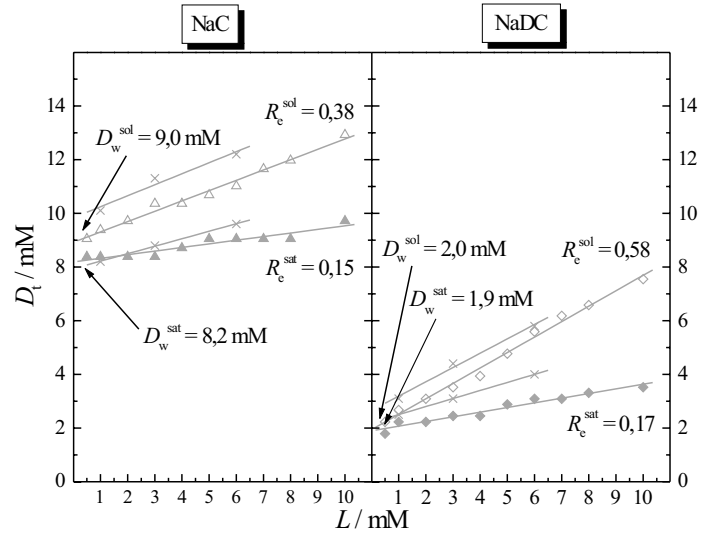


Abb. 3.18: Phasendiagramme für NaC-DPPC/DPPG(3:1)- und NaDC-DPPC/DPPG(3:1)-Systeme in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C: Detergentskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L ; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} (geschlossene Symbole), D_t^{sol} (offene Symbole), Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat} , R_e^{sol} , Ordinaten Schnittpunkte D_w^{sat} , D_w^{sol} ; DLS-Phasengrenzen (Kreuze)

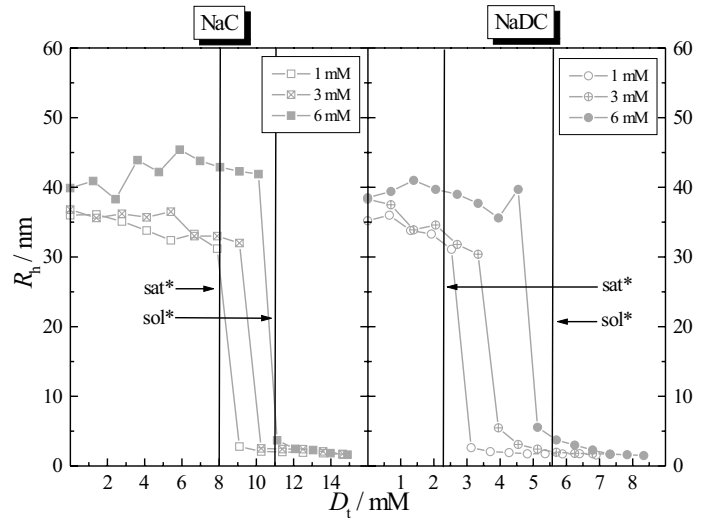


Abb. 3.19: DLS-Solubilisierung von DPPC/DPPG(3:1)-Vesikeln mit NaC- und NaDC-Lösungen in 0,1 M NaCl (100, 50 mM), pH 7,5, bei 55° C: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergentskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat*: 1 mM, sol*: 6 mM DPPC/DPPG(3:1))

Gegenüber dem neutralen DPPC treten bei dem 3:1-Gemisch geringfügig kleinere R_e^{sat} -Werte auf. Da es sich dabei um ein Maß für die Stabilität der Vesikel handelt, sind die DPPC/DPPG-Mischvesikel schon bei kleineren GS-Anteilen gesättigt als die DPPC-Vesikel. Die R_e^{sol} -Werte des DPPC liegen aber deutlich niedriger als die der 3:1-Gemische. Demzufolge ist für die minimal erforderliche MM-Zusammensetzung ein größerer GS-Anteil für die Lipidmischungen als für DPPC notwendig. Bei der Gegenüberstellung mit dem negativ geladenen DPPG wird erkennbar, dass die R_e -Werte der DPPC/DPPG(3:1)-Mischungen für NaC kleiner, für NaDC aber eindeutig größer sind. R_e^{sol} des 3:1-Gemisches hat fast den doppelten Betrag von DPPG. Die R_e -Werte der DPPC/DPPG-Systeme verhalten sich wie die von DPPC, gegensätzlich zu DPPG, da dieses Lipidgemisch 75% DPPC und nur 25% DPPG enthält. Eine Übersicht über die Parameter der Vesikel-Mizell-Umwandlung in den GS-DPPC/DPPG(3:1)-Systemen gibt Tab. 3.8.

Tab. 3.8: ITC-, DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC/DPPG(3:1)-Vesikeln mit NaC und NaDC in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C

	NaC + PC/PG(3:1)	NaDC + PC/PG(3:1)
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,15 / 0,27	0,17 / 0,30
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,38 / 0,41	0,58 / 0,53
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	8,2 / 7,9	1,9 / 2,2
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	9,0 / 9,8	2,0 / 2,7

Die Ergebnisse der durchgeführten DLS-Experimente zur Solubilisierung der 3:1-Gemische sind der Abb. 3.19 und der Tab. 3.8 zu entnehmen. Die DPPC/DPPG(3:1)-MV haben mit $R_h \sim 35$ -40 nm eine kleinere Ausgangsgröße gegenüber DPPC, aber eine größere gegenüber DPPG. Im MM-Bereich wird wie bei den beiden Einzelkomponenten ein R_h -Wert von $\sim 1,5$ nm erreicht. Die D_w^{sat} -Werte der DLS- und ITC-Messungen stimmen annähernd überein. Die durch DLS erhaltenen D_w^{sol} - und R_e -Werte haben wegen der oben genannten experimentellen Gegebenheiten etwas höhere Beträge als die ITC-Werte. Aus der Abb. 3.19 wird eine gute Übereinstimmung der ermittelten Phasengrenzen von ITC und DLS bei diesen DPPC/DPPG-Gemischen im molaren Verhältnis 3:1 sichtbar.

Für weitere Untersuchungen zur Solubilisierung von gemischten DPPC/DPPG-Vesikeln durch GS kamen Mischungen im molaren Verhältnis 1:1 zum Einsatz. Die Lipidgemische mit einer Gesamtkonzentration von 0,5 bis 10 mM wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie DPPC, DPPG und die 3:1-Gemische in 0,1 M NaCl bei 60°C vermessen.

In der Abb. 3.20 sind die Phasendiagramme für die Solubilisierung der 1:1-Gemische durch NaC und NaDC dargestellt. Analog den 3:1-Mischungen verbreitern sich die linear verlaufenden Phasengrenzen mit steigender Lipidkonzentration.

Die charakteristischen Unterschiede in der Lage der Phasengrenzen der beiden GS, die sowohl bei der Solubilisierung von DPPC und DPPG als auch bei der der 3:1-Gemische ermittelt wurden, treten ebenfalls bei den 1:1-Mischungen auf. Die D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte (Tab. 3.9) befinden sich wiederum deutlich über denen von DPPG und DPPC, aber etwas unterhalb der 3:1-Gemische.

Die D_w - und R_e -Werte der 1:1-Mischungen zeigen die gleichen Tendenzen wie bei den 3:1-Lipidgemischen, sind aber im Vergleich zum molaren Verhältnis von 3:1 geringfügig niedriger.

Die entsprechenden DLS-Experimente, deren Ergebnisse in der Abb. 3.21 und der Tab. 3.9 zusammengefasst sind, ergeben eine gute Korrelation mit den ITC-Phasengrenzen. Sie haben R_h -Werte von ~ 30 -35 nm als initiale Größe der gemischten Vesikel. Im MM-Bereich wurden wiederum 1,5 nm als Endgröße gefunden. Die Solubilisierungsparameter beider Methoden (Tab. 3.9) variieren nur in geringem Maß.

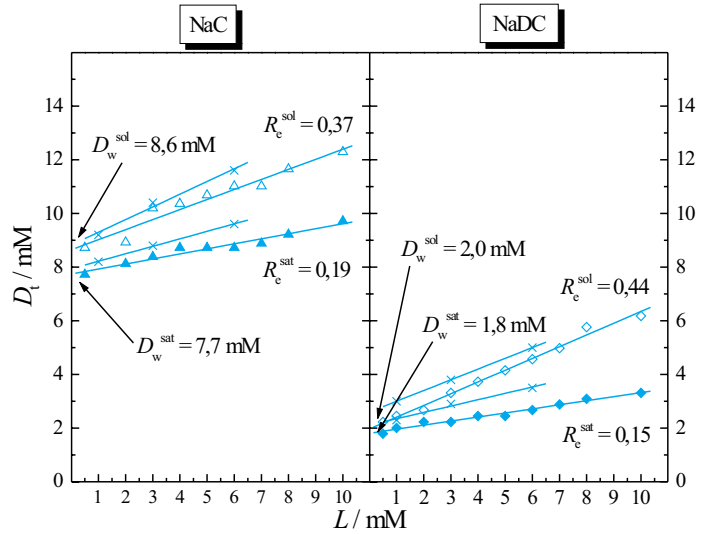


Abb. 3.20: Phasendiagramme für NaC-DPPC/DPPG(1:1)- und NaDC-DPPC/DPPG(1:1)-Systeme in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C: Detergentskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L ; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} (geschlossene Symbole), D_t^{sol} (offene Symbole), Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat} , R_e^{sol} , Ordinaten Schnittpunkte D_w^{sat} , D_w^{sol} ; DLS-Phasengrenzen (Kreuze)

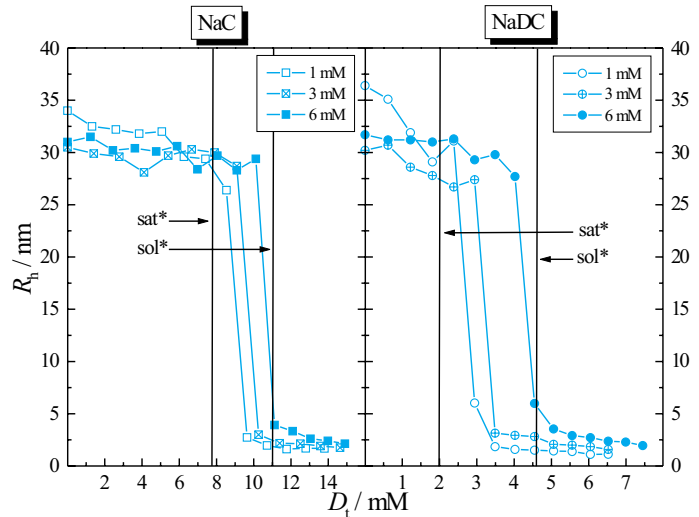


Abb. 3.21: DLS-Solubilisierung von DPPC/DPPG(1:1)-Vesikeln mit NaC- und NaDC-Lösungen in 0,1 M NaCl (100, 50 mM), pH 7,5, bei 55° C: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergentskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat*: 1 mM, sol*: 6 mM DPPC/DPPG(1:1))

Tab. 3.9: ITC-, DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC/DPPG(1:1)-Vesikeln mit NaC und NaDC in 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C

	NaC + PC/PG(1:1)	NaDC + PC/PG(1:1)
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,19 / 0,26	0,15 / 0,24
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,37 / 0,47	0,44 / 0,40
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	7,7 / 7,9	1,8 / 2,1
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	8,6 / 8,8	2,0 / 2,6

Aus dem Vergleich der Ausgangsgrößen der durch Ultraschallbehandlung hergestellten Vesikel resultiert folgende Reihenfolge: DPPC > DPPC/DPPG(3:1) > DPPC/DPPG(1:1) > DPPG. Daraus geht hervor, dass die Vesikelgröße mit zunehmendem Anteil des negativ geladenen Lipids und der damit verbundenen stärkeren spontanen Krümmung sinkt.

PL mit negativ geladenen Kopfgruppen besitzen nach ISRAELACHVILI et al. [54] im Vergleich zu neutralen Lipiden wie PC eine größere Kopfgruppenfläche und somit eine weniger dichte Packung der Lipidmoleküle. Dadurch sind die Detergensmoleküle in der Lage, die DPPG-Vesikel schon mit geringeren Konzentrationen gegenüber den DPPC-Vesikeln zu solubilisieren. Bei Mischungen von neutralen und negativ geladenen Lipiden führt der unterschiedliche Platzbedarf der Kopfgruppe zu einer asymmetrischen Verteilung der Lipidspezies in den beiden Membranschichten. Die negativen DPPG-Moleküle reichern sich in der äußeren Monoschicht an, während die neutralen DPPC-Moleküle vorwiegend in der inneren Monoschicht lokalisiert sind [54,341]. Dies erklärt die im Vergleich zu den beiden Einzelkomponenten DPPC und DPPG niedrigeren R_e^{sat} - und höheren R_e^{sol} -Werte der DPPC/DPPG-Mischungen. Dadurch kommt es zu einer Aufweitung des Koexistenzbereiches bei den gemischten DPPC/DPPG-Systemen, die in der Abb. 3.22 verdeutlicht ist und für NaDC eine stärkere Ausprägung als für NaC hat. Die größte Differenz zwischen R_e^{sat} und R_e^{sol} tritt bei DPPC/DPPG(3:1) auf. Durch die lockere Anordnung der PL-Moleküle in der äußeren Monoschicht können die GS-Moleküle gut in die Membran eindringen und diese schon mit geringerem GS-Anteil sättigen. Die vollständige Solubilisierung, d.h. die komplette Zerstörung der Membran, wird aber durch die Anreicherung von DPPC-Molekülen auf der Innenseite erschwert und erfordert höhere GS-Mengen. Die GS-Moleküle solubilisieren zuerst das DPPG der gemischten Membranen, wodurch im Koexistenzbereich mit DPPG angereicherte MM neben vorrangig DPPC-haltigen MV vorliegen. Bereits der Zusatz von kleinen Mengen an negativ geladenen Lipiden zu neutralem PC verändert das Quellverhalten der PC-Membranen von begrenzt zu infinit [342]. Daraus kann auf eine höhere Konzentration von zur Solubilisierung der Mischvesikel erforderlichen Detergens geschlossen werden.

Ebenso wie die R_e -Werte sind auch die D_w -Werte von der PL-Zusammensetzung bzw. den molaren DPPC/DPPG-Verhältnissen abhängig. Dies kann für die D_w^{sat} -Werte der Abb. 3.23 entnommen werden.

Unter Verwendung von Gl. 3.1 und Gl. 3.2 ergibt sich für den Verteilungskoeffizienten an der Sättigungsphasengrenze P^{sat} folgender Zusammenhang:

$$P^{sat} = \frac{x_b \cdot W}{D_w} \quad (3.14)$$

Dieser entspricht dem Ausdruck:

$$P^{sat} = \frac{R_e^{sat} \cdot W}{D_w (1 + R_e^{sat})} \quad (3.15)$$

Die für die DPPC- und DPPG- sowie die DPPC/DPPG(3:1)- und DPPC/DPPG(1:1)-Systeme mit NaC und NaDC in 0,1 M NaCl errechneten P^{sat} -Werte sind in der Abb. 3.24 dargestellt. Der Einfluss der PL-Zusammensetzung geht aus den P^{sat} -Werten eindeutig hervor, wobei sich die P^{sat} -Werte entgegengesetzt zu den D_w^{sat} -Werten verhalten. Die beiden Einzelkomponenten DPPC und DPPG besitzen wesentlich höhere P^{sat} -Werte als die PL-Mischungen. Diese Abnahme von P^{sat} bei den Lipidgemischen ist wiederum bei NaDC stärker als bei NaC ausgeprägt.

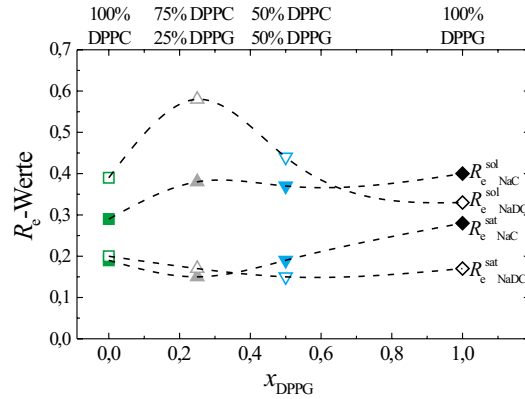


Abb. 3.22: Abhängigkeit der R_e -Werte von der PL-Zusammensetzung für NaC (geschlossene Symbole) und NaDC (offene Symbole) in 0,1 M NaCl

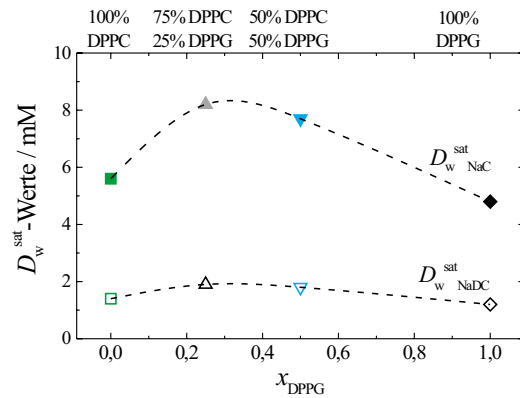


Abb. 3.23: Abhängigkeit der D_w^{sat} -Werte von der PL-Zusammensetzung für NaC (geschlossene Symbole) und NaDC (offene Symbole) in 0,1 M NaCl

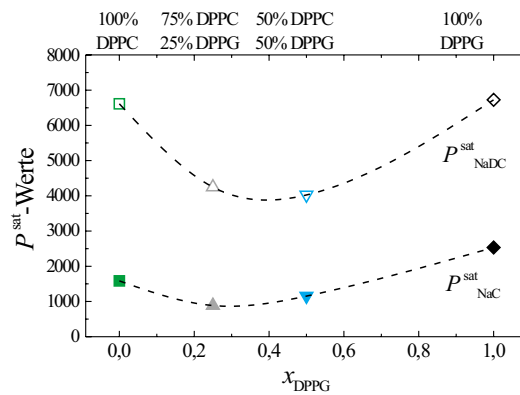


Abb. 3.24: Abhängigkeit der P^{sat} -Werte von der PL-Zusammensetzung für NaC (geschlossene Symbole) und NaDC (offene Symbole) in 0,1 M NaCl

3.1.2.4 Gallensalz-SPC-Systeme

Die bisher beschriebenen Solubilisierungsstudien beschäftigten sich ausschließlich mit gesättigten Lipiden, da diese wegen ihrer definierten chemischen Zusammensetzung und hohen Reinheit zur Untersuchung der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung als Modellsubstanzen sehr gut geeignet sind. Durch den Einsatz von natürlichen PL-Gemischen mit ungesättigten Alkylketten gelingt eine Simulation der Gegebenheiten in Biomembranen. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit SPC, einem aus Soja-Bohnen extrahierten PC-Gemisch (Abschnitt 2.2.3), durchgeführt. Das SPC besitzt aufgrund des hohen Gehalts an ungesättigten FS einen sehr niedrigen T_m -Wert bei -15°C [58] und gestattet somit die Charakterisierung der Phasenumwandlung bei physiologischen Temperaturen.

Die Abb. 3.25 zeigt je ein Beispiel für einen Solubilisierungsversuch von SPC-Vesikeln mit NaC in 0,1 M NaCl bei 30°C (A') und 60°C (A''). Die beiden „Knickpunkte“ in den Wärmefluss-Zeit-Diagrammen korrelieren mit den Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen. Beim Vergleich der Titrationspeaks bei beiden Temperaturen ist zu erkennen, dass bei 60°C etwa sechsfach so große Wärmeeffekte wie bei 30°C hervorgerufen werden. Der erste „Knickpunkt“ im Wärmeflussverlauf, der der Sättigung der SPC-Vesikel mit GS entspricht, wird bei 30°C bei der 5. und bei 60°C bei der 7. Injektion erreicht.

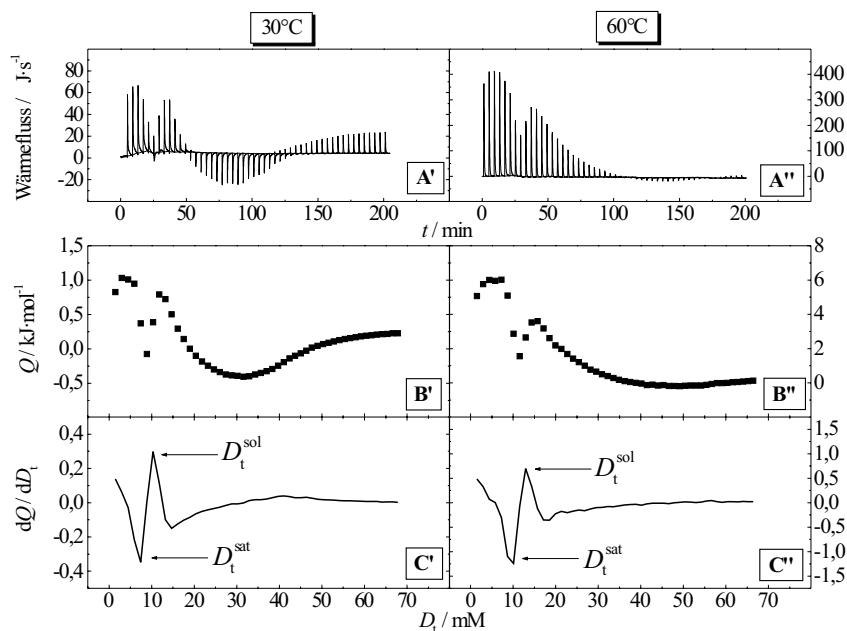


Abb. 3.25: ITC-Solubilisierungsexperiment: Titration ($50 \times 5 \mu\text{l}$) einer NaC-Lösung (400 mM) in eine SPC-Dispersion (2 mM) in $0,1 \text{ M NaCl}$, $\text{pH } 7,5$, bei 30°C (links) und 60°C (rechts): A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) molare Reaktionswärme Q als Funktion der Detergenzkonzentration D_t , C) 1. Ableitung von B) mit den Extremstellen D_t^{sat} und D_t^{sol} für Sättigung bzw. Solubilisierung

Aus den gleich gewählten Konzentrationen und Injektionsvolumina geht hervor, dass die Phasenumwandlung bei der höheren Temperatur erst bei größeren GS-Konzentrationen beginnt. Der zweite „Knickpunkt“ für die vollständige Solubilisierung der SPC-Membranen ist bei 30°C bei der 7. und bei 60°C bei der 9. Injektion erreicht. Die Temperatur hat keinen Einfluss auf die Breite des Koexistenzbereiches. Während bei 60°C nur endotherme Peaks auftreten und die Verdünnungswärmen nahe null sind, werden bei 30°C große Verdünnungswärmen im exothermen und endothermen Bereich beobachtet. Dies ist auf den Vorzeichenwechsel der ΔH_{demic} -Werte von exo- nach endotherm bei 30°C zurückzuführen [84]. Die Integration der Fläche der Titrationspeaks und die Differentiation dieser Reaktionswärme nach D_t erlaubt die exakte Bestimmung von D_t^{sat} und D_t^{sol} .

Die Abb. 3.26 fasst die erhaltenen Phasendiagramme für die Solubilisierung von SPC-Vesikeln im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 10 mM durch NaC und NaDC für beide Temperaturen in H₂O bzw. 0,1 M NaCl zusammen. Die R_e - und D_w -Werte sind in der Tab. 3.10 aufgelistet. Im Gegensatz zur Solubilisierung von DPPC in H₂O besitzen die Phasengrenzen für SPC keinen annähernd parallelen Verlauf und keine Abweichung von der Linearität bei niedrigen Lipidkonzentrationen. Bei beiden Temperaturen befinden sich die D_t^{sat} -Werte in H₂O bei fast identischen GS-Konzentrationen. Die D_t^{sol} -Werte sind in H₂O bei 60°C größer als bei 30°C. Dies führt zu einer Verbreiterung des Koexistenzbereiches bei höheren Temperaturen.

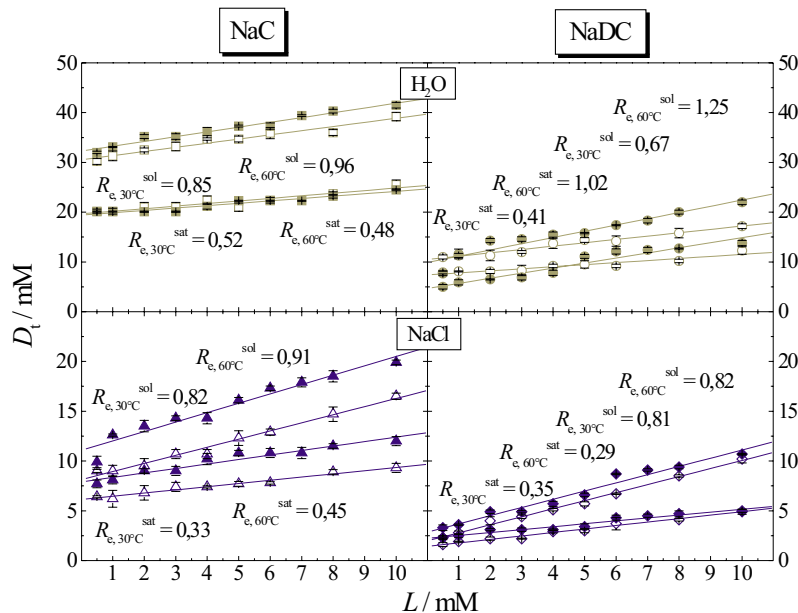


Abb. 3.26: Phasendiagramme für NaC-SPC- und NaDC-SPC-Systeme in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 30°C (offene Symbole) und 60°C (geschlossene Symbole): Detergentskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L ; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} , D_t^{sol} ; Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat} , R_e^{sol}

DA GRACA MIGUEL et al. [343] stellten ein ähnliches Verhalten für OG-EPC-Mischungen fest. In 0,1 M NaCl hingegen überlappen sich die D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte bei beiden Temperaturen. Die Verschiebung der Phasengrenzen bei der Solubilisierung mit NaDC gegenüber der mit NaC zu tieferen Detergenkonzentrationen tritt auch bei den SPC-Vesikeln in beiden Medien bei 30°C und 60°C auf.

Die R_e -Werte liegen im Vergleich zu den gesättigten PL deutlich höher. Die Mischaggregate enthalten einen größeren GS-Anteil und sind gegenüber dem GS-Angriff stabiler. Ein Temperatureinfluss auf die R_e -Werte ist nicht erkennbar. Dies lässt auf die annähernd identische Zusammensetzung von MV als auch von MM bei beiden Temperaturen schließen. Die D_w -Werte haben für SPC die gleiche Tendenz wie für DPPC: NaC-PC in H₂O >> NaC-PC in NaCl ~ NaDC-PC in H₂O >> NaDC-PC in NaCl.

Tab. 3.10: ITC-, DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von SPC-Vesikeln mit NaC und NaDC in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 30° C und 60° C (ITC) sowie bei 25° C und 55° C (DLS)

	NaC + SPC in H ₂ O	NaC + SPC in NaCl	NaDC + SPC in H ₂ O	NaDC + SPC in NaCl
T = 30° C / 25° C				
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,52 / 0,67	0,33 / 0,43	0,41 / 0,49	0,35 / 0,50
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,85 / 0,96	0,82 / 0,89	0,67 / 0,78	0,81 / 0,82
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	19,7 / 17,9	6,1 / 5,9	7,4 / 7,9	1,4 / 1,7
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	30,4 / 29,1	8,1 / 9,1	10,5 / 11,2	2,0 / 3,6
T = 60° C / 55° C				
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,48 / 0,71	0,45 / 0,57	1,02 / 0,76	0,29 / 0,42
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,96 / 1,06	0,91 / 0,98	1,25 / 0,94	0,82 / 0,98
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	19,4 / 19,8	7,9 / 6,8	4,7 / 7,0	2,2 / 2,0
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	32,3 / 31,5	11,2 / 12,9	9,9 / 12,2	2,9 / 4,0

Die Charakterisierung des Solubilisierungsprozesses von SPC-Membranen durch NaC und NaDC fand auch mit der DLS statt. Die erhaltenen R_e - und D_w -Werte sind der Tab. 3.10 zu entnehmen. Sie zeigen eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden.

Beim Vergleich der Ausgangsgrößen der reinen SPC-Vesikel ist der Einfluss der Temperatur auf die Vesikelgröße erkennbar: bei 25°C wurden R_h -Werte von 45-65 nm erhalten, bei 55°C hingegen lagen diese im Bereich von 30-45 nm. Der deutlichste Unterschied gegenüber den Systemen mit den synthetischen PL besteht im Auftreten von zwei verschiedenen Aggregatspezies nach dem Erreichen von D_t^{sol} : sehr kleine mit $R_h \sim 2$ nm und sehr große Aggregate unterschiedlicher Größe bei den beiden untersuchten Temperaturen.

Bei der tieferen Temperatur steigt der Partikelradius weit über die Vesikelausgangsgröße, während er bei der höheren Temperatur in etwa den initialen Werten entspricht.

Diese Temperaturabhängigkeit von R_h wurde schon durch DLS-Experimente von MAZER et al. [80, 138] belegt. Bei der visuellen Prüfung der Lösungen beim Überschreiten der Phasengrenzen konnte das „Klarwerden“ der Lipiddispersion, das die Umwandlung in die isotrope, mischmizellare Lösung kennzeichnet, einwandfrei beobachtet werden. Ähnliche DLS-Resultate an Mischungen von GS mit natürlichen PL-Gemischen erzielten auch MAZER et al. [81, 323] mit R_h -Werten bis 210 nm. COHEN et al. [152, 154] definierten die Form dieser GS-EPC-Mischmizellen als Stäbchen mit einer Persistenzlänge von 17-26 nm, die mit der von EGELHAAF et al. [146, 344] bestimmten von etwa 15-25 nm korreliert. Daraus wird abgeleitet, dass die hier untersuchten Mischungen neben den kleinen, sphärischen MM mit $R_h \sim 2$ nm größere, stäbchenförmige MM mit R_h -Werten im Bereich von 35-45 nm bei 55°C und von 60 nm bis maximal 160 nm bei 25°C enthalten. Die im MM-Bereich gemessene Endgröße der kleinen GS-PC-MM liegt bei den SPC-Systemen etwas über der der synthetischen PL-Systeme.

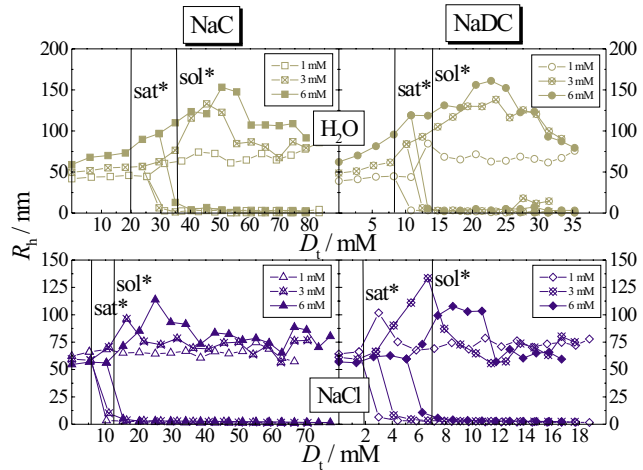


Abb. 3.27: DLS-Solubilisierung von SPC-Vesikeln mit NaC-, NaDC-Lösungen in H_2O (500, 200 mM) bzw. 0,1 M NaCl (400, 100 mM), pH 7,5, bei 25°C: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergentskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat*: 1 mM, sol*: 6 mM SPC)

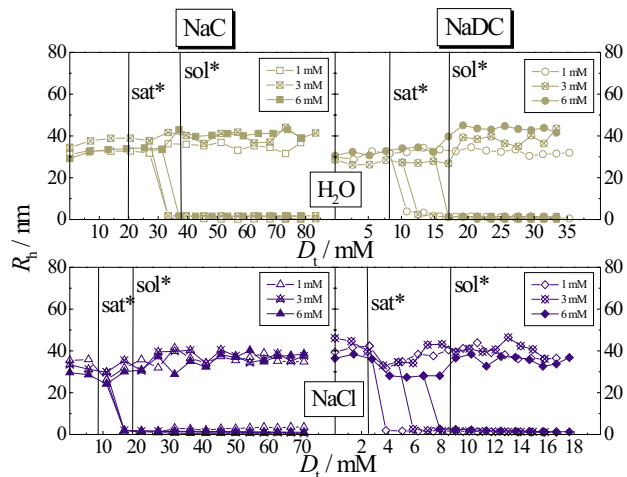


Abb. 3.28: DLS-Solubilisierung von SPC-Vesikeln mit NaC-, NaDC-Lösungen in H_2O (500, 200 mM) bzw. 0,1 M NaCl (400, 100 mM), pH 7,5, bei 55°C: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergentskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat*: 1 mM, sol*: 6 mM SPC)

Dieses Verhalten tritt auch bei Mischungen mit nichtionischen Detergentien auf, wie von KAMENKA et al. [345] für EPC und DPPC bewiesen wurde. Die in der Literatur [169,170, 314–317, 346] aufgeführten Untersuchungen zur GS-induzierten Membransolubilisierung fanden fast ausschließlich durch Trübungsmessungen mit dem natürlichen EPC statt. Die dabei erhaltenen R_e -Werte, die im Abschnitt 3.1.2.1 aufgeführt wurden, variieren für die Sättigung zwischen 0,25 und 0,35 sowie für die Solubilisierung zwischen 0,6 und 1,0.

Die durch ITC- und DLS-Studien erhaltenen R_e -Werte zur Vesikel-Mizell-Umwandlung in GS-SPC-Systemen korrelieren sehr gut mit den angegebenen Literaturwerten. Die leicht höheren R_e^{sol} -Werte, insbesondere für NaDC-SPC in H_2O , resultieren aus dem größeren Anteil an ungesättigten FS beim SPC gegenüber EPC. Das Ergebnis wird durch Studien von MEMOLI et al. [347] gestützt, die sowohl für NaC als auch für Triton X-100 gleiche R_e^{sat} -Werte für EPC und SPC, aber größere R_e^{sol} -Werte für SPC im Vergleich zu EPC fanden. Daraus ergibt sich eine zunehmende Stabilität der Vesikel gegenüber dem Detergensangriff mit einem steigenden Anteil an ungesättigten PL-Alkylketten.

3.1.2.5 Zusammenfassung

Die erzielten Ergebnisse gestatten die Charakterisierung der GS-induzierten Solubilisierung von gesättigten neutralen und negativ geladenen PL-Membranen synthetischen Ursprungs sowie deren Mischungen als auch von ungesättigten, natürlichen PL-Gemischen unter Verwendung von NaC und NaDC. Die Phasengrenzen für die Sättigung der Vesikel mit GS-Molekülen D_t^{sat} und die komplette Solubilisierung unter Bildung von GS-PL-MM D_t^{sol} bei 60°C sind für die synthetischen Lipide DPPC, DPPG und die DPPC/DPPG-Mischungen in den Verhältnissen 3:1 und 1:1 in 0,1 M NaCl in der Abb. 3.29 zusammengefasst. Die Abb. 3.30 enthält eine Gegenüberstellung der Phasengrenzen von DPPC und dem natürlichen PL-Gemisch SPC in den beiden Medien H_2O bzw. NaCl bei 60°C.

Für alle untersuchten GS-PL-Systeme sind der Einfluss der GS-Struktur, d.h. der Anzahl der Hydroxylgruppen am Steroidgerüst, und die damit verbundenen Unterschiede in der Hydrophilie eindeutig erkennbar. Die Phasengrenzen des stärker hydrophoben Dihydroxy-GS NaDC liegen bei geringeren Konzentrationen im Vergleich zum Trihydroxy-GS NaC. Demzufolge findet die Membransolubilisierung mit NaDC bereits bei kleineren Konzentrationen gegenüber NaC statt. Daraus ergibt sich für NaDC ein deutlich höheres Potential zur aggressiven Membranschädigung. Diese Aussage wird durch Studien von SCHÖLMERICH et al. [348], NARAIN et al. [349] und MOSCHETTA et al. [350] zur Zytotoxizität der GS auf der Basis von Hämolysetests an Erythrozyten- und Hepatozytenmembranen bestätigt. Die Untersuchungen von FALK [351] zeigten den Einfluss der GS-Lipophilie auf die Membranpermeation und die Entstehung von GS-induzierten Membrandefekten.

Die Abhängigkeit der Solubilisierungskapazität von der Detergenshydrophilie wurde von DE LA MAZA und PARRA [352] auch für OG und Dodecylmaltosid mit unterschiedlich langen Alkylketten nachgewiesen. Bei den verwendeten GS-PL-Systemen wird mit Ausnahme von GS-DPPC in H_2O eine Verbreiterung des Koexistenzbereiches mit zunehmender Lipidkonzentration und ein linearer Verlauf der Phasengrenzen beobachtet. Die GS-DPPC-Systeme in H_2O besitzen fast parallele Phasengrenzen (Tab. 3.5).

Die Abweichung von der Linearität der Phasengrenzen im Bereich niedriger Lipidkonzentrationen bei den GS-DPPC-Gemischen in H_2O und die bei allen untersuchten GS-PL-Systemen ermittelte Differenz der D_w^{sat} - und D_w^{sol} -Werte ist durch die Abhängigkeit des Aggregationsverhaltens von der Zusammensetzung (Abschnitt 3.1.2.1), die finite Größe der zylinderförmigen MM und die resultierenden „Endkappen-Effekte“ zu erklären [311].

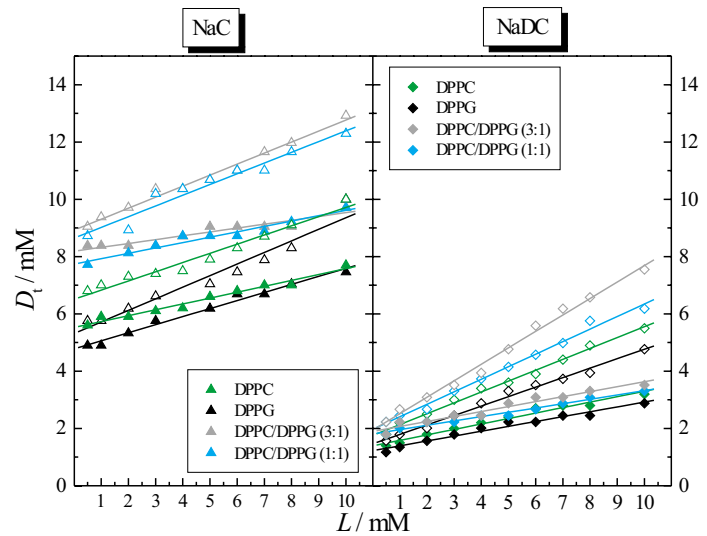


Abb. 3.29: Vergleich der Phasengrenzen der synthetischen Phospholipide: Detergenkonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L für die Solubilisierung von DPPC-, DPPG-, DPPC/DPPG(3:1)- und DPPC/DPPG(1:1)-Vesikeln mit NaC bzw. NaDC bei $60^\circ C$ in $0,1 M NaCl$, pH 7,5

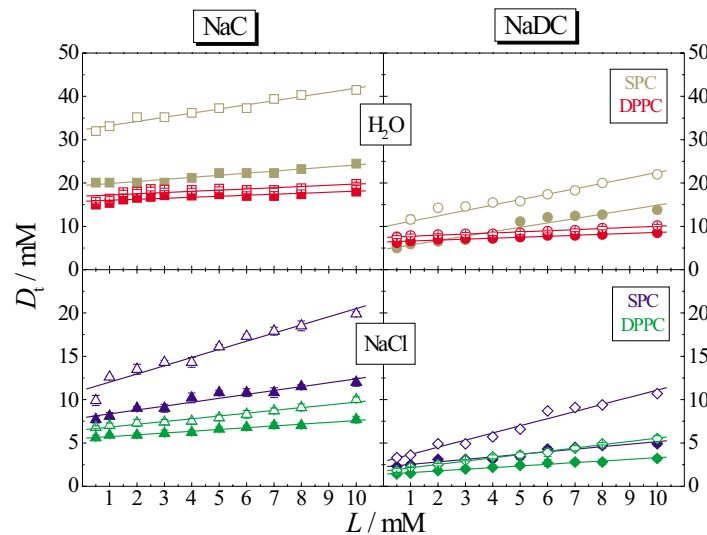


Abb. 3.30: Vergleich der Phasengrenzen von DPPC und SPC: Detergenkonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L für die Solubilisierung von DPPC- und SPC-Vesikeln mit NaC und NaDC bei $60^\circ C$ in H_2O bzw. $0,1 M NaCl$, pH 7,5

Die D_w^{sol} -Werte, die der hypothetischen cmc der GS-PC-Gemische bei 0 mM Lipid entsprechen, befinden sich bis auf die GS-SPC-Systeme in H_2O unterhalb der cmc -Werte der reinen GS [84]. In den meisten Gemischen ist der Anteil an GS-Monomeren kleiner als in reinen GS-Lösungen. Die Mizellbildung erfolgt in Gegenwart von Lipid in diesem Fall schon bei geringeren GS-Konzentrationen. Nach SCHÜRHOLOZ [321] werden die folgenden zwei Kategorien bezüglich der Lage von D_w^{sol} unterschieden: 1. Lipide, die unterhalb der cmc des Detergens solubilisiert werden ($D_w^{sol} < cmc$), und 2. Lipide, die oberhalb der cmc des Detergens solubilisiert werden ($D_w^{sol} > cmc$). Die GS-SPC-Gemische in H_2O gehören der letzteren Kategorie an, da durch den hohen Anteil an ungesättigten Alkylketten im Vergleich zu den synthetischen PL und den SPC-Systemen in NaCl bedeutend höhere GS-Konzentrationen zur Überführung der SPC-Vesikel in GS-SPC-MM erforderlich sind. Der Vergleich der R_e -Werte mit nichtionischen Detergentien [292, 309, 319] verdeutlicht, dass PL-Membranen durch GS schon bei geringen Konzentrationen effektiv solubilisiert werden [210]. Für das natürliche SPC liegen die R_e -Werte über denen von DPPC. Daraus wird abgeleitet, dass PL mit gesättigten Alkylketten wesentlich leichter in MM umgewandelt werden als ungesättigte PL. Die SPC-Vesikel sind gegenüber dem GS-Angriff stabiler als die DPPC-Vesikel. Dieses Verhalten beobachtete SCHÜRHOLOZ [321] für das zwitterionische GS-Derivat CHAPS. Ebenso fand KELLER [298] bei der Solubilisierung mit OG bzw. Dodecylmaltosid höhere R_e -Werte für SPC im Vergleich zu DPPC.

Die Solubilisierung von DPPC und SPC wurde in H_2O bzw. 0,1 M NaCl untersucht, um Informationen über den Einfluss der Ionenstärke des Mediums zu erhalten. Es stellte sich heraus, dass die Phasengrenzen in NaCl in Analogie zu den cmc -Werten [84] zu tieferen GS-Konzentrationen verschoben sind und sich mit steigender Lipidkonzentration mehr als in H_2O verbreitern. In der Salzlösung ist die Wasseraktivität herabgesetzt. Durch die Wechselwirkung von Na^+ -Ionen mit der Phosphatgruppe des PC kommt es zu einer stärkeren elektrostatischen Abschirmung. Insbesondere bei den GS-DPPC-Systemen werden in NaCl (Tab.3.5) höhere R_e^{sol} -Werte als in H_2O erhalten. Durch die bessere Abschirmung der Kopfgruppenladung steigt die Vesikelstabilität. Für die komplette Solubilisierung sind höhere GS-Anteile als in H_2O erforderlich.

Die durch ITC und DLS ermittelten Parameter für die Vesikel-Mizell-Umwandlung zeigen eine gute Korrelation. Die SANS-Daten für das Beispielsystem NaDC-DPPC in NaCl gestatten Aussagen zur Größe, Form und Struktur der GS-PL-Aggregate. Durch DSC-Messungen an den GS-DPPG-Gemischen konnte die Umwandlung der lamellaren Vesikel in isotrope, mischmizellare Lösungen bewiesen werden.

3.2 Gallensalz/Fettsäure-Phospholipid-Gemische

3.2.1 Demizellisierung

3.2.1.1 Na-Oleat

Die Charakterisierung der Mizellbildung in NaO-Lösungen wurde mit der ITC in einem Temperaturbereich von 10-70°C durchgeführt. Diese Methode nach KRESHECK und HARGRAVES [353] ermöglicht die Bestimmung der *cmc* und der Enthalpie der Mizellisierung. Aus dem Phasendiagramm ist zu erkennen, dass diese Experimente bei einer Lipidkonzentration von 0 mM verlaufen (Abb. 2.17: *cmc* - Pfeil entlang der Ordinate).

In der Abb. 3.31 ist je ein Beispiel für ein Demizellisierungsexperiment von NaO in H₂O bei 10°C und 65°C dargestellt. Bei diesen Versuchen wird eine hochkonzentrierte, mizellare Detergenslösung in die Messzelle injiziert, die nur das Lösungsmittel enthält. Zu Beginn sind in den Wärmefluss-Zeit-Diagrammen (Abb. 3.31 A', A'') bei tiefen Temperaturen exotherme und bei hohen Temperaturen endotherme Titrationspeaks sichtbar, die durch die Verdünnung der Mizellen und Monomeren sowie den Zerfall der Mizellen (Demizellisierung) in Monomeren und die Freisetzung von Gegenionen hervorgerufen werden.

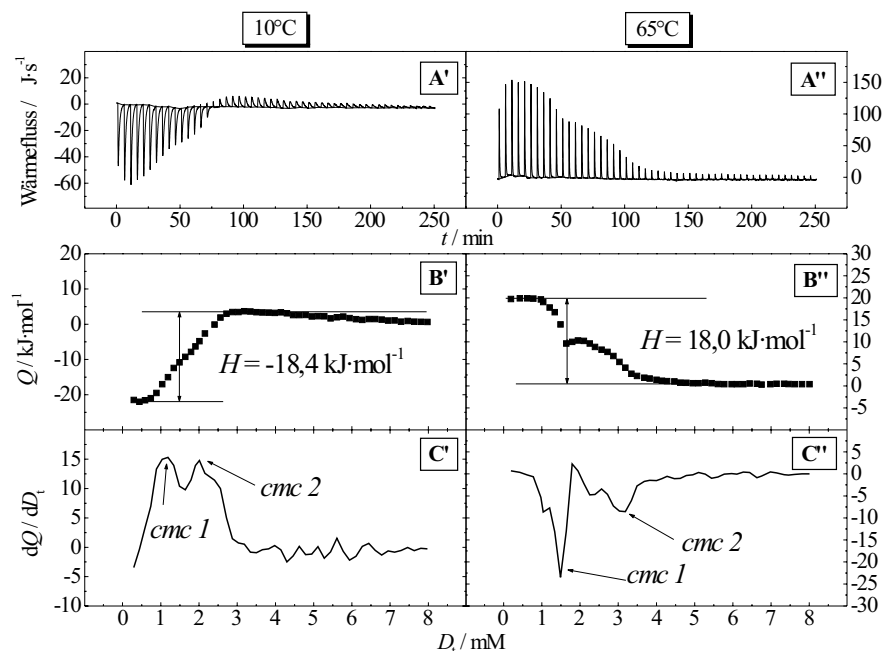


Abb. 3.31: ITC-Experiment zur *cmc*-Bestimmung: Titration ($50 \times 5 \mu\text{l}$) einer NaO-Lösung (40 mM) in H₂O, pH 7,5, bei 10°C (links) und 65°C (rechts): A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) molare Reaktionswärme Q als Funktion der Detergenskonzentration D_t , C) 1. Ableitung von B) mit den zwei Extremstellen *cmc*1 und *cmc*2

Der Hauptteil entspricht der Demizellierungswärme ΔH_{demic} . Die betragsmäßig geringe Verdünnungswärme ΔH_{dil} wird in separaten Experimenten bestimmt und von der gemessenen Reaktionswärme subtrahiert. Bei weiterer Detergenzugabe steigt die Konzentration der Monomeren in der Messzelle bis zum Erreichen der cmc . Die Peakhöhe nimmt im mizellaren Bereich bis zu einem annähernd konstanten Wert nahe Null ab. Diese Wärmeeffekte sind nur auf die Verdünnung der Mizellen zurückzuführen. Die Wendepunkte in den Q - D_t -Diagrammen (Abb. 3.31 B', B'') korrelieren mit den cmc -Werten. Diese können durch die Bildung der 1. Ableitung von Q nach D_t (Abb. 3.31 C', C'') exakt bestimmt werden. Die Reaktionsenthalpie ΔH ergibt sich aus der Enthalpiedifferenz des Anfangs- und Endzustandes (Abb. 3.31 B', B'').

Anhand der Abb. 3.31, insbesondere der 1. Ableitungen, lassen sich für die Aggregation von NaO zwei kritische Konzentrationen $cmc1$ und $cmc2$ ermitteln. Die cmc -Werte von NaO, als auch die von NaC und NaDC in H_2O bzw. 0,1 M NaCl [84], sind in der VAN'T HOFF-Form mit $\ln cmc'$ ($cmc' \equiv cmc$ in Molenbruch-Einheiten) vs. $1/T$ in der Abb. 3.32 zusammengefasst. Die Anpassung der VAN'T HOFF-Kurven erfolgte nach NUSSELDER und ENGBERTS [354] als Polynom 2. Grades. Es ist zu erkennen, dass die cmc -Werte von NaC und NaDC in beiden Medien oberhalb der cmc 's von NaO liegen. NaC mit der höheren Hydrophilie hat eine größere cmc als NaDC. Sie wird bei beiden GS in NaCl mit steigender Ionenstärke zu tieferen Konzentrationen verschoben. Die cmc 's der GS als auch die $cmc1$ von NaO weisen das für ionische Detergentien typische Minimum bei RT auf. Die $cmc2$ von NaO nimmt mit steigender Temperatur kontinuierlich zu. Dies weist auf einen ausschließlich endothermen, zweiten Aggregationsprozess hin.

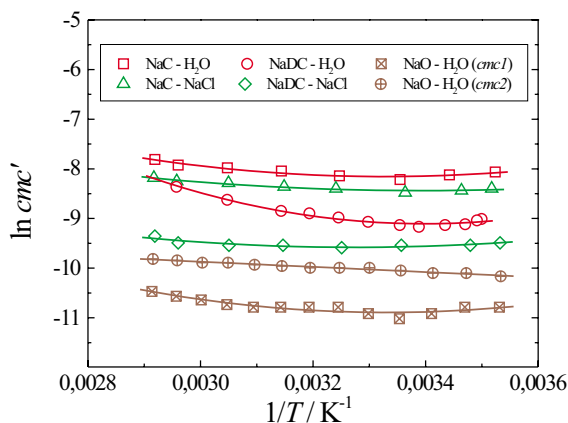


Abb. 3.32: VAN'T HOFF-Darstellung der Temperaturabhängigkeit von cmc' : NaO in H_2O , pH 7,5, mit jeweils $cmc1$ und $cmc2$ im Vergleich zu denen von NaC und NaDC in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5

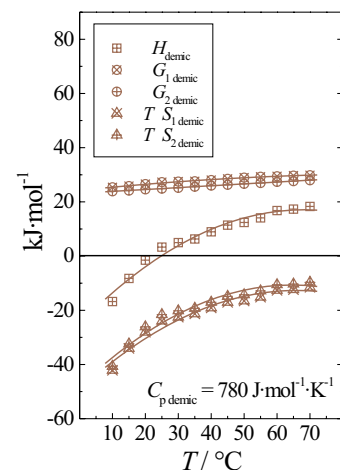


Abb. 3.33: Thermodynamische Parameter der Demizellierung von NaO in H_2O , pH 7,5, vs. T ; $\Delta C_{p, demic}$ bei 25° C

Der im Vergleich zu anderen Detergentien niedrige Konzentrationsbereich der Mizellbildung von NaO stimmt mit Daten von TAMAMUSHI et al. (2,7 mM) [355], DROBOSYUK et al. (0,5-1,5 mM) [356] und AKHTER (2,15 mM) [357] überein. Die zwei erhaltenen *cmc*'s für NaO resultieren aus einem zweistufigen Aggregationsmechanismus. Die Existenz von zwei verschiedenen Mizelltypen wurde ebenfalls von MAHIEU et al. [358] festgestellt, die durch Protonen-Longitudinal-Magnetrelaxationsmessungen zwei *cmc*-Werte bei 1,5 und 3,0 mM bei RT fanden und dies auf eine erste Aggregation in sphärische und eine zweite Umwandlung in stäbchenförmige Mizellen zurückführen. Die Existenz von zwei *cmc*'s wurde von MAJHI und MOULIK [119] auch für das Detergens Aerosol-OT gefunden. Derartige Detergentien bezeichnen ZIMMELS und LIN [359] als „Multi-*cmc*-Systeme“, bei denen eine stufenweise Assoziation mit einer diskontinuierlichen Strukturänderung stattfindet.

Die Detergenskonzentration in den Mizellen dient der Ermittlung von ΔH_{demic} , da bei dem verwendeten Pseudo-Phasenseparations-Modell die Mizellen als separate Phase nach der GIBBS'schen Phasenregel betrachtet werden. CISTOLA et al. [360] bewiesen die Gültigkeit des Modells für Alkaliseifen. Deshalb geht nur die mizellare NaO-Konzentration in die Berechnung ein, die sich durch die Subtraktion der Monomer-Konzentration, d.h. der *cmc*, von der Gesamtkonzentration ergibt. Geringfügige Abweichungen der ermittelten von den tatsächlichen ΔH_{demic} -Werten sind nach JOHNSON et al. [361] durch die leichte Änderung der Monomer-Konzentration oberhalb der *cmc* möglich. Die Unterscheidung der beiden Aggregationsstufen in den Q - D_t -Diagrammen (Abb. 3.31 B', B'') gestaltet sich insbesondere im mittleren Temperaturbereich schwierig, so dass nur die Gesamtenthalpiedifferenz zwischen Ausgangs- und Endzustand berücksichtigt wurde. Aus den beiden *cmc*-Werten kann ΔG_{demic}^o mit $\Delta G_{demic}^o = -RT \cdot \ln cmc'$ (Gl. 2.9; $cmc' \equiv cmc$ in Molenbruch-Einheiten) berechnet werden. $T\Delta S_{demic}$ wird aus der GIBBS-HELMHOLTZ-Gleichung (Gl. 2.5) erhalten. Die thermodynamischen Parameter der Demizellisierung sind in der Abb. 3.33 und in der Tab. B.1 (Anhang B) zusammengefasst. Der Kurvenanpassung liegt ein Polynom 2. Grades zugrunde.

Der Vergleich der thermodynamischen Parameter in der Abb. 3.33 lässt die starke Temperaturabhängigkeit von ΔH_{demic} und $T\Delta S_{demic}$ erkennen. ΔG_{demic} hingegen besitzt große positive Werte und hängt kaum von der Temperatur ab. $T\Delta S_{demic}$ ist deutlich negativ. Der Betrag nimmt mit steigender Temperatur ab. Die ΔH_{demic} -Kurve verläuft in ähnlicher Weise und besitzt einen Abszissenschnittpunkt bei etwa 25°C. Am Punkt $\Delta H_{demic} = 0$ erfolgt die Mizellbildung rein Entropie-getrieben. Es findet ein Wechsel des Vorzeichens der Reaktionsenthalpie von exotherm nach endotherm statt, die *cmc* hat ein Minimum. Bei höheren Temperaturen verlagert sich die treibende Kraft zum Enthalpieterm. Dieses Verhalten der thermodynamischen Parameter ist für den hydrophoben Effekt mit der Enthalpie-Entropie-Kompensation charakteristisch [39, 41, 67], wie auch andere Studien für die GS [84, 116, 118] und ionische (z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS) [118]) als

auch nichtionische (z.B. OG [118], Nonylglucosid (NG) [362]) Detergentien bewiesen. Die Mizellbildung von NaO konnte in NaCl nicht untersucht werden, da wegen der Verschiebung der cmc zu tieferen Konzentrationen das ITC-Detektionslimit unterschritten wurde. Aus der Temperaturabhängigkeit von ΔH_{demic} ergibt sich die Änderung der Wärmekapazität $\Delta C_{p,demic}$ nach Gl. 2.4 durch Differentiation. Da ΔH_{demic} nach einem Polynom 2. Grades angepasst wurde, resultiert für $\Delta C_{p,demic}$ eine lineare Funktion der Temperatur. Die $\Delta C_{p,demic}$ -Werte sind im gesamten T -Bereich positiv, woraus auf einen Transfer von hydrophoben Molekülstrukturen in eine wässrige Umgebung bei der Demizellierung geschlossen werden kann, da $\Delta C_{p,demic}$ eine lineare Funktion der dem Wasser ausgesetzten hydrophoben Oberfläche darstellt [40, 363]. Bei RT werden für NaO in H_2O als $\Delta C_{p,demic}$ $780 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ erhalten. Dieser Wert liegt deutlich über denen der GS [84] mit $240 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaC/ H_2O , $260 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaC/NaCl, $360 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaDC/ H_2O und $340 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ für NaDC/NaCl.

Der Beitrag der Hydratation der hydrophilen Strukturen bzw. der der Gegenionen bei der Demizellierung ist vernachlässigbar klein. Der von MARCUS [364] angegebene ΔC_p -Wert für die Hydratation von Na^+ -Ionen beträgt $-42 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, woraus sich unter Berücksichtigung des Gegenionenbindungsgrades von aliphatischen Detergentien mit etwa 0,6 [100] ein $\Delta C_{p,demic}$ -Beitrag von etwa $25 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ errechnen lässt. Der wesentlich höhere $\Delta C_{p,demic}$ -Wert von NaO gegenüber den GS basiert auf der stärker ausgeprägten Polaritätstrennung und somit höheren Lipophilie der Alkylkette von NaO im Vergleich zu den wegen der strukturellen Besonderheiten der GS mehr „verteilten“ hydrophilen Gruppen und einer damit verbundenen geringeren Lipophilie.

Die Bestimmung der Mizellgröße von NaO- als auch von NaC- und NaDC-Mizellen erfolgte mit der DLS. Die Abb. 3.34 zeigt die R_h -Werte als Funktion der Temperatur. Die verwendeten Konzentrationen wurden analog denen der ITC-Solubilisierungs- und Demizellierungsexperimente gewählt. Aus der Abb. 3.34 wird deutlich, dass in beiden Medien sowohl bei NaC als auch bei NaDC zwei verschiedene Mizellspezies auftreten, während bei NaO nur eine Größe zu ermitteln war.

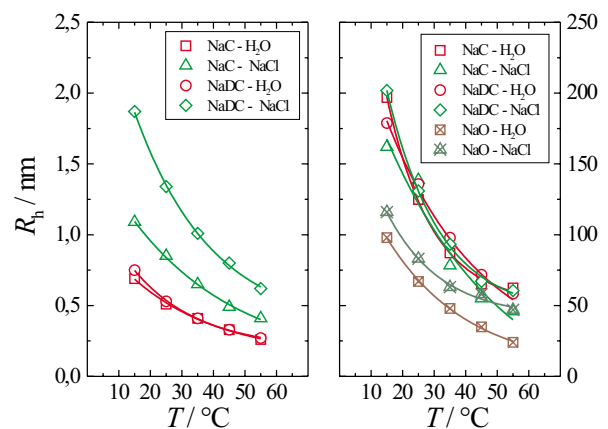


Abb. 3.34: Hydrodynamische Radien R_h von NaC-, NaDC- und NaO-Mizellen in H_2O (150, 100, 40 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100, 50, 20 mM) als Funktion der Temperatur; Mizellspezies: links - klein, rechts - groß

Die Größen der beiden GS-Mizellspezies unterscheiden sich um zwei Zehnerpotenzen. Daraus wird geschlussfolgert, dass es sich bei den kleinen Teilchen um sphärische Primärmizellen handelt, während die größeren Partikel den stäbchenförmigen Sekundärmizellen nach der Primär-Sekundär-Mizell-Hypothese von SMALL [87] zuzuordnen sind. Die erhaltenen R_h -Werte korrelieren mit den DLS-Daten von MAZER et al. [79–81], LIU [365] und JANICH et al. [366], die für die Primärmizellen R_h -Werte von 1,0–2,5 nm erhielten. Die Größe der Sekundärmizellen hängt nach MAZER et al. [80, 81, 136–138] sehr stark von GS-Typ und -Konzentration, Ionenstärke des Mediums und Temperatur ab.

Alle Mizellgrößen weisen eine exponentielle Abnahme mit steigender Temperatur auf. Die Verkleinerung der Partikelgröße und die damit verbundene Zunahme des Diffusionskoeffizienten mit steigender Temperatur nach der STOKES-EINSTEIN-Beziehung (Gl. 2.13) ist mit einer Verringerung der Mizellaggregationszahl n_A und dem steigenden Monomeranteil in der Lösung verbunden. Insbesondere bei den kleinen GS-Mizellen wird der Einfluss der Ionenstärke des Mediums und des GS-Typs deutlich. In der NaCl-Lösung nehmen die n_A -Werte und somit auch die Mizellgrößen und -massen durch die bessere elektrostatische Abschirmung zu. JANICH [288] stellte für das NaDC-Glycinkonjugat eine n_A -Änderung von zwei auf fünf mit steigender Ionenstärke fest. Das beobachtete Verhalten der Mizellgrößen – Dihydroxy-GS > Trihydroxy-GS – stimmt mit Literaturdaten überein [78, 79, 87, 367].

Bei den NaO-Mizellen konnten auch größere R_h -Werte in NaCl gegenüber H_2O gemessen werden, die höher liegen als die der primären GS-Mizellen. Das Mizellwachstum von NaO-Mizellen in NaCl wird durch Daten von OEDBERG et al. [368] und KAIBARA et al. [369] belegt, die bei 35°C in 0,1 M NaCl R_h -Werte von 63–74 nm fanden. Dies ist auf die von REISS-HUSSON und LUZZATI [370] durch Röntgenstreuung und von TERUI [371] durch Lichtstreuung ermittelte Stäbchenform der NaO-Mizellen zurückzuführen.

3.2.1.2 Gallensalz/Na-Oleat-Gemische

Im Folgenden wird auf die Studien zur Charakterisierung der Mizellbildung in Mischungen aus GS und NaO in H_2O bzw. 0,1 M NaCl eingegangen. Dazu kamen GS/NaO-Gemische im molaren Verhältnis 5:2 zum Einsatz. Diese Systeme sind von besonderem Interesse, da sie ein GS mit der speziellen Steroidstruktur und ein klassisches, aliphatisches Detergens vom Seifentyp enthalten. Beide Detergentien sind einfach negativ geladen.

Die *cmc*-Bestimmung der GS/NaO-Gemische wurde mittels ITC analog den NaO-Experimenten vorgenommen. Die ermittelten *cmc*-Werte sind in der Abb. 3.35 als VAN'T HOFF-Kurven dargestellt. Die charakteristischen Merkmale der Mizellbildung der reinen GS [84] treten ebenso bei den GS/NaO-Gemischen auf. Bei RT besitzen die *cmc*'s der NaC/NaO- und NaDC/NaO-Gemische ein Minimum.

Die cmc 's der Mischungen mit dem stärker hydrophilen NaC liegen über denen der Systeme mit dem stärker hydrophoben NaDC. Dieser Unterschied ist in NaCl wesentlich deutlicher als in H_2O . In NaCl mit der höheren Ionenstärke findet die typische Verschiebung der cmc -Werte zu tieferen Konzentrationen statt. Insgesamt ruft der NaO-Zusatz zu den GS-Mizellen eine Verringerung der cmc hervor, wie auch BENZONANA [372] für NaDC/NaO-Mischungen in 0,1 M NaCl belegte.

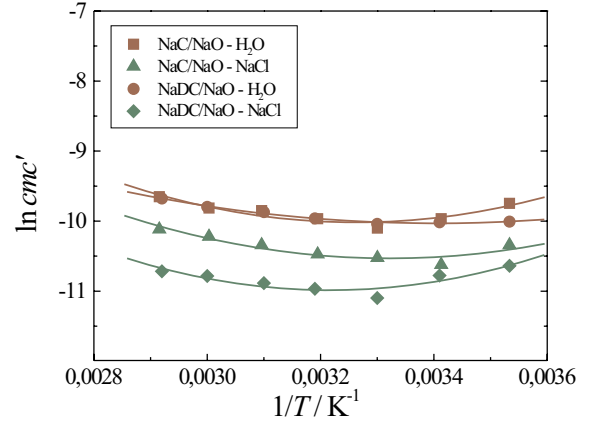


Abb. 3.35: VAN'T HOFF-Darstellung der Temperaturabhängigkeit von cmc' : NaC/NaO- und NaDC/NaO-Gemische (5:2) in H_2O (150/60, 75/30 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100/40, 50/20 mM), pH 7,5

Die Überprüfung der gemessenen cmc -Werte der GS/NaO-Gemische wird durch die Berechnung der Misch- cmc (cmc_{mix}) aus den experimentell ermittelten Daten für die beiden Einzelkomponenten möglich. Dies wurde für die NaC/NaO- und NaDC/NaO-Systeme in H_2O durchgeführt. Die cmc von binären Detergensmischungen wird durch die cmc 's der beiden Einzelkomponenten und deren Verteilung zwischen der mizellaren und der wässrigen Phase beeinflusst. Nach LANGE und BECK [373] bzw. CLINT [374] ergibt sich cmc_{mix} unter der Annahme eines idealen Mischungsverhaltens mit dem Molenbruch α des GS:

$$\frac{1}{cmc_{mix}} = \left(\frac{\alpha}{cmc_{GS}} \right) + \left(\frac{(1-\alpha)}{cmc_{NaO}} \right) \quad (3.16)$$

Diese Beziehung wurde von RUBINGH [375] auf nichtideale Mischungen unter Einbeziehung des Konzeptes der regulären Lösungstheorie erweitert. Damit kann der Wechselwirkungsparameter β_W berechnet werden. Ein β_W -Wert $\neq 0$ entspricht einem nichtidealen Mischungsverhalten der beiden Detergentien.

$$\beta_W = \frac{\ln \left(\frac{\alpha \cdot cmc_{mix}}{x_{GS} \cdot cmc_{GS}} \right)}{(1-x_{GS})^2} \quad (3.17)$$

x_{GS} ist der Molenbruch des GS in den Mischmizellen, der durch das Lösen der numerischen Gleichung erhalten wird:

$$x_{GS}^2 \ln \left(\frac{\alpha \cdot cmc_{mix}}{x_{GS} \cdot cmc_{GS}} \right) = (1-x_{GS})^2 \ln \left(\frac{(1-\alpha) \cdot cmc_{mix}}{(1-x_{GS}) \cdot cmc_{NaO}} \right) \quad (3.18)$$

Die Werte β_W und x_{GS} dienen der Berechnung des Aktivitätskoeffizienten f :

$$f_{GS} = e^{\beta_W(1 - x_{GS})^2} \qquad f_{NaO} = e^{\beta_W x_{GS}^2} \qquad (3.19)$$

Die Aktivitätskoeffizienten der beiden Detergentien werden bei der cmc_{mix} -Ermittlung nach RUBINGH [376] berücksichtigt und in die Gl. 3.16 einbezogen:

$$\frac{1}{cmc_{mix}} = \left(\frac{\alpha}{f_{GS} \cdot cmc_{GS}} \right) + \left(\frac{(1 - \alpha)}{f_{NaO} \cdot cmc_{NaO}} \right) \qquad (3.20)$$

Die experimentell und rechnerisch erzielten cmc_{mix} -Werte sind im Vergleich zu den experimentellen Daten der beiden Einzelkomponenten in der Abb. 3.36 dargestellt und in den Tab. B.2 und B.3 zusammengefasst. Die Misch- cmc 's der GS/NaO-Systeme befinden sich zwischen denen der beiden Detergentien, aber näher an der tieferen cmc von NaO. Die Differenz zwischen den experimentellen und den berechneten cmc_{mix} -Werten ist für die Anwendung von Gl. 3.20 unter Annahme einer nichtidealen Mischung nach RUBINGH [375] geringer als für die ideale Verhältnisse voraussetzende Gl. 3.16 nach CLINT [374].

Für die NaC/NaO-Gemische ($\bar{x}_{NaC} = 0,22$) nimmt die Differenz mit steigender Temperatur leicht zu. Bei diesen Systemen wurde für β_W im Bereich von 20°C bis 70°C ein Durchschnittswert von $-1,13$ ermittelt, bei 10°C betrug $\beta_W -0,38$. Negative β_W -Werte sind für die Abweichung vom idealen Mischungsverhalten und eine synergistische Interaktion der beiden Detergentien charakteristisch. Im Gegensatz dazu sind die experimentellen und berechneten cmc_{mix} -Werte für die NaDC/NaO-Gemische ($\bar{x}_{NaDC} = 0,27$) im Bereich von 20°C bis 50°C fast identisch, wie aus den β_W -Werten nahe Null hervorgeht. Es handelt sich demzufolge um annähernd ideale Mischungen. Nur bei tiefen und hohen Temperaturen treten leichte Abweichungen zu negativen β_W -Werten auf, die gegenüber NaC/NaO geringere Beträge und somit eine schwächere, synergistische Wechselwirkung besitzen.

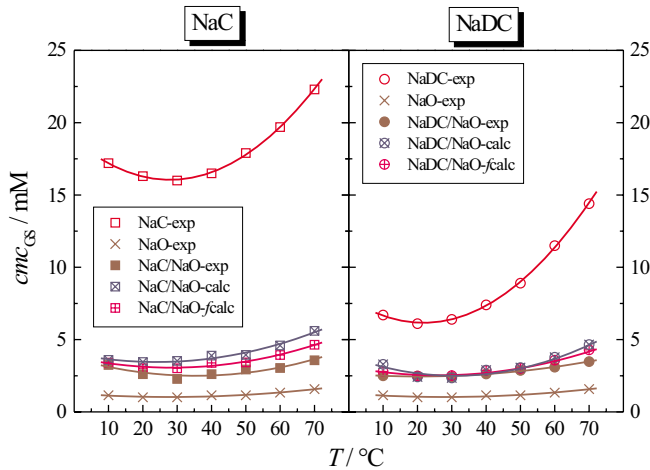


Abb. 3.36: Temperaturabhängigkeit der cmc 's der einzelnen Detergentien NaC, NaDC und NaO im Vergleich zu den NaC/NaO- und NaDC/NaO-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, mit experimentellen (exp) und berechneten Werten nach CLINT ($calc$) und RUBINGH unter Einbeziehung der Aktivitätskoeffizienten ($fcalc$)

Negative β_W -Werte wurden sowohl für die GS-Interaktion mit anionischen Detergentien wie SDS von JANA und MOULIK [377] als auch mit nichtionischen Oligo(ethylenoxid)-alkylethern und Sorbitanmonooleat von HAQUE et al. [378, 379] ermittelt. Der Synergismus wird durch die günstige Änderung der Packung der Mischmizellen und die damit verbundene Reduzierung der Ladungsdichte hervorgerufen [380].

Die Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter der Demizellierung von GS/NaO-Gemischen in beiden Medien zeigt die Abb. 3.37. Das bei der NaO-Demizellierung genannte, charakteristische Verhalten der Größen als Funktion der Temperatur tritt auch bei den GS/NaO-Systemen auf. Der Abszissenschnittpunkt, d.h. der Wechsel des Vorzeichens der Reaktionsenthalpie von exotherm nach endotherm, ist im Vergleich zu NaO und den GS [84] bei den GS/NaO-Gemischen in H_2O zu einer geringfügig tieferen Temperatur, etwa $20^\circ C$, verlagert. Bei den GS/NaO-Gemischen in NaCl befindet sich der Schnittpunkt bei $25^\circ C$. Die Differentiation von ΔH_{demic} nach der Temperatur liefert die Änderung der Wärmekapazität. Die erhaltenen $\Delta C_{p\ demic}$ -Werte (Abb. 3.37) besitzen größere Beträge als bei den GS allein (vgl. S.71), sind aber wesentlich kleiner als $\Delta C_{p\ demic}$ von NaO mit $780\ J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1}$.

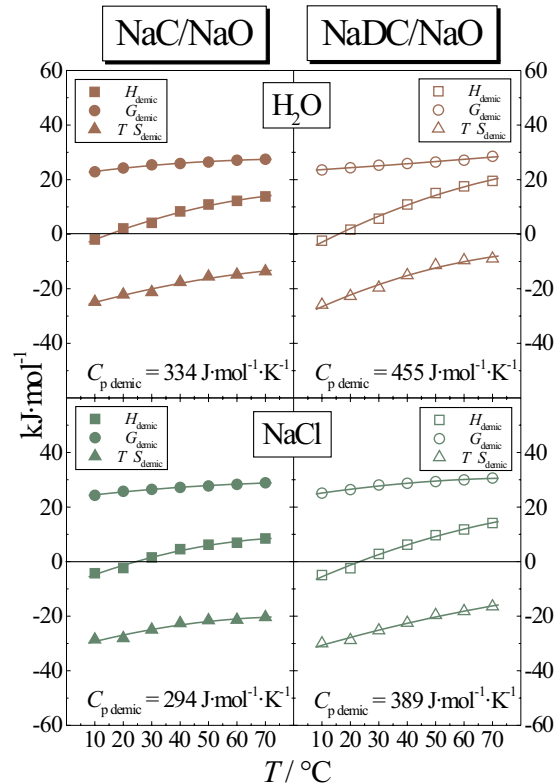


Abb. 3.37: Thermodynamische Parameter der Demizellierung von GS/NaO-Gemischen (5:2) in H_2O bzw. $0,1\ M\ NaCl$, $pH\ 7,5$, vs. T ; $\Delta C_{p\ demic}$ bei $25^\circ C$

Das beruht auf den unterschiedlichen Beiträgen des Transfers der hydrophoben Strukturen von NaO und den GS in die wässrige Umgebung. Der Transfer von NaO-Molekülen in die wässrige Phase kann als ungünstiger im Vergleich zu dem der GS-Moleküle angesehen werden. Da NaO zu einem geringeren molaren Anteil in den GS/NaO-MM enthalten ist, liegen die $\Delta C_{p\ demic}$ -Werte der Gemische zwischen denen der beiden Einzelkomponenten, aber näher an denen der GS. Wie bei den GS allein sind die Beträge von $\Delta C_{p\ demic}$ für die Systeme mit dem stärker hydrophoben Dihydroxy-GS NaDC größer als die für die mit dem stärker hydrophilen Trihydroxy-GS NaC. Bei der Demizellierung der GS/NaO-Gemische scheint der Transfer in $0,1\ M\ NaCl$ günstiger als der in H_2O .

Die DLS diente der Untersuchung der Partikelgröße von GS/NaO-MM in H_2O bzw. 0,1 M NaCl. Die erhaltenen R_h -Werte sind in der Abb. 3.38 als Funktion der Temperatur zu sehen. Wie bei den GS-Mizellen treten auch bei den GS/NaO-Gemischen zwei Mizellspezies auf, deren Größe um zwei Zehnerpotenzen variiert. Die kleinen Teilchen verhalten sich analog den sphärischen, primären GS-Mizellen: die R_h -Werte sind für NaDC/NaO größer als für NaC/NaO und in H_2O kleiner als in NaCl.

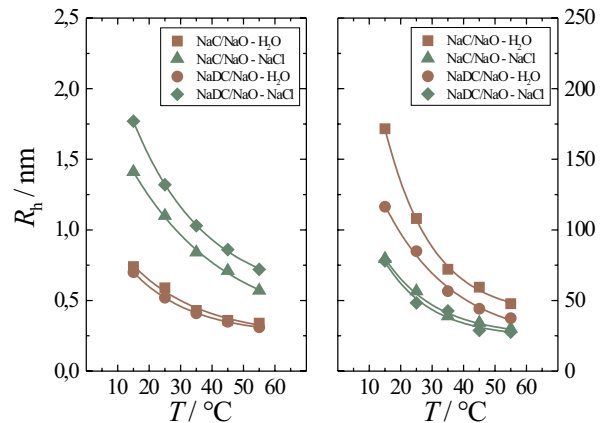


Abb. 3.38: Hydrodynamische Radien R_h von den NaC/NaO- und NaDC/NaO-Mischmizellen (5:2) in H_2O (150/60, 75/30 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100/40, 50/20 mM) als Funktion der Temperatur; Mizellspezies: links - klein, rechts - groß

Bei der Mizellspezies mit den großen R_h -Werten wird ein entgegengesetztes Verhalten beobachtet: die R_h -Werte sind hier für NaC/NaO größer als für NaDC/NaO und in NaCl kleiner als in H_2O . Bei den GS-Sekundärmizellen (Abb. 3.34) konnten keine derartigen Differenzen festgestellt werden. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Lipophilie der beiden GS und die verschieden ausgeprägte elektrostatische Abstoßung der polaren Gruppen der beiden Detergenstypen (GS und NaO) zurückzuführen. Das weniger polare NaDC ermöglicht in H_2O eine dichtere Packung mit NaO und eine höhere Krümmungstendenz als NaC. Daraus resultiert eine geringere Länge der Stäbchen-MM bei NaDC/NaO. Dieser Effekt wird in NaCl unterdrückt.

Die ermittelten Mizellgrößen korrelieren gut mit denen von HJELM et al. [381], die durch SANS an GS/NaO-Gemischen für kleine, sphärische Mizellen Radien von 1,5 nm bei Systemen mit Dihydroxy-GS und 1,4 nm bei solchen mit Trihydroxy-GS fanden, und auch die Existenz von langen, flexiblen Stäbchen-MM nachwiesen.

3.2.1.3 Gallensalz/Na-Palmitat-Gemische

Die Mizellbildung wurde auch an Mischungen von GS und NaP in H_2O bzw. 0,1 M NaCl untersucht. Im Gegensatz zu NaO mit einer *cis*-ständigen Doppelbindung ist die Seife der Palmitinsäure NaP eine gesättigte Verbindung mit all-*trans*-Konformation (Abb. 2.3). Dies beeinflusst die physikochemischen Eigenschaften in entscheidender Weise. Die Mizellbildung findet nur oberhalb der *cmc* und der *cmt* statt (Abschnitt 2.3.2).

Bei den GS befindet sich die *cmt* unterhalb von 0°C [27], bei NaO mit 16°C [360] noch unter RT, bei NaP hingegen bei 55°C [30]. Deshalb liegt NaP bei RT in Form einer trüben, kristallinen Suspension vor, als sogenanntes „Koagel“ [382], das sich durch starre Alkylketten und ein kaum hydratisiertes Kristallgitter auszeichnet [383]. Eine isotrope, mizellare Lösung tritt erst oberhalb der Koagel-Mizell-Umwandlung auf. Die *cmc*-Bestimmung von NaP war daher bei RT nicht möglich. Die *cmc* entspricht bei langkettigen FS-Seifen nicht exakt dem KRAFFT-Punkt, sondern ist etwas unterhalb, wie DE MUL et al. [384] durch DSC-, IR- und Röntgenstudien belegen konnten.

Die *cmc*-Bestimmung der GS/NaP-Gemische wurde mit der ITC wie bei NaO und den GS/NaO-Systemen durchgeführt. Die VAN'T HOFF-Darstellung der *cmc*'s von NaC/NaP- und NaDC/NaP-Gemischen in beiden Medien in der Abb. 3.39 zeigt die Charakteristika der GS-Mizellisierung: die *cmc*-Werte verhalten sich nach dem typischen Muster mit NaC > NaDC und NaCl < H₂O. Die Differenzen sind bei den GS/NaP-Gemischen stärker ausgeprägt als bei den GS/NaO-Mischungen (Abb. 3.35).

Eine Untersuchung der Idealität des Detergensgemisches auf der Grundlage der oben beschriebenen Methode nach RUBINGH [375] war im Fall der GS/NaP-Systeme nicht möglich, da die *cmc*-Werte von NaP nicht vorlagen.

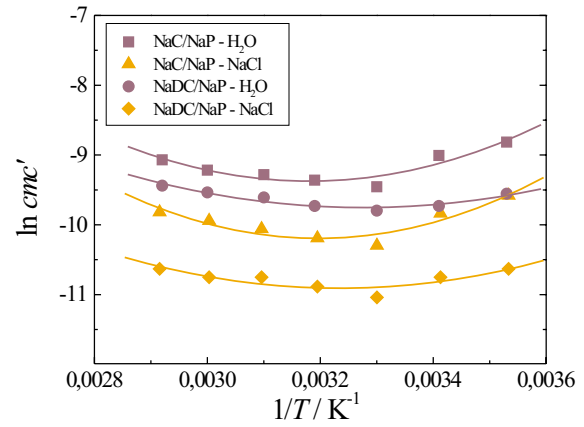


Abb. 3.39: VAN'T HOFF-Darstellung der Temperaturabhängigkeit von *cmc*' : NaC/NaP- und NaDC/NaP-Gemische (5:2) in H₂O (150/60, 75/30 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100/40, 50/20 mM), pH 7,5

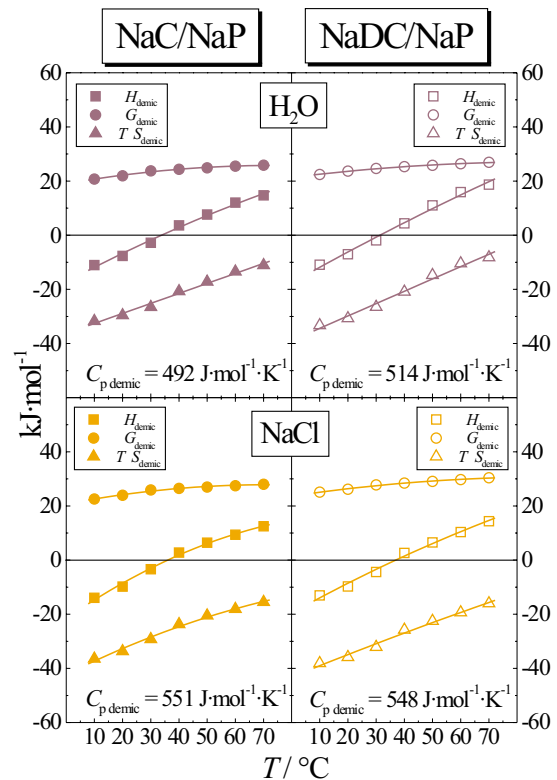


Abb. 3.40: Thermodynamische Parameter der Demizellisierung von GS/NaP-Gemischen (5:2) in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, vs. T; ΔC_p^{dem} bei 25°C

Die thermodynamischen Parameter der Demizellisierung von den GS/NaP-Mischungen in beiden Medien haben die gleiche Tendenz wie NaO und die GS/NaO-Gemische (Abb. 3.41). Der Schnittpunkt der ΔH_{demic} -Kurven, der dem Wechsel der Reaktionsenthalpie von exo nach endotherm entspricht, ist bei den GS/NaP-Systemen zu ca. 35°C verschoben.

Im Vergleich zu den GS/NaO-Gemischen besitzen die NaP-haltigen Systeme wesentlich höhere ΔC_p demic-Werte. Dies wird auf die größere Lipophilie der gesättigten Palmitinsäurekette gegenüber dem einfach ungesättigten NaO zurückgeführt. Bei Letzterem ist der Alkylkettenbereich wegen der *cis*-ständigen Doppelbindung gegenüber NaP stärker hydratisiert. Daraus resultiert, verglichen mit den GS/NaO-MM, ein durch die Demizellisierung hervorgerufener, ungünstigerer Transfer der hydrophoben Strukturen der GS/NaP-MM in die wässrige Umgebung. Die für die GS allein [84] als auch die GS/NaO-Systeme beobachteten Unterschiede zwischen den NaC- und NaDC-haltigen Systemen treten bei GS/NaP-Gemischen nicht auf. Daraus wird entnommen, dass das gegenüber den GS-Molekülen extrem lipophile NaP den Hauptbeitrag zu ΔC_p demic leistet. Die starke Lipophilie von NaP in GS/NaP-MM belegen Studien von LICHTENBERG et al. [385] und SALLEE [386], die für NaP in mischmizellaren GS/NaP-Lösungen eine Monomerlöslichkeit von $< 1 \mu\text{M}$ bzw. exakt $0,56 \mu\text{M}$ ermittelten.

Der oben genannte Einfluss der *cmt* auf das Aggregationsverhalten von NaP-haltigen Gemischen geht auch aus den durch DLS gemessenen Partikelgrößen der GS/NaP-Systeme in H₂O bzw. 0,1 M NaCl hervor (Abb. 3.41). Im Gegensatz zu den GS/NaO-MM tritt hierbei nur eine Mizellspezies auf.

Es ist zu sehen, dass unterhalb der NaP-*cmt* ($T < 55^\circ\text{C}$) sehr große Partikel existieren. Erst über der *cmt* werden R_h -Werte in der Größenordnung der GS/NaO-MM erreicht. Unterhalb der *cmt* besitzt NaP keine Detergenseigenschaften, sondern wird durch die GS solubilisiert. Die lineare Abhängigkeit der R_h -Werte von T ist durch die lineare Zunahme der NaP-Löslichkeit in den GS-Mizellen mit steigender Temperatur erklärbar, die SMITH und LOUGH [387,388] feststellten.

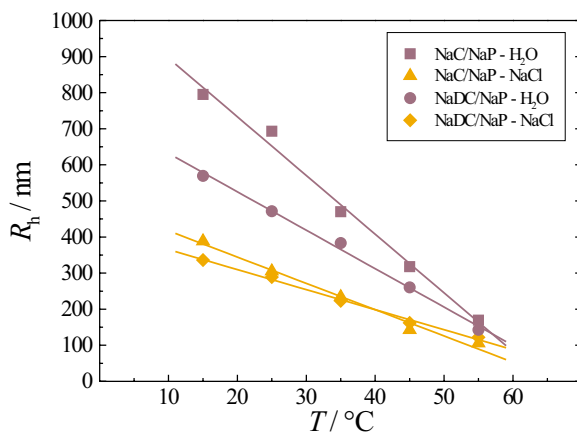


Abb. 3.41: Hydrodynamische Radien R_h von den NaC/NaP- und NaDC/NaP-Mischmizellen (5:2) in H₂O (150/60, 75/30 mM) und 0,1 M NaCl (100/40, 50/20 mM) als Funktion der Temperatur

Die GS/NaP-Partikel zeigen ein äquivalentes Verhalten zu den GS/NaO-Sekundär-MM (Abb. 3.38): die R_h -Werte sind in H_2O größer als in NaCl und für die NaDC/NaP-MM kleiner als für die NaC/NaP-MM. Dies basiert wahrscheinlich wie bei den NaO-haltigen Systemen auf differierenden Aggregatstrukturen, die sich durch die verschiedenen elektrostatischen Interaktionen zwischen den NaC- bzw. NaDC- und den NaP-Molekülen mit unterschiedlicher Polarität ergeben. NaCl unterdrückt diesen Effekt im Vergleich zu H_2O .

3.2.1.4 Zusammenfassung

Die Kombination der ITC-Demizellierungsexperimente mit den DLS-Messungen ermöglicht die Charakterisierung der Mizellbildung von GS/NaO- und GS/NaP-Systemen im Vergleich zu der in NaC- bzw. NaDC- und NaO-Lösungen. Die Abb. 3.42 zeigt eine Gegenüberstellung der cmc 's von GS/NaO- und GS/NaP-Gemischen sowie die von beiden GS und NaO in H_2O bzw. 0,1 M NaCl. Die GS/FS-Mischungen verhalten sich analog den reinen GS. Die cmc -Werte weisen für alle Gemische die charakteristischen Merkmale der GS-Mizellbildung auf: die cmc 's der NaC-haltigen Systeme liegen über denen der NaDC-haltigen und sind jeweils in H_2O größer als in NaCl. Die erhöhte Ionenstärke der Salzlösung führt zu einer stärkeren Abschirmung der geladenen Kopfgruppen der Detergensmoleküle und somit zu einer Reduzierung der elektrostatischen Abstoßung. Das begünstigt die Aggregation. Dadurch wird die cmc zu tieferen Konzentrationen verlagert.

Die NaC-haltigen Gemische besitzen höhere cmc -Werte als die mit NaDC. Das Dihydroxy-GS NaDC ist stärker hydrophob als NaC mit drei Hydroxylgruppen und aggregiert deshalb bei niedrigeren Konzentrationen. Die cmc 's der GS/NaO-Gemische liegen zwischen den GS und NaO, jedoch näher bei den NaO-Werten. Die Richtigkeit der Misch- cmc 's (Abb. 3.36) wurde durch die Berechnung aus den cmc -Daten der Einzelkomponenten nachgewiesen.

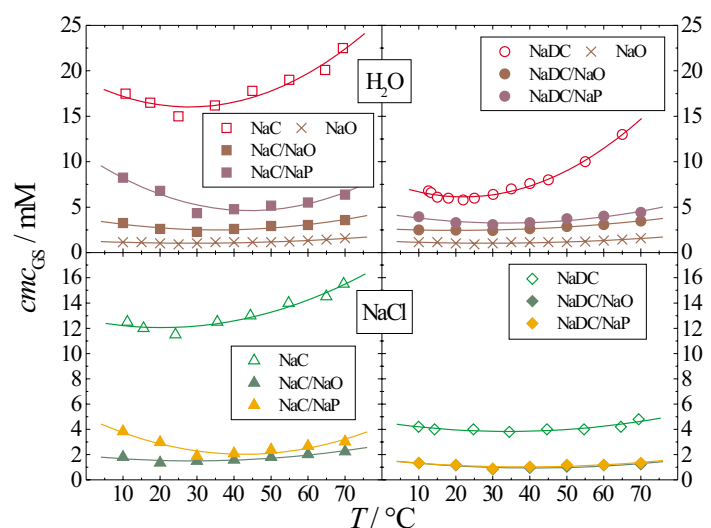


Abb. 3.42: Vergleich der cmc 's (GS-Konzentration cmc_{GS} vs. Temperatur) von NaC und NaDC mit NaC/NaO- und NaDC/NaO- sowie NaC/NaP- und NaDC/NaP-Gemischen (molare Verhältnisse 5:2) in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5

Dabei konnte für die NaC-haltigen Systeme eine synergistische Abweichung vom idealen Mischungsverhalten bestimmt werden, während sich NaDC und NaO annähernd ideal mischen. Für die GS/NaP-Gemische ist ein analoges Verhalten wahrscheinlich.

Die Betrachtung der Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Demizellierungsparameter lässt für NaO sowie die GS/NaO- und GS/NaP-Gemische die gleichen Tendenzen wie für die GS [84] erkennen. Bei tiefen Temperaturen verläuft die Mizellbildung Entropie-gesteuert, während bei hohen Temperaturen enthalpische Effekte überwiegen. Dies ist für den hydrophoben Effekt charakteristisch. Aus der Temperaturabhängigkeit von ΔH_{demic} kann $\Delta C_{p,demic}$ berechnet werden, die Aussagen über die Wechselwirkung von hydrophoben Molekülteilen mit Wasser während der Demizellierung erlaubt. Die Beiträge der Kopfgruppenhydratation sind vernachlässigbar klein. Je höher der Anteil hydrophober Molekülstrukturen in den Systemen ist, umso ungünstiger wirkt sich deren Transfer in die wässrige Umgebung aus. Dies verdeutlichen die erhaltenen Beträge für $\Delta C_{p,demic}$: $GS < GS/NaO < NaO$ und $GS/NaO < GS/NaP$.

Bei den GS und deren Gemischen mit NaO und NaP findet die Mizellbildung in einem definierten Konzentrationsbereich statt. Bei NaO hingegen treten zwei kritische Konzentrationen auf: 1. für die Aggregation zu sphärischen Mizellen, und 2. für die Umwandlung in stäbchenförmige Mizellen. Der erste Prozess verläuft in der typischen Weise der Mizellbildung von ionischen Detergentien, während der zweite Prozess ausschließlich endotherm ist, da bei dieser Strukturänderung hydrophobe Effekte nicht mehr überwiegen.

Die Abb. 3.43 liefert einen Überblick über die R_h -Werte der GS/NaO- und der GS/NaP-Gemische sowie von NaC, NaDC und NaO. Auf das abweichende Verhalten von GS/NaP wurde bereits oben hingewiesen. Es ist ersichtlich, dass die GS-Mizellen etwas größer als die NaO-Mizellen und die GS/NaO-MM sind. Insgesamt konnten für diese Systeme ähnliche Partikelgrößen mit NaC und NaDC sowohl in H_2O als auch in NaCl erhalten werden.

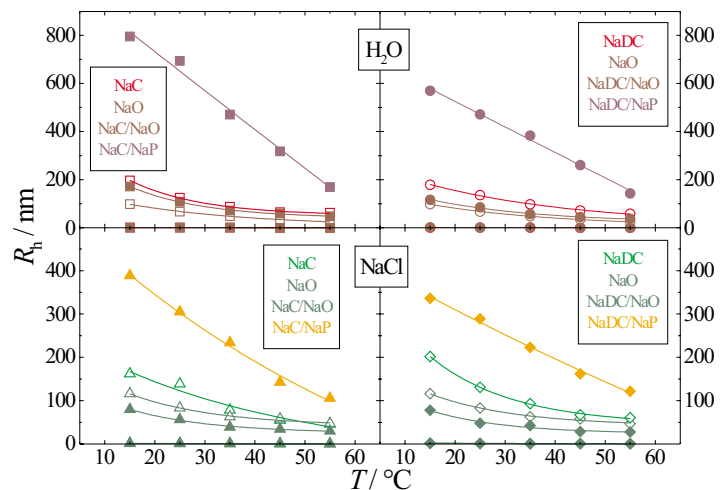


Abb. 3.43: Vergleich der R_h -Werte der einzelnen Detergentien NaC, NaDC und NaO (offene Symbole) sowie der NaC/NaO-, NaDC/NaO- und NaC/NaP-, NaDC/NaP-Gemische (molare Verhältnisse 5:2) (geschlossene Symbole) in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5

3.2.2 Verteilung

Die Verteilung von GS/NaO- und GS/NaP-Gemischen in DPPC-Vesikeln in H₂O bzw. 0,1 M NaCl ist mit der ITC untersucht worden. Die Verteilungsexperimente mit den GS/FS-Systemen (molare Verhältnisse 5:2) wurden zur vergleichenden Betrachtung analog denen der einzelnen GS in DPPC-Membranen ausgeführt.

Die Messungen fanden bei 60°C statt, da die Temperatur einerseits oberhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur von DPPC (41,4°C) und andererseits oberhalb der *cmt* von NaP (55°C) sein musste. Die Auswahl der Konzentrationen der GS/FS-Mischungen unterhalb deren Misch-*cmc*'s basiert auf den Demizellierungsexperimenten (Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.1.3).

3.2.2.1 Gallensalz/Na-Oleat-DPPC-Systeme

Die Abb. 3.44 beinhaltet die Ergebnisse der Verteilungsexperimente der GS/NaO-Gemische in beiden Medien. Einen Überblick über die thermodynamischen Parameter der Verteilung von GS/NaO in DPPC-Membranen gibt die Tab. 3.11.

Diese Systeme haben wie bei der GS-Verteilung negative Transferenthalpien ΔH^T , deren Beträge mit NaDC/NaO > NaC/NaO aber im Vergleich zu den Mizellisierungsenthalpien ΔH_{mic} der GS/NaO-Systeme (Tab. B.4-B.7) bei 60°C gering sind. Eine Mizellbildung kann unter Verteilungsbedingungen jedoch nicht stattfinden, da die Detergenskonzentrationen jeweils unterhalb der *cmc* lagen. Gegenüber der Verteilung der GS in den DPPC-Vesikeln verläuft diese bei den GS/NaO-Gemischen mit Ausnahme der NaDC-haltigen Systeme in 0,1 M NaCl, bei denen die ΔH^T -Werte für NaDC und NaDC/NaO annähernd identisch sind, wesentlich stärker exotherm. Dieser Effekt tritt am deutlichsten wiederum bei den NaDC-haltigen Gemischen in NaCl auf.

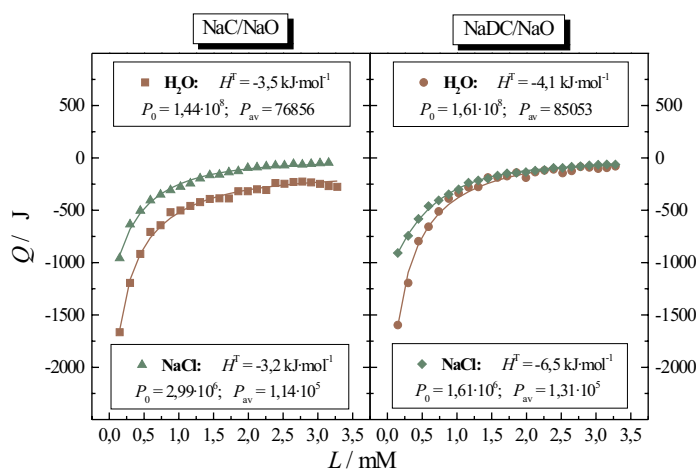


Abb. 3.44: Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L für die Verteilung von NaC/NaO (5:2) und NaDC/NaO (5:2) in DPPC-Vesikeln (20 mM) bei 60°C in H₂O (2/0,8, 2/0,8 mM) bzw. 0,1 M NaCl (1/0,4, 0,5/0,2 mM): intrinsische, mittlere Verteilungskoeffizienten P_0 , P_{av} , Transferenthalpien ΔH^T ; Punkte: experimentelle Daten, Linien: berechnete Daten für 25x10 μ l

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von ΔH^T beim Transfer von GS/NaO aus der wässrigen Phase in die DPPC-Vesikel war durch die erforderliche Temperatur von 60°C nicht möglich.

Die intrinsischen Verteilungskoeffizienten P_0 verhalten sich für die GS/NaO-Gemische analog den GS: NaDC > NaC in H₂O und NaC > NaDC in NaCl. Im Vergleich zu den reinen GS sind die P_0 - ebenso wie die P_{av} -Werte größer. Die höheren P -Werte und die stärker exothermen Transferenthalpien der GS/NaO-Gemische gegenüber der GS-Inkorporation korrelieren mit den $\Delta C_{p\ mic}$ -Beträgen, die für die Mizellbildung in GS-Lösungen kleiner sind als in GS/NaO-Mischungen. Der Anteil an lipophileren NaO-Molekülen verstärkt, verglichen mit den GS, das Aggregationsbestreben der GS/NaO-Systeme. Da eine Mizellbildung wegen der unzureichenden Detergengkonzentration nicht möglich ist, kommt es zum gesteigerten Einbau der GS-Moleküle in die DPPC-Membranen, um die Abschirmung der hydrophoben Strukturen vor dem Wasser zu gewährleisten.

Im Gegensatz zur GS-Verteilung in DPPC-Vesikeln treten bei den GS/NaO-Gemischen nicht die beobachteten Unterschiede im Verteilungsverhalten bzw. im Verteilungskurvenverlauf zwischen NaC- und NaDC-haltigen Systemen auf. Dies ist wahrscheinlich durch den der GS-Inkorporation vorangehenden NaO-Einbau bedingt. Dadurch verschwinden die Differenzen zwischen den beiden GS im Anfangsbereich der Verteilungskurven.

Die ΔG^T -Beträge sind in Übereinstimmung mit denen der GS deutlich größer als die der Mizellbildung ΔG_{mic} . Bei den GS/NaO-Systemen wird wie bei der GS-Verteilung die Abhängigkeit von der Konzentration an Aggregat-gebundenem Detergens und der dadurch bedingten Aufladung der Vesikeloberfläche sichtbar. Die ΔG_{av}^T - und P_{av} -Werte sinken betragsmäßig mit steigendem Detergensanteil, in H₂O stärker als in NaCl, da durch die erhöhte Ionenstärke in NaCl die elektrostatischen Effekte abgeschwächt werden.

Tab. 3.11: Thermodynamische Parameter für die Verteilung der NaC/NaO- (5:2) und der NaDC/NaO-Gemische (5:2) in DPPC-Vesikeln in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C

	NaC/NaO + DPPC in H ₂ O	NaC/NaO + DPPC in NaCl	NaDC/NaO + DPPC in H ₂ O	NaDC/NaO + DPPC in NaCl
P_0	$1,44 \cdot 10^8$	$2,99 \cdot 10^6$	$1,61 \cdot 10^8$	$1,61 \cdot 10^6$
P_{av}	76856	$1,14 \cdot 10^5$	85053	$1,31 \cdot 10^5$
$\Delta H^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-3,5	-3,2	-4,1	-6,5
$\Delta G_0^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-52,0	-41,3	-52,3	-39,6
$\Delta G_{av}^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	-31,2	-32,3	-31,4	-32,6
$T \Delta S_0^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	48,5	38,1	48,3	33,1
$T \Delta S_{av}^T / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	27,7	29,1	27,4	26,2

3.2.2.2 Gallensalz/Na-Palmitat-DPPC-Systeme

Die Resultate der Verteilungsuntersuchungen von NaC/NaP- und NaDC/NaP-Gemischen in H₂O bzw. 0,1 M NaCl sind in der Abb. 3.45 und der Tab. 3.12 zusammengefasst. Auch die NaP-haltigen Systeme besitzen negative ΔH^T -Werte, die wesentlich kleiner als ΔH_{mic} der GS/NaP-Mischungen (Tab. B.8-B.11) bei 60°C sind. Die Transferenthalpien haben im Vergleich zu GS/NaO bis auf die NaC-Systeme in H₂O bei GS/NaP kleinere Beträge. NaDC/NaP in NaCl weist die betragsmäßig größten ΔH^T -Werte auf, die allerdings nicht so stark exotherm sind wie bei der GS- bzw. GS/NaO-Verteilung in DPPC-Vesikeln.

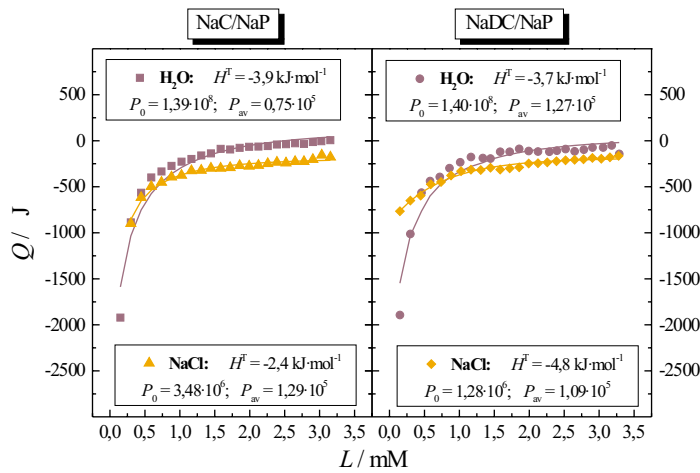


Abb. 3.45: Reaktionswärme Q vs. Lipidkonzentration L für die Verteilung von NaC/NaP (5:2) und NaDC/NaP (5:2) in DPPC-Vesikeln (20 mM) bei 60°C in H₂O (2/0,8, 2/0,8 mM) bzw. 0,1 M NaCl (1/0,4, 0,5/0,2 mM): intrinsische, mittlere Verteilungskoeffizienten P_0 , P_{av} , Transferenthalpien ΔH^T ; Punkte: experimentelle Daten, Linien: berechnete Daten für $25 \times 10 \mu\text{l}$

In H₂O lassen sich zwischen NaC/NaP und NaDC/NaP nur geringfügige Unterschiede bei den thermodynamischen Parametern feststellen. Auch der Verlauf der Verteilungskurven der beiden Systeme ähnelt sich. Die Unterschiede im anfänglichen Verlauf der Verteilungskurven der NaC- und NaDC-haltigen Systeme, die bei der Verteilung von GS beobachtet wurden, treten wie bei den GS/NaO-Systemen hier nicht auf. In NaCl ergaben sich zwischen NaC/NaP und NaDC/NaP Differenzen, die jedoch im Vergleich zu den GS bzw. den GS/NaO-Systemen ein geringeres Ausmaß annehmen.

Die P_0 - und P_{av} -Werte der GS/NaP-Gemische liegen in der gleichen Größenordnung der GS/NaO-Systeme deutlich über denen der reinen GS. Ein höherer Verteilungskoeffizient entspricht laut dessen Definition (Gl. 3.1) einem größeren Anteil an Membran-gebundenem Detergens. Auch in diesem Fall sind die gemischten GS/NaP-Systeme gegenüber den einzelnen GS stärker bestrebt, den höheren Anteil an hydrophoben Molekülstrukturen vor dem Wasser zu schützen. Dies gelingt wegen der geringen Detergenskonzentration unterhalb der *cmc* nur durch die Membraninkorporation. In NaCl ergibt sich wie bei GS/NaO eine geringere Abhängigkeit vom Detergensanteil in den Vesikeln und der damit verbundenen Aufladung der Membranoberfläche als in H₂O.

Tab. 3.12: Thermodynamische Parameter für die Verteilung der NaC/NaP- (5:2) und der NaDC/NaP-Gemische (5:2) in DPPC-Vesikeln in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C

	NaC/NaP + DPPC in H ₂ O	NaC/NaP + DPPC in NaCl	NaDC/NaP + DPPC in H ₂ O	NaDC/NaP + DPPC in NaCl
P_0	$1,39 \cdot 10^8$	$3,48 \cdot 10^6$	$1,40 \cdot 10^8$	$1,28 \cdot 10^6$
P_{av}	$0,75 \cdot 10^5$	$1,29 \cdot 10^5$	$1,27 \cdot 10^5$	$1,09 \cdot 10^5$
$\Delta H^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-3,9	-3,7	-4,1	-4,8
$\Delta G_0^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-51,9	-41,7	-52,0	-39,0
$\Delta G_{av}^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-31,1	-32,6	-32,6	-32,1
$T\Delta S_0^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	48,0	39,3	48,3	34,2
$T\Delta S_{av}^T/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	27,2	30,2	28,9	27,3

3.2.2.3 Zusammenfassung

In Analogie zu den einzelnen GS verläuft die Verteilung von GS/NaO- und GS/NaP-Systemen in DPPC-Vesikeln ausschließlich exotherm. Dies ist wiederum bei den NaDC-haltigen Gemischen in NaCl am stärksten ausgeprägt. Die thermodynamischen Parameter, die auf der Grundlage des im Abschnitt 3.1.1.1 beschriebenen Verteilungsmodells berechnet wurden, liegen bei beiden Na-Salzen der FS in der gleichen Größenordnung. Die Verteilungskoeffizienten sind für die GS/NaO- und GS/NaP-Gemische deutlich größer als für die GS. Es wird daraus entnommen, dass die Verteilung der FS-enthaltenden Mischungen gegenüber den GS begünstigt ist. Dies ist auch aus den ermittelten $\Delta C_{p\ mic}$ -Beträgen ersichtlich.

Im Unterschied zur Membranverteilung von GS-Molekülen konnten bei den GS/NaO- und GS/NaP-Systemen keine Differenzen zwischen NaC und NaDC im Anfangsbereich der Verteilungskurven festgestellt werden. Die Kurven zeigen bei NaO und NaP für beide GS einen ähnlichen Verlauf.

Aus den erhaltenen Verteilungsgrößen lassen sich keine Aussagen zum Mechanismus und Ablauf des Verteilungsprozesses ableiten. Eine dem GS-Einbau vorangehende Inkorporation der lipophilen FS-Moleküle in die DPPC-Membranen ist denkbar. Der Einbau von GS führt nach SCHUBERT et al. [200–202] in den Membranen zu einer Bildung von transienten Poren und somit zu einer Störung der Membranintegrität. Der Einbau von FS hingegen bedingt eine Steigerung der Membranstabilität, da durch die Integration der FS eine dichtere Membranpackung im Vergleich zum reinen DPPC mit der voluminösen, sterisch ungünstigen Cholin-Kopfgruppe erzielt wird, wie FERNANDEZ et al. [389] durch Lichtstreu-Experimente nachweisen konnten.

3.2.3 Solubilisierung

3.2.3.1 Gallensalz/Na-Oleat-DPPC-Systeme

Für die Charakterisierung des Einflusses von NaO auf die DPPC-Solubilisierung kamen GS/NaO-Gemische im molaren Verhältnis 5:2 zum Einsatz. Die ITC-Experimente erfolgten in gleicher Weise wie die Solubilisierungsstudien mit den GS (Abschnitt 3.1.1.1) in H_2O bzw. 0,1 M NaCl bei $60^\circ C$.

Die Abb. 3.46 zeigt je ein Beispiel einer Solubilisierungsmessung mit NaC/NaO und NaDC/NaO in H_2O . Die Betrachtung der Wärmefluss-Zeit-Diagramme (Abb. 3.46 A', A'') lässt deutliche Unterschiede zwischen den Systemen mit dem Tri- bzw. Dihydroxy-GS erkennen. Dies geht auch aus den im Bereich der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung umgesetzten Reaktionswärmern (Abb. 3.46 B', B'') hervor, die für die NaC/NaO- wesentlich geringer als für die NaDC/NaO-Systeme sind. Während bei den NaC-haltigen Gemischen alle Detergensinjektionen einen endothermen Wärmeeffekt hervorrufen, werden bei den NaDC-haltigen Mischungen im Koexistenzbereich schwach exotherme Q -Werte erhalten. Dieses Verhalten wurde bis zu den höchsten hier untersuchten DPPC-Konzentrationen von 10 mM beobachtet.

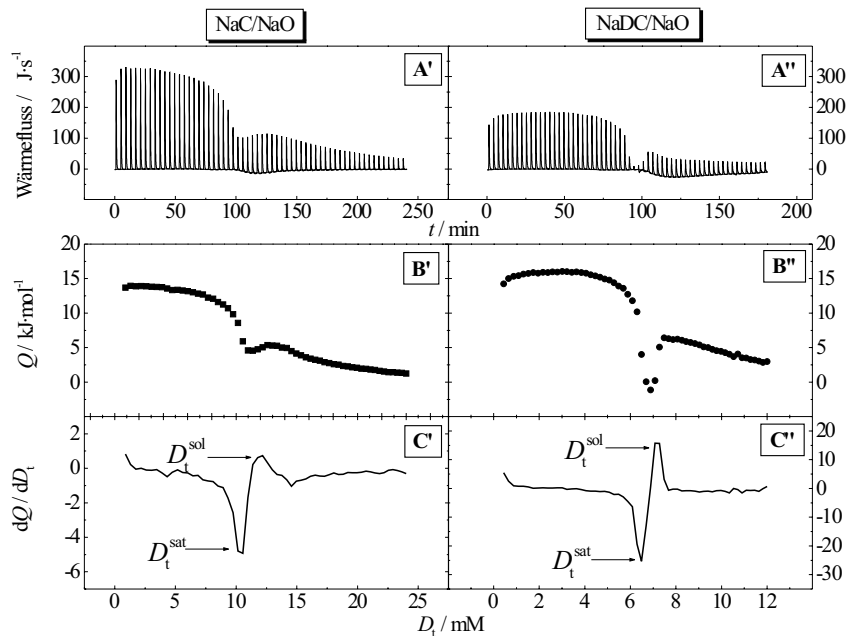


Abb. 3.46: ITC-Solubilisierungsexperiment: Titration ($60 \times 4 \mu l$) einer NaC/NaO- (150/60 mM, links) und NaDC/NaO-Lösung (75/30 mM, rechts) in eine DPPC-Dispersion (4 mM) in H_2O , pH 7,5, bei $60^\circ C$: A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) molare Reaktionswärme Q als Funktion der Detergenskonzentration D_t , C) 1. Ableitung von B) mit den Extremstellen D_t^{sat} und D_t^{sol} für Sättigung bzw. Solubilisierung

Zur Erstellung der Phasendiagramme (Abb. 3.47) wurden DPPC-Dispersionen im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mM verwendet. Die kritischen Detergenskonzentrationen für die Sättigung der DPPC-Vesikel D_t^{sat} und deren komplette Solubilisierung D_t^{sol} konnten aus den Extremstellen der ersten Ableitung von Q nach D_t bestimmt werden (Abb. 3.46 C', C''). Eine Zusammenfassung der Kenngrößen der Phasenumwandlung von den GS/NaO-DPPC-Mischungen in H_2O bzw. 0,1 M NaCl liefert die Tab. 3.13.

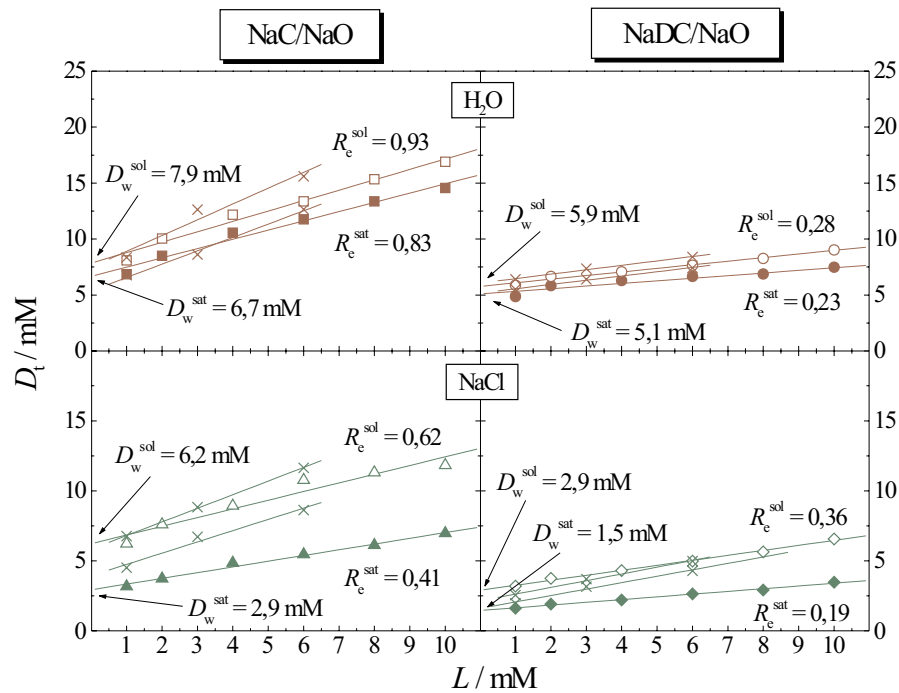


Abb. 3.47: Phasendiagramme für NaC/NaO-DPPC- und NaDC/NaO-DPPC-Systeme (5:2) in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei $60^\circ C$: Detergenskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L ; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} (geschlossene Symbole), D_t^{sol} (offene Symbole), Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat} , R_e^{sol} und Ordinatenschnittpunkte D_w^{sat} , D_w^{sol} ; DLS-Phasengrenzen (Kreuze)

Die Phasengrenzen liegen für die beiden Systeme in H_2O und für das NaDC/NaO-DPPC-System in NaCl wie bei den GS-DPPC-Gemischen relativ dicht beieinander. Nur im Fall von NaC/NaO-DPPC in NaCl ist der Koexistenzbereich etwas breiter. Das Phasenverhalten weist die bereits bei den GS-PL-Mischungen festgestellten charakteristischen Merkmale auf. Die D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte sind bei den NaDC-haltigen Systemen im Vergleich zu denen mit NaC zu niedrigeren Detergenskonzentrationen verschoben.

In H_2O zeigt sich bei einer DPPC-Konzentration von 1 mM eine leichte Abweichung von der Linearität der Phasengrenzen, die durch den bereits erwähnten Einfluss der finiten Mizellgröße und der „Endkappen-Effekte“ der zylinderförmigen MM bedingt wird (Abschnitt 3.1.2.1) [176,311]. Diese ist aber nicht so stark ausgeprägt wie bei den GS-DPPC-

Systemen (Abb. 3.10). Die Existenz von großen, zylinderförmigen MM lässt sich auch aus den DLS-Ergebnissen für die GS/NaO-DPPC-Systeme in H_2O ableiten, die in der Abb. 3.48 dargestellt sind. Im mischmizellaren Bereich oberhalb der Solubilisierungsgrenze treten neben kleinen sphärischen Mizellen auch größere Partikel auf, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um flexible Stäbchen-MM handelt.

In NaCl verlaufen die Phasengrenzen linear, zeigen aber gegenüber H_2O die typische Verbreiterung des Koexistenzbereiches mit zunehmender Lipidkonzentration. Die D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte befinden sich in NaCl bei niedrigeren Detergenkonzentrationen im Vergleich zu H_2O , da die Aggregation im Medium mit der höheren Ionenstärke begünstigt ist.

Bei der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung dieser ternären Systeme können zwei wesentliche Unterschiede gegenüber den binären GS-DPPC-Gemischen festgestellt werden: 1. die Phasengrenzen für NaC/NaO-DPPC und NaDC/NaO-DPPC in H_2O liegen bei tieferen Detergenkonzentrationen als für NaC-DPPC und NaDC-DPPC, und 2. ergeben sich für NaC/NaO-DPPC in beiden Medien höhere R_e -Werte als für NaC-DPPC in H_2O bzw. NaCl. Daraus lässt sich ableiten, dass die Phasentransformation der ternären Systeme geringere Detergenkonzentrationen als die der binären Gemische erfordert, da in diesem Fall die Solubilisierung der DPPC-Membranen durch das GS/NaO-Detergenmischungs-gemisch auf dem im Abschnitt 3.2.1.2 erklärten synergistischen Effekt beruht. Die NaC-haltigen ternären Mischaggregate besitzen aber eine abweichende Zusammensetzung von den binären MV und MM. Die R_e -Werte der NaC-DPPC-Mischungen sind auffallend klein, während die der NaC/NaO-DPPC-Gemische für die GS sehr große Werte haben. Da die R_e -Werte die Zusammensetzung der MV und MM im Koexistenzbereich widerspiegeln, kann auf einen höheren Detergenanteil in den Mischaggregaten geschlossen werden. Der insbesondere in H_2O auffallend große R_e^{sat} -Wert bedeutet, dass die gemischten Vesikel im Vergleich zu den binären Systemen hohe Detergenmengen aufnehmen können, bevor sie in MM umgewandelt werden. Dies entspricht einer durch den NaO-Einbau bedingten gesteigerten Membranstabilität gegenüber dem GS-Angriff. Dieses Ergebnis korreliert mit den für die ternären Systeme gefundenen höheren Verteilungskoeffizienten gegenüber den binären Mischungen und lässt auf eine Optimierung der Membranpackung durch die Inkorporation von FS-Molekülen schließen.

Die durch DLS erhaltenen Phasengrenzen (Abb. 3.47) stimmen gut mit denen der ITC überein. Die Ergebnisse der DLS-Solubilisierungsexperimente sind der Abb. 3.48 bzw. der Tab. 3.13 zu entnehmen. Die GS/NaO-DPPC-Systeme in 0,1 M NaCl verhalten sich ähnlich den GS-DPPC-Gemischen in der Salzlösung. Die Ausgangsgrößen der DPPC-Vesikel betragen wiederum $R_h \sim 30-40$ nm. Die Partikelgröße bleibt im MV-Bereich nahezu unverändert. Die Phasengrenzen lassen eine eindeutige Abhängigkeit von der DPPC-Konzentration erkennen. Im MM-Bereich werden sowohl bei NaC/NaO-DPPC als auch bei

NaDC/NaO-DPPC wie bei den GS-DPPC-Systemen konstante R_h -Werte von ca. 1,5 nm erreicht. Die initiale Größe der DPPC-Vesikel in H_2O liegt mit $R_h \sim 40$ -50 nm etwas über der in NaCl. Bei den GS/NaO-DPPC-Systemen in H_2O treten abweichend von den GS-DPPC-Mischungen wie bei den GS-SPC-Systemen im MM-Bereich zwei verschiedene Mizellspezies auf, sehr kleine und deutlich größere Partikel. Die R_h -Werte der großen Teilchen bewegen sich mit ~ 30 -50 nm in der Größenordnung der GS-SPC-Gemische bei $55^\circ C$ in H_2O (Abb. 3.28). Daraus wird die von MAZER et al. [81,323], COHEN et al. [152,154] und EGELHAAF et al. [146,344] nachgewiesene Existenz von Stäbchen-MM abgeleitet, die wie bei den GS-SPC-Mischungen neben den kleinen, sphärischen Mizellen vorkommen.

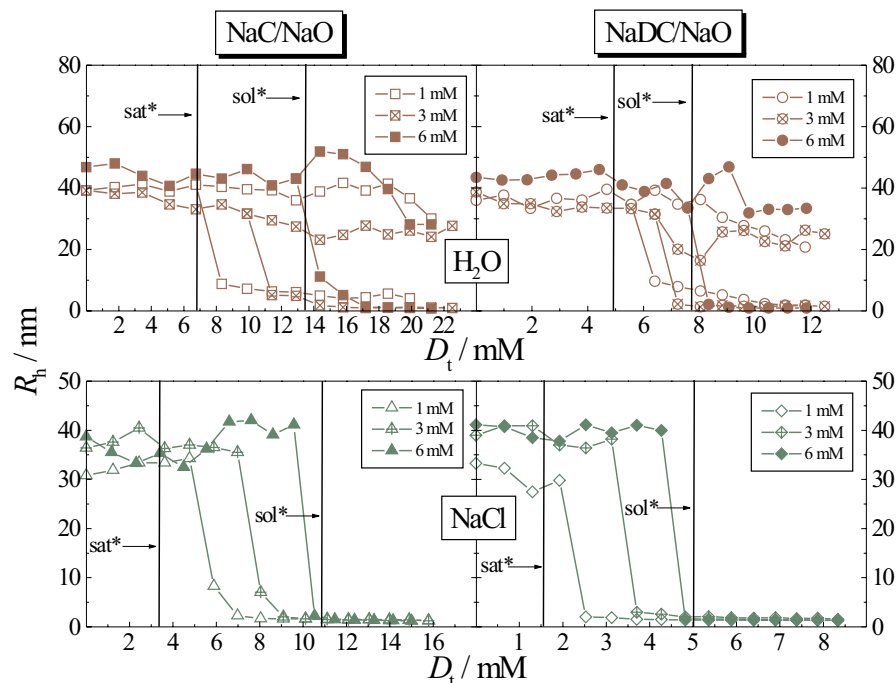


Abb. 3.48: DLS-Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC/NaO- und NaDC/NaO-Mischungen (5:2) in H_2O (150/60, 75/30 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100/40, 50/20 mM), pH 7,5, bei $55^\circ C$: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergentskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat*:1 mM, sol*: 6 mM DPPC)

Die DSC diente der Untersuchung des Einflusses von GS/NaO-Gemischen auf die DPPC-Membranstruktur. Die Abb. 3.49 zeigt die Thermogramme für die NaC/NaO-DPPC- und NaDC/NaO-DPPC-Mischungen in H_2O bzw. 0,1 M NaCl. Der DPPC-Dispersion mit einer konstanten Konzentration wurden wie bei den GS-DPPC-Systemen steigende Anteile des Detergentsgemisches zugesetzt, die sich aus den ITC-Phasendiagrammen ergaben. Die unterste Aufheizkurve in allen Diagrammen der Abb. 3.49 entspricht der von reinem DPPC ohne Detergens.

Tab. 3.13: ITC-, DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC/NaO (5:2) und NaDC/NaO (5:2) in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60°C

	NaC/NaO + DPPC in H ₂ O	NaC/NaO + DPPC in NaCl	NaDC/NaO + DPPC in H ₂ O	NaDC/NaO + DPPC in NaCl
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,83 / 1,19	0,41 / 0,81	0,23 / 0,38	0,19 / 0,45
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,93 / 1,41	0,82 / 0,97	0,28 / 0,40	0,36 / 0,48
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	6,7 / 5,4	2,9 / 3,9	5,1 / 5,2	1,5 / 1,6
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	7,9 / 7,5	6,2 / 6,1	5,9 / 5,8	2,9 / 2,2

Die Zugabe von geringen GS/NaO-Mengen führt bereits zum vollständigen Verschwinden des Vorumwandlungspeaks der L_{β'} → P_{β'}-Umwandlung bei 36°C und zu einer T_m-Verschiebung von 41,4°C zu tieferen Temperaturen in beiden Medien.

Mit steigender Detergenkonzentration ist die bereits bei den GS-DPPC-Systemen (Abb. 3.15) beobachtete weitere Verlagerung von T_m sowie die Verbreiterung des Hauptumwandlungspeaks zu sehen. In Analogie zu den GS/DPPC-Systemen wird im Koexistenzbereich eine Aufspaltung in zwei Peaks festgestellt, die durch das Auftreten von Gelphasenvesikeln neben solchen in der flüssigkristallinen Phase zustande kommt.

Die Peakgröße, d.h. die Umwandlungsenthalpie, nimmt ab, bis beim höchsten Detergensanteil der Peak fast verschwunden ist. Dieser Effekt tritt erst bei höheren Konzentrationen im Vergleich zur ermittelten Solubilisierungsgrenze auf. Demzufolge existieren in den Systemen, die dem MM-Bereich entsprechen, unter diesen Bedingungen noch geringe Mengen lamellarer Strukturen. Dies ist auf die reduzierte Detergensaufnahme-fähigkeit der Gelphasenvesikel zurückzuführen.

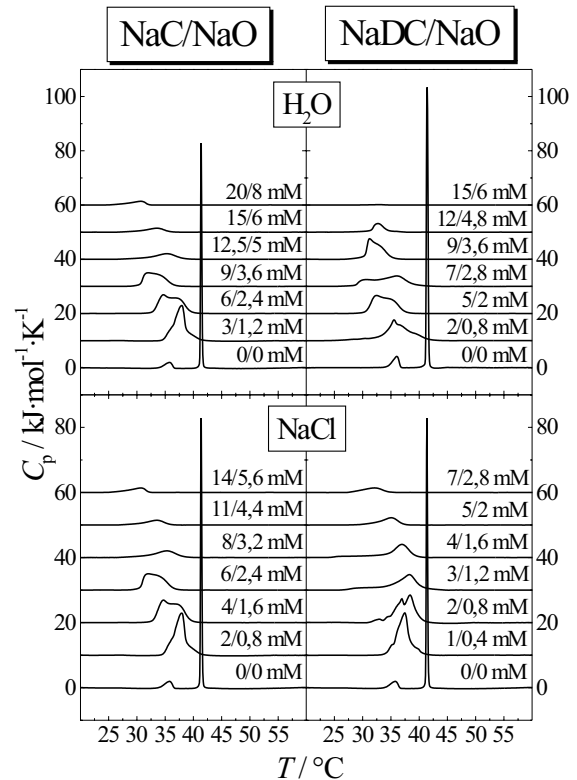


Abb. 3.49: DSC-Wärmekapazitätskurven von DPPC (6 mM) mit unterschiedlichen Anteilen an NaC/NaO (5:2) und NaDC/NaO (5:2) in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, im Temperaturbereich 20-60°C

3.2.3.2 Gallensalz/Na-Palmitat-DPPC-Systeme

Weitere Solubilisierungsuntersuchungen wurden an GS/NaP-DPPC-Systemen durchgeführt, um den Effekt einer gesättigten FS-Alkylkette auf die Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung zu charakterisieren. Die ITC-Messungen fanden in der gleichen Weise wie bei den GS-DPPC- bzw. GS/NaO-DPPC-Gemischen in H_2O bzw. 0,1 M NaCl bei $60^\circ C$ statt. Je ein Beispielerperiment mit NaC/NaP und NaDC/NaP in H_2O ist in der Abb. 3.50 enthalten.

Die Wärmefluss-Zeit-Kurven (Abb. 3.50 A', A'') ergeben ein den GS/NaO-DPPC-Gemischen ähnliches Verhalten hinsichtlich der Wärmeeffekte im Koexistenzbereich. Der Vergleich der Q - D_t -Diagramme von GS/NaP-DPPC (Abb. 3.50 B', B'') mit GS/NaO-DPPC (Abb. 3.46) lässt größere Änderungen der Reaktionswäme im Bereich der Phasengrenzen für die Systeme mit der gesättigten Komponente NaP erkennen. Die Injektion von NaC/NaP-Mischungen erzeugt wiederum nur endotherme Q -Werte, die von NaDC/NaP-Gemischen aber exotherme im Koexistenzbereich. Der Einsatz von DPPC-Dispersionen mit Konzentrationen von 1 bis 10 mM ermöglichte die Erstellung der in der Abb. 3.51 gezeigten Phasendiagramme unter Verwendung der aus den Extremstellen (Abb. 3.50 C', C'') erhaltenen D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte.

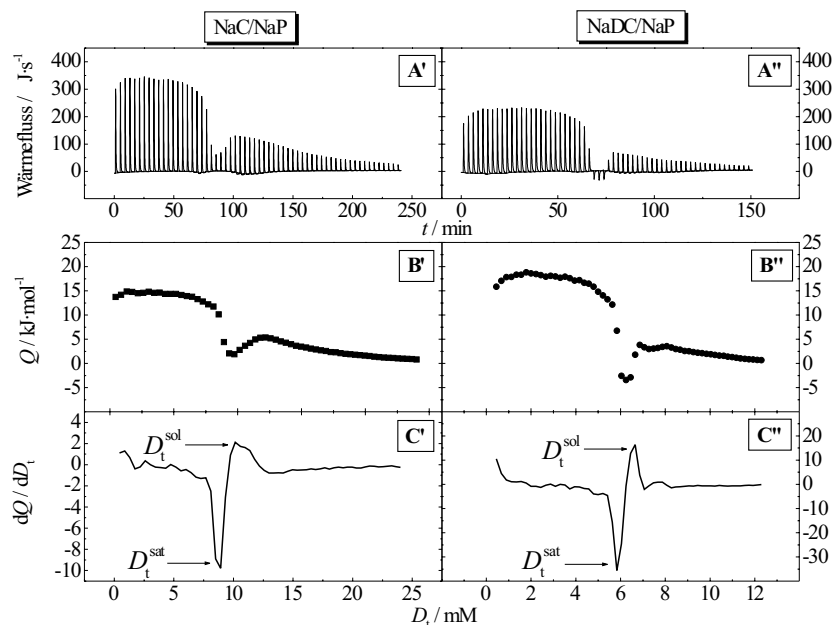


Abb. 3.50: ITC-Solubilisierungsexperiment: Titration ($60 \times 4 \mu l$) einer NaC/NaP- (150/60 mM, links) und NaDC/NaP-Lösung (75/30 mM, rechts) in eine DPPC-Dispersion (4 mM) in H_2O , pH 7,5, bei $60^\circ C$: A) Messdiagramm: Wärmefluss vs. Zeit, B) molare Reaktionswärme Q als Funktion der Detergenkonzentration D_t , C) 1. Ableitung von B) mit den Extremstellen D_t^{sat} und D_t^{sol} für Sättigung bzw. Solubilisierung

Die Phasengrenzen der GS/NaP-DPPC-Systeme in H₂O weichen bei einer DPPC-Konzentration von 1 mM geringfügig von der Linearität ab. Die der GS/NaP-DPPC-Systeme in NaCl verlaufen hingegen linear und verbreitern sich mit zunehmender Lipidkonzentration. Dieser Effekt konnte ebenfalls bei den GS-DPPC- und den GS/NaO-DPPC-Systemen beobachtet werden und ist im Abschnitt 3.1.2.1 ausführlich erläutert. Die Tab. 3.14 fasst die Ergebnisse der Solubilisierung von DPPC mit GS/NaP zusammen.

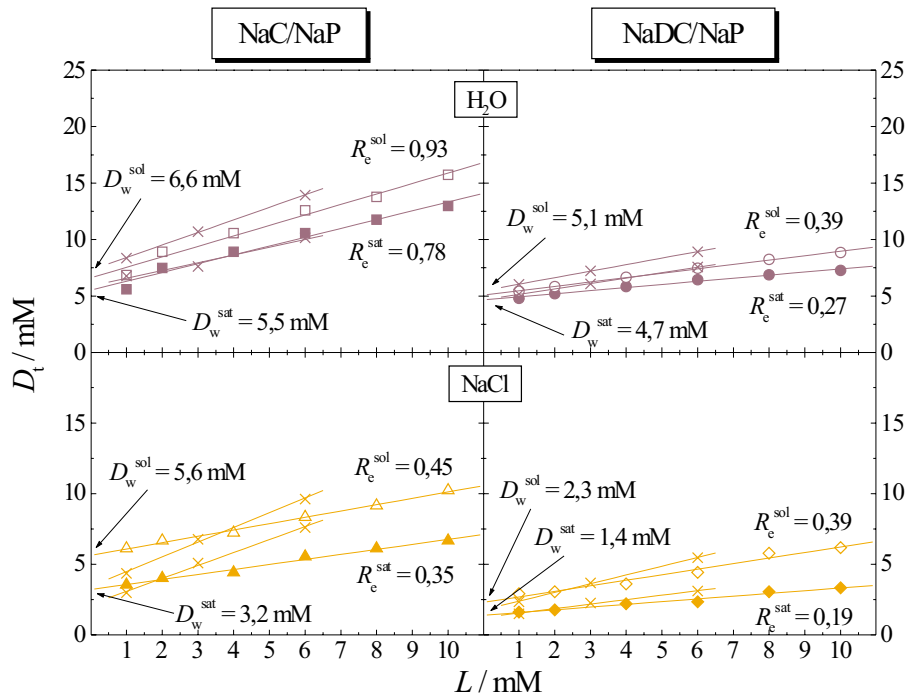


Abb. 3.51: Phasendiagramme für NaC/NaP-DPPC- und NaDC/NaP-DPPC-Systeme (5:2) in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C: Detergentskonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L; ITC-Phasengrenzen D_t^{sat} (geschlossene Symbole), D_t^{sol} (offene Symbole), Anstiege der Phasengrenzen R_e^{sat}, R_e^{sol} und Ordinaten Schnittpunkte D_w^{sat}, D_w^{sol}; DLS-Phasengrenzen (Kreuze)

Die D_t^{sat}- und D_t^{sol}-Werte befinden sich auch bei diesen NaP-haltigen Systemen relativ dicht beieinander. Der breiteste Koexistenzbereich tritt in Übereinstimmung mit den GS/NaO-DPPC-Ergebnissen bei NaC/NaP-DPPC in NaCl auf. Die charakteristischen Merkmale der GS-induzierten Vesikel-Mizell-Umwandlung werden auch bei diesen Systemen gefunden: die Phasengrenzen sind mit dem stärker hydrophoben Dihydroxy-GS NaDC gegenüber dem stärker hydrophilen NaC als auch durch den „Salzeffekt“ in der 0,1 M NaCl-Lösung zu tieferen Detergentskonzentrationen verschoben.

Die Lage der Sättigungs- und Solubilisierungsgrenzen hat die gleichen Tendenzen wie bei den GS/NaO-DPPC-Systemen. Mit NaP besitzen alle untersuchten Gemische im Vergleich

zu denen mit NaO etwas geringere D_t^{sat} - und D_t^{sol} -Werte. Daraus wird geschlussfolgert, dass durch die Inkorporation von NaP-Molekülen in die Vesikel geringere Detergenskonzentrationen zur Membransolubilisierung notwendig sind. Die Differenzen zur Phasenumwandlung in den GS-DPPC-Systemen entsprechen den im Abschnitt 3.2.2.1 genannten.

Die Abb. 3.52 und die Tab. 3.14 beinhalten die Ergebnisse der DLS-Solubilisierungsstudien an den GS/NaP-DPPC-Systemen. Für die durch Ultraschallbehandlung hergestellten DPPC-Vesikel konnten initiale R_h -Werte von ~ 40 nm gemessen werden. In Übereinstimmung mit den GS/NaO-DPPC-Gemischen (Abb. 3.48) ist die Abhängigkeit der Lage der Phasengrenzen von der Lipidkonzentration ersichtlich. Bei diesen NaP-haltigen Gemischen treten im MM-Bereich in beiden Medien zwei verschiedene Mizellspezies auf, die bereits bei den GS-SPC- und den GS/NaO-DPPC-Systemen beobachtet wurden. Die kleinen Mizellen besitzen annähernd konstante Radien von 1,5-2 nm, die R_h -Werte der großen Partikel bewegen sich wie bei den GS-SPC- und den GS/NaO-DPPC-Mischungen im Bereich von 30-50 nm. Die optische Klarheit der Lösungen bewies die vollständige Umwandlung der lamellaren Strukturen in MM.

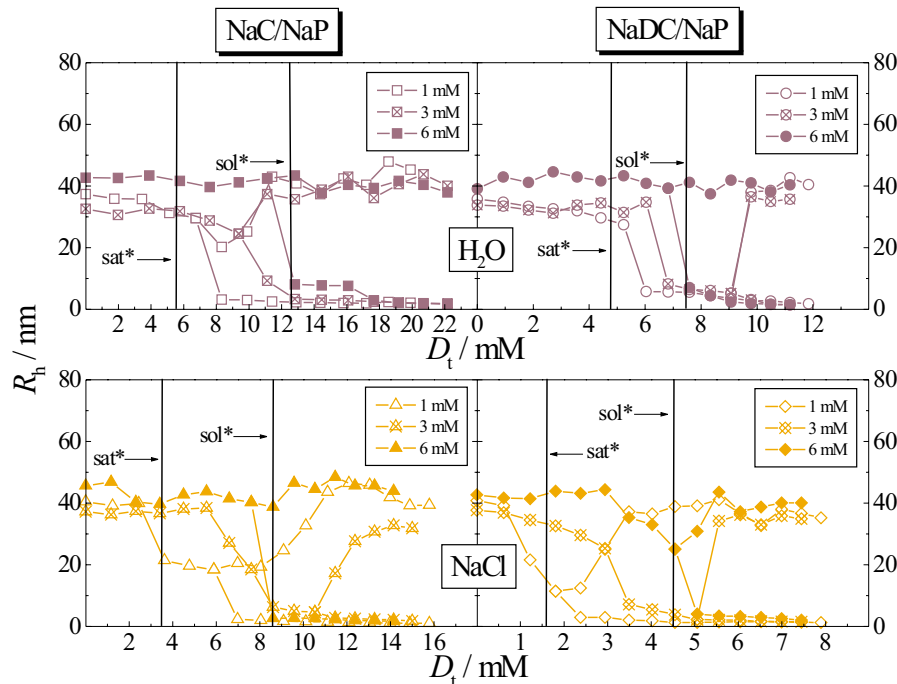


Abb. 3.52: DLS-Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC/NaP- und NaDC/NaP-Mischungen (5:2) in H_2O (150/60, 75/30 mM) bzw. 0,1 M NaCl (100/40, 50/20 mM), pH 7,5, bei 55°C: hydrodynamischer Radius R_h vs. Detergenskonzentration D_t ; senkrechte Linien = ITC-Phasengrenzen für Sättigung, Solubilisierung (sat^* : 1 mM, sol^* : 6 mM DPPC)

Tab. 3.14: ITC-, DLS-Kenngrößen der Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen für die Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC/NaP (5:2) und NaDC/NaP (5:2) in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, bei 60° C

	NaC/NaP + DPPC in H ₂ O	NaC/NaP + DPPC in NaCl	NaDC/NaP + DPPC in H ₂ O	NaDC/NaP + DPPC in NaCl
R_e^{sat} - ITC / DLS	0,78 / 0,69	0,35 / 0,91	0,27 / 0,48	0,19 / 0,32
R_e^{sol} - ITC / DLS	0,93 / 1,11	0,45 / 1,04	0,39 / 0,58	0,39 / 0,62
D_w^{sat} /mM - ITC / DLS	5,5 / 5,9	3,2 / 2,2	4,7 / 4,7	1,4 / 1,2
D_w^{sol} /mM - ITC / DLS	6,6 / 7,3	5,6 / 3,4	5,1 / 5,5	2,3 / 1,8

Der Einfluss des NaP-Zusatzes auf die Phasenumwandlung in GS-DPPC-Systemen wurde mittels DSC charakterisiert. Die Thermogramme in Abb. 3.52 zeigen für die GS/NaP-DPPC-Systeme ein von GS-DPPC und GS/NaO-DPPC abweichendes C_p - T -Profil.

Bei diesen Untersuchungen bestanden die Proben ebenfalls aus DPPC-Dispersionen konstanter Konzentration mit zunehmendem Anteil an Detergensgemisch, der anhand der ITC-Phasendiagramme ermittelt wurde. Die steigende Detergenskonzentration führt hierbei nicht zu einer Verringerung von T_m , sondern zu deren Erhöhung. Diese korreliert mit Ergebnissen von FERNANDEZ et al. [389], die einen T_m -Anstieg von 5°C durch die Inkorporation einer Palmitinsäure-Kette in DPPC-Doppelschichten fanden. Die Eingliederung der NaP-Alkylkette mit der gleichen Kettenlänge und der relativ kleinen Carboxylat-Kopfgruppe führt beim DPPC mit dem voluminösen Cholinrest zu einer Optimierung der Vesikelpackung und dadurch zu einer größeren T_m . Dieser Effekt kann mit dem wesentlich dichter gepackten Phosphatidylethanolamin verglichen werden, das dadurch einen um ca. 20°C höheren T_m -Wert [58] hat.

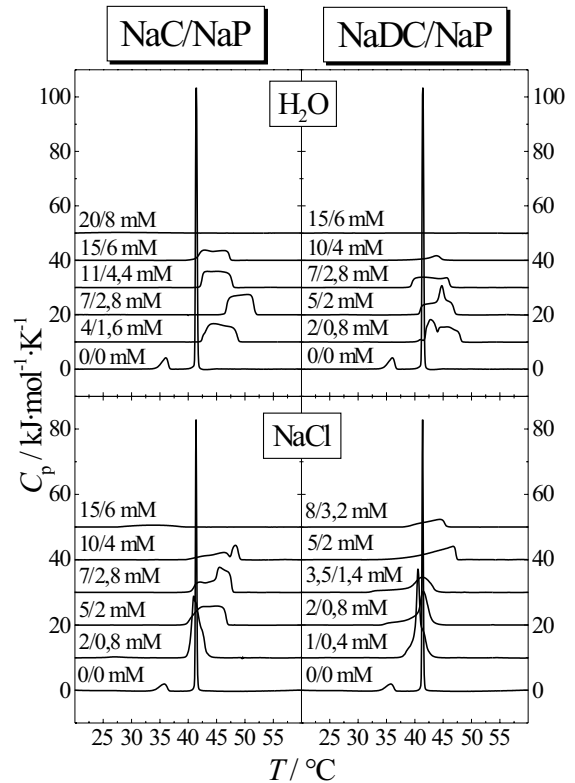


Abb. 3.53: DSC-Wärmekapazitätskurven von DPPC (6 mM) mit unterschiedlichen Anteilen an NaC/NaP (5:2) und NaDC/NaP (5:2) in H₂O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5, im Temperaturbereich 20-60° C

Die teilweise Aufspaltung der Peaks ist auf die Existenz von Vesikeln in der Gelphase und der flüssigkristallinen Phase zurückzuführen. Das komplette Verschwinden der Peaks, d.h. der lamellaren Strukturen, findet auch hier wegen des Vorliegens im Gelzustand erst bei höheren Detergenzkonzentrationen im Vergleich zu den ITC- und DLS-Ergebnissen statt.

3.2.3.3 Zusammenfassung

Die vorliegenden Solubilisierungsstudien ermöglichen den Vergleich der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung in binären GS-DPPC- und ternären GS/FS-DPPC-Systemen. In der Abb. 3.54 sind die Phasendiagramme der untersuchten NaC- und NaDC-haltigen Gemische in H_2O bzw. 0,1 M NaCl zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den binären und ternären Systemen werden bereits in den Wärmefluss-Zeit-Diagrammen deutlich (Abb. 3.9, 3.46, 3.50). Der gesamte Titrationsverlauf ergibt durch den Einbau einer FS-Komponente wesentlich stärker endotherme Effekte.

Die Merkmale der Lage der Phasengrenzen für die Sättigung und die Solubilisierung der DPPC-Vesikel ähneln sich bei den binären und ternären Mischungen: $NaC > NaDC$ in beiden Medien und $NaCl < H_2O$ für beide GS. Die Ursachen dafür wurden bereits im Abschnitt 3.1.2.1 erläutert. Die Betrachtung der Parameter der Phasenumwandlung lässt allerdings klare Unterschiede zwischen den binären und ternären Systemen erkennen.

Insgesamt liegen die Phasengrenzen der ternären Systeme unter denen der binären. Eine Ausnahme bildet das NaDC-haltige System in NaCl, da bei diesem die Phasengrenzen allgemein sehr tief liegen und somit eine Differenzierung erschwert ist. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Bildung von ternären MM bei geringeren GS-Konzentrationen gegenüber der von binären MM stattfindet. Durch den Zusatz der Seifen-Komponenten wird ein synergistischer Effekt der zwei Detergentien ausgelöst, der eine gesteigerte Solubilisierungseffizienz hervorbringt.

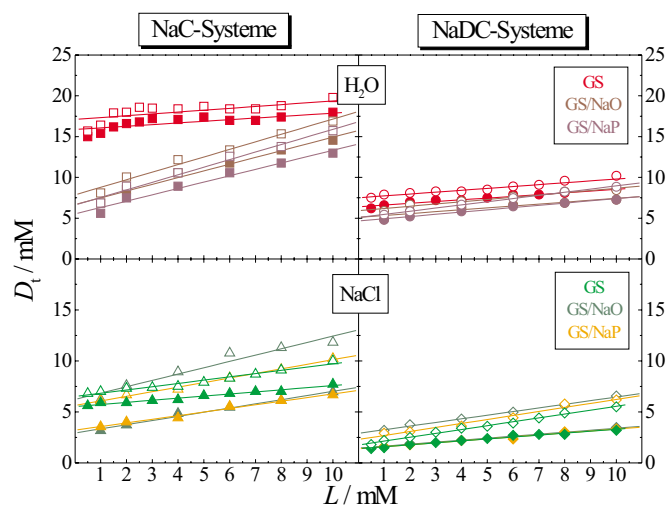


Abb. 3.54: Vergleich der Phasengrenzen der binären und ternären DPPC-Gemische: Detergenzkonzentration D_t vs. Lipidkonzentration L für die Solubilisierung von DPPC-Vesikeln mit NaC und NaDC, NaC/NaO und NaDC/NaO sowie NaC/NaP und NaDC/NaP (molare Verhältnisse 5:2) bei $60^\circ C$ in H_2O bzw. 0,1 M NaCl, pH 7,5

Dieser Effekt ist bei den NaP-haltigen Gemischen mit der gesättigten Alkylkette und der dadurch höheren Lipophilie der Systeme stärker ausgeprägt als bei den NaO-haltigen Mischungen.

Andererseits ergaben sich für die ternären Systeme, insbesondere das NaC-haltige Gemisch in H₂O, größere R_e^{sat} - und R_e^{sol} -Werte. Demzufolge beinhalten die Mischaggregate im Koexistenzbereich bei den ternären Systemen höhere Detergensanteile als bei den binären Gemischen. Die MV sind bei den GS/FS-DPPC-Mischungen erst bei größeren Detergensmengen gegenüber dem GS-Angriff anfällig. Das entspricht einer höheren Membranstabilität der ternären FS-enthaltenden MV.

Die DLS-Experimente zeigten das Auftreten von zwei unterschiedlichen Mizellspezies in den ternären Gemischen. Dabei handelt es sich einerseits um kleine, sphärische MM mit R_h -Werten von 1,5-2 nm, die auch bei den binären GS-DPPC-Systemen erhalten wurden. Diese Partikelgrößen stimmen mit denen von SCHWARZ et al. [390] überein, die für Mischungen aus DPPC, konjugierten GS und NaO R_h -Werte von 1,8-2 nm erhielten. Andererseits treten bei den ternären Systemen größere Teilchen im Bereich von 30-50 nm auf, die als lange, flexible Stäbchen-MM betrachtet werden können.

In der Literatur sind nur wenige Arbeiten bezüglich ternärer GS/FS-PL-Mizellen vorhanden. Die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen von SCHWARZ et al. [391, 392] erbrachten den Nachweis, dass die Aufnahmefähigkeit von lipophilen Arzneistoffen in die stabilen, ternären MM besser als in binäre MM ist und im Wesentlichen durch die Mizellgröße und die Lipophilie der Mizellen und nicht durch deren Ladung bestimmt wird. Diese Feststellung stützt die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit den gefundenen Differenzen im Phasenverhalten der Vesikel-Mizell-Umwandlung der binären und ternären Systeme, die mit der GS-Struktur und den Alkylketteneigenschaften von NaO bzw. NaP assoziiert sind.

Kapitel 4

Zusammenfassung

Die Thematik der GS-Lipid-Wechselwirkungen bildet seit mehr als vier Jahrzehnten einen Schwerpunkt der biowissenschaftlichen Forschung. Dies ist nicht nur auf deren hohe physiologische Relevanz, sondern auch auf die zunehmende Bedeutung für die Entwicklung innovativer Arzneistoffträgersysteme zurückzuführen. Trotz einer großen Anzahl von Studien an GS-Lipid-Mischungen werden viele Probleme nach wie vor kontrovers diskutiert. Die Klärung von Aggregationsprozessen und -strukturen in GS-Lipid-Gemischen ist sowohl aus biophysikalisch-biochemischer Sicht als auch unter pharmazeutisch-technologischen Aspekten von besonderem Interesse. Die vorliegende Arbeit, deren Gegenstand die physikochemische Untersuchung von binären GS-PL- und ternären GS/FS-PL-Systemen ist, leistet durch die Kombination von kalorimetrischen Methoden und optischen Streuverfahren einen Beitrag dazu. Obwohl sich bereits einige Arbeiten mit GS-PL-Interaktionen beschäftigen, handelt es sich bei dieser Arbeit um die erste ITC-basierte Studie für eine vollständige thermodynamische Charakterisierung von GS-Lipid-Gemischen.

Binäre Systeme

Verteilungsstudien

Die grundlegenden Untersuchungen zur Membranverteilung der anionischen GS-Moleküle erfolgten unter Berücksichtigung der elektrostatischen Effekte mit dem chemisch exakt definierten, synthetischen DPPC. Aus den Ergebnissen geht eindeutig die Abhängigkeit des Verteilungsprozesses von der GS-Struktur, d.h. der Anzahl der Hydroxylgruppen, und der damit verbundenen GS-Lipophilie sowie von der Ionenstärke des Mediums hervor. Zur Charakterisierung des Einflusses der Membranladung dienten das negativ geladene DPPG und DPPC/DPPG-Mischungen in den molaren Verhältnissen 3:1 bzw. 1:1. Die Experimente ergaben, dass nicht der Anteil an geladenem PL sondern die Packung der Vesikel und die daraus resultierende spontane Krümmung eine entscheidende Rolle bei

der GS-Inkorporation spielen. Für die Kreation pharmazeutischer Vehikelsysteme werden bevorzugt PL aus natürlichen Ressourcen genutzt, so z.B. PC aus der Soja-Bohne. Das hierfür verwendete SPC zeigte eine gute Vergleichbarkeit mit den DPPC-Resultaten und gestattete zusätzlich die Untersuchung des Temperatureinflusses bei der Verteilung.

Solubilisierungsstudien

Die Solubilisierungsstudien wurden zur Aufklärung der Vesikel-Mizell-Phasenumwandlung in binären GS-DPPC-Systemen durchgeführt. Aus den erstellten Phasendiagrammen können deutlich die durch die GS-Struktur und die Ionenstärke bedingten Unterschiede in den Sättigungs- und Solubilisierungsphasengrenzen der verschiedenen Systeme ermittelt werden. Die Effekte der „Überschussenergie“ der Endkappen von den stäbchenförmigen GS-DPPC-MM, deren Existenz die SANS-Messungen nachwiesen, sind aus den Phasendiagrammen ersichtlich. Die Parameter der Vesikel-Mizell-Umwandlung zeigen die hohe Solubilisierungskraft der GS im Vergleich zu klassischen Detergentien. Diese Eigenschaft, die der Organismus zur Verdauung von Nahrungsfetten nutzt, bietet auch wesentliche Vorteile zur Rekonstitution von Membranproteinen. Die Phasengrenzen konnten durch DLS-Experimente bestätigt und weiterhin Aussagen über die Größe der Mischaggregate gewonnen werden. Der Nachweis der vollständigen Umwandlung der lamellaren Strukturen in isotrope MM-Lösungen gelang mit der DSC.

Einfluss der Membranladung

Zur Charakterisierung des Einflusses der Membranladung auf die Vesikel-Mizell-Umwandlung kamen ebenfalls DPPG und die oben genannten DPPC/DPPG-Mischungen zum Einsatz. Die Solubilisierungsstudien ergaben analog den Verteilungsexperimenten keinen klaren Ladungseffekt, sondern die Abhängigkeit der Lage der Phasengrenzen von der Membranpackung bzw. deren spontaner Krümmung. Im Vergleich zu DPPC werden die stärker gekrümmten, kleineren DPPG-Vesikel bei niedrigeren GS-Konzentrationen in MM transformiert. Bei den DPPC/DPPG-Mischvesikeln mit einer asymmetrischen Membranverteilung sind, verglichen mit den beiden reinen Lipiden, wegen einer differenzierten Solubilisierung von DPPG und DPPC höhere GS-Konzentrationen notwendig. Die Phasenumwandlung mit dem natürlichen SPC, das aufgrund eines hohen Anteils von > 80% an ungesättigten Alkylketten eine gesteigerte Membranfluidität aufweist, erfordert größere GS-Mengen. Die SPC-haltigen MV sind gegenüber dem GS-Angriff wesentlich stabiler als DPPC-Membranen. Auch bei den SPC-Solubilisierungsstudien wurde die Abhängigkeit von der Temperatur untersucht.

Ternäre Systeme

Demizellierungsstudien

Die Voraussetzung für die Charakterisierung von ternären GS/FS-PL-Systemen bildeten die Kenntnisse der Mizellbildung der einzelnen Detergentien sowie deren Mischungen. Die Eigenschaften der GS-Aggregation waren aus vorherigen, eigenen Untersuchungen [84,86] bekannt. Die Demizellierungsexperimente von NaO mit der ITC lieferten Erkenntnisse über einen zweistufigen Aggregationsprozess. Derartige kalorimetrische Studien sind in der Literatur bisher nicht vorhanden. Die Mizellbildung von NaP allein konnte wegen der geringen Löslichkeit und der hohen *cmt* der Substanz nicht verfolgt werden.

Im Anschluss daran wurde die Mizellisierung in den GS/NaO- und GS/NaP-Mischungen ermittelt. Aus den ITC-Messungen sind wie bei den GS und NaO die thermodynamischen Parameter der Mizellbildung errechnet worden. Die DLS lieferte Informationen über die Größe von GS- und NaO- sowie von GS/NaO- und GS/NaP-Mizellen. Am Beispiel der GS/NaO-Systeme in H₂O zeigte sich für die Mischmizellbildung von GS- und Seifen-Detergentien ein synergistisches Verhalten, das bei NaC stärker als bei NaDC ausgeprägt ist. Letzteres weist eine fast ideale Mischung mit NaO auf. Die erhaltenen Änderungen der Wärmekapazitäten sind ein deutliches Merkmal für den hydrophoben Effekt. Der Transfer von hydrophoben Strukturen aus der wässrigen Phase in die Mizellen ist mit zunehmender Lipophilie für GS < GS/NaO < NaO sowie für GS/NaO < GS/NaP stärker begünstigt.

Verteilungsstudien

Die Charakterisierung der ternären Systeme beschränkte sich auf Systeme mit dem ausführlich untersuchten DPPC. Die Verteilungsexperimente ergaben die gleichen Tendenzen hinsichtlich des Einflusses der GS-Lipophilie und der Ionenstärke des Mediums wie bei den binären Mischungen. Die Verteilungskoeffizienten sind bei den durch die FS-Komponente stärker lipophilen, ternären Gemischen allerdings größer. Es ergaben sich nur geringe Differenzen zwischen den Systemen mit gesättigtem NaP und ungesättigtem NaO.

Solubilisierungsstudien

In Analogie zu den binären GS-PL-Gemischen traten die Charakteristika der Vesikel-Mizell-Umwandlung auch bei den Solubilisierungsexperimenten mit den ternären GS/FS-PL-Mischungen auf. Die Phasengrenzen liegen bei geringeren GS-Konzentrationen, wenn GS/FS-MM zur Membransolubilisierung eingesetzt werden. Dies ist durch die synergistische Wirkung der beiden Detergentien und die damit verbundene höhere Solubilisierungskraft der GS/FS-MM bedingt. Aus den Parametern der Phasenumwandlung wird eine höhere Stabilität der Vesikel gegenüber dem Detergensangriff bei den ternären im Vergleich zu den binären Systemen abgeleitet, die auf eine optimierte Membranpackung durch

den Einbau der FS-Moleküle zurückzuführen ist. Die Phasengrenzen wurden durch die DLS-Messungen bestätigt und die Transformation der Vesikel in MM anhand von DSC-Experimenten nachgewiesen.

Die in dieser Arbeit ermittelten physikochemischen Kenngrößen ergeben grundsätzliche Erkenntnisse für die Entwicklung innovativer Arzneistoffträgersysteme liposomaler und mischmizellarer Art [393]. Die hier untersuchten binären und ternären Systeme sind für den Einsatz als Vehikel besonders geeignet, weil sie ausschließlich physiologische Komponenten enthalten. Da es sich um Substanzen handelt, die bevorzugt im GIT auftreten, ist neben der praktizierten parenteralen Applikation die Verwendung für orale Formulierungen naheliegend. Die erhaltenen Ergebnisse tragen weiterhin zum Verständnis der GS-Lipid-Interaktionen bei der Verdauung von Nahrungsfetten im Organismus bei. In diesem Zusammenhang spielen neben den pharmazeutisch-technologischen Gesichtspunkten bei der Kreation von innovativen kolloidalen Arzneistoffträgersystemen auch die biopharmazeutischen Aspekte bei der Verwendung dieser Mischaggregate als Arzneistofftransporter im Körper eine wesentliche Rolle. Erste Anhaltspunkte zur Wechselwirkung mit biologischen Strukturen liefern eigene Untersuchungen zur Charakterisierung von Adhäsionsprozessen mischmizellarer Systeme an biomimetischen Membranen [394–397].

Anhang A

Methoden und Materialien

A.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

A.1.1 Methode

Für die ITC stehen kommerziell zwei unterschiedliche Gerätetypen zur Verfügung [398]: das in dieser Arbeit verwendete Kalorimeter der Firma MicroCal [399] und das Wärmeflusskalorimeter der Firma Thermometric [400], dessen Prinzip [268] an dieser Stelle nicht näher erläutert werden soll.

Die Abb. A.1 zeigt den Aufbau des MicroCal-Gerätes. Das Kernstück bilden die beiden identischen Zellen, die Mess- und die Referenzzelle, mit einem Volumen von je ca. 1,3 ml. Beide werden vollständig gefüllt und besitzen eine sogenannte „Lollipop“-Form: rund mit einer langen, engen Kapillare zum Befüllen [262]. Sie sind von einem adiabatischen Mantel aus Aluminium umgeben, der den Druck- und Temperatureaustausch der Zellen mit ihrer Umgebung verhindert.

Die Referenzzelle enthält das Lösungsmittel der Probe. Die Messzelle wird mit einer Lösung des einen Reaktionspartners befüllt. Der zweite Reaktionspartner befindet sich in der Hamilton-Spritze. Diese besitzt ein Volumen von 250 μl und ist mit einer langen Edelstahl-Nadel versehen. Das abgeflachte Nadelende dient als Rührer und ermöglicht die gleichzeitige Applikation und Durchmischung des Messzellinhaltes. Aus der Injektionspritze wird in festgelegten Zeitintervallen ein definiertes Volumen von einigen μl computer-gesteuert in die Messzelle injiziert. Durch einen Motor angetrieben, rotiert die Spritze während des Experiments mit einer konstanten Geschwindigkeit von 400 U/min [265].

Das Kalorimeter arbeitet sowohl isobar als auch „isotherm“. Die Temperatur ist nicht absolut konstant, sondern steigt während einer Messung um ca. 0,002-0,04 $\text{K}\cdot\text{h}^{-1}$, da die Referenzzelle mit einer geringen Heizleistung von wenigen μW beheizt wird. Dieses

Heizsystem wird als „Reference Offset“ (RO) bezeichnet. Ein zweites Heizsystem, der „Cell Feedback“ (CFB), dient der Ermittlung der Temperaturdifferenz ΔT_1 zwischen der Mess- und der Referenzzelle, und ein drittes, der „Jacket Feedback“ (JFB), misst die Temperaturdifferenz ΔT_2 zwischen den Zellen und dem Mantel [267]. Die Temperatur der Messzelle und des Mantels werden jeweils auf die der Referenzzelle abgestimmt. Der Vergleich der Temperaturen der beiden Zellen erfolgt 30 Mal pro Sekunde [262] und ergibt für beide ΔT -Werte Null.

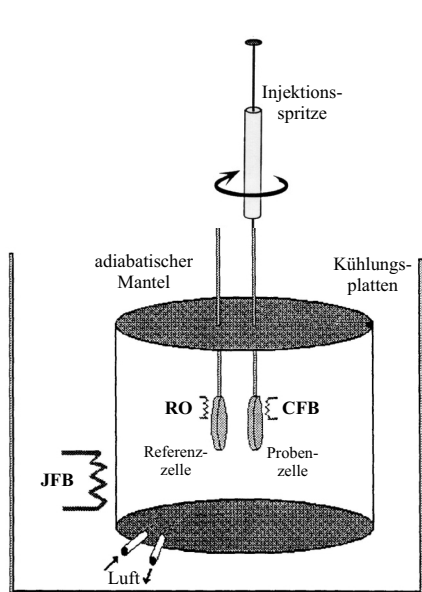


Abb. A.1: Schematische Darstellung eines ITC-Gerätes [401]

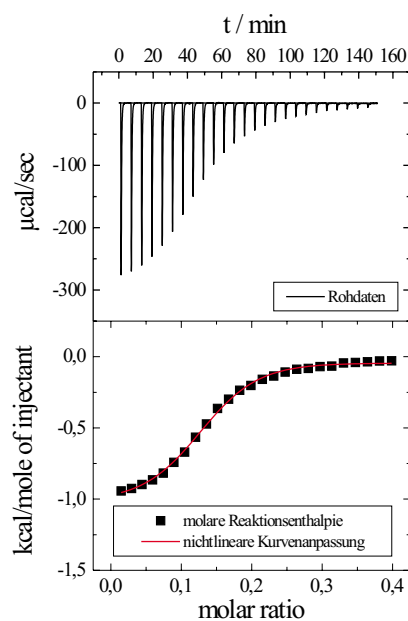


Abb. A.2: Auswertung mittels ORIGIN™ ITC-Software

Wird aufgrund einer Reaktion in der Messzelle Wärme freigesetzt bzw. absorbiert, kommt es zu einer messbaren Temperaturänderung. Mit einer speziellen thermoelektrischen Methode, dem Einsatz von Bismut-Tellurid-Kristallen als thermophile Halbleiter, wird ein elektrisches Signal erzeugt, das der Temperaturdifferenz ΔT_1 proportional ist [270] und einen Rückkopplungsmechanismus aktiviert. Im Fall einer exothermen Reaktion wird der CFB verringert und im Fall einer endothermen Reaktion verstärkt, bis ΔT auf Null zurückreguliert ist [294, 402]. Dieses elektrische Signal, als Funktion der Zeit aufgezeichnet, erzeugt die typische Peakform (Abb. A.2, oberes Diagramm). Das Kalorimeter erlaubt Messungen zwischen 0 und 85°C [267] und erfasst Temperaturänderungen bis 10^{-6} K. Die Wärmemengen werden im $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ -Bereich detektiert.

A.1.2 Probenpräparation

Mit der ITC wurden binäre Systeme von NaC bzw. NaDC mit den Phospholipiden DPPC, DPPG und SPC sowie mit den Phospholipidgemischen DPPC/DPPG (3:1) und DPPC/DPPG (1:1) untersucht. Weiterhin wurden ternäre Systeme aus GS/NaO- bzw. GS/NaP-Gemischen und DPPC charakterisiert.

Die Herstellung der Proben erfolgte durch das Lösen bzw. Dispergieren der Substanzen in H₂O oder 0,1 M NaCl. Das dafür nötige Reinstwasser lieferte das SG Reinstwasser-System Clear (SG Wasseraufbereitung u. Regenerierstation GmbH, Barsbüttel). Die Detergenslösungen NaC, NaDC bzw. NaO und die Detergensgemische NaC/NaO und NaDC/NaO (molares Verhältnis 5:2) wurden 10 min mit dem Vortexer (VF 2, IKA-Laborgeräte Janke & Kunkel, IKA-Werke GmbH, Staufen) geschüttelt und erstmals 20 min und anschließend vor jeder Messung 10 min unter Rühren entgast (Thermolyne[®] Nuova[™] Magnetic Stirrer, Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, USA). Die Detergensgemische NaC/NaP und NaDC/NaP (molares Verhältnis 5:2) mussten aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von NaP im Ultraschallbad (Elma Transsonic 310/H, Elma - Hans Schmidbauer GmbH, Singen) bei 60°C 10 min beschallt werden, um optisch klare Lösungen zu erhalten. Danach geschah die Weiterbehandlung wie oben bereits angeführt.

Die Lipiddispersionen wurden ebenfalls erst 10 min mit dem Vortexer geschüttelt und danach bei einer Temperatur oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur (DPPC, DPPG: ca. 60°C, SPC: ca. 40°C) im Ultraschallbad in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration beschallt: 1 mM - 5 min, 3 mM - 10 min, 6 mM - 20 min, 10 mM - 40 min und 20 mM - 60 min. Die Ultraschallmethode gewährleistete die Herstellung von SUV. Auch die Lipiddispersionen mussten vor jeder Messung 10 min entgast werden. Es schloss sich die Überprüfung der Ausgangsgröße der Vesikel durch Dynamische Lichtstreuung mit einem Malvern Zetasizer 3 (Malvern Instruments, Herrenberg) an. Die Vesikeldurchmesser lagen im Bereich zwischen 70 und 120 nm.

Für die Herstellung der Phospholipidgemische DPPC/DPPG in den molaren Verhältnissen 3:1 und 1:1 fand die Herstellung von hochkonzentrierten Stammlösungen der einzelnen Lipide in Chloroform/Methanol (2:1) statt. Durch das Mischen entsprechender Volumina der beiden Stammlösungen wurden die gemischten Lipidlösungen erhalten. Die folgende Inkubation im Wasserbad bei 80°C unter Stickstoffbegasung (Pierce Reacti-Therm[™] Heating/Stirring Module, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) und anschließend über 12 h im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) bei 60°C ermöglichte die vollständige Entfernung der Lösungsmittel. Die Weiterverarbeitung der so erhaltenen Lipidgemische erfolgte wie oben beschrieben. Die Einstellung des *pH*-Wertes (Microprozessor pH/Ion Meter pMX 3000, WTW GmbH, Weilheim) der Proben auf 7,5 geschah mit 0,1 N HCl oder 0,1 N NaOH.

Die Identität und Reinheit aller in dieser Arbeit verwendeten Chargen der Gallensalze, der Phospholipide und der Salze der Fettsäuren wurden vor der Verwendung massenspektrometrisch überprüft (Finnigan MAT-LCQ, ThermoQuest, San José, CA, USA) und die Proben ausschließlich in frisch hergestellter Form vermessen.

A.1.2.1 Verteilungsexperimente

Für die Verteilungsexperimente kamen Lipiddispersionen aller untersuchten Phospholipide und Phospholipidmischungen mit einer Konzentration von 20 mM zum Einsatz. Die Konzentrationen der Detergenslösungen und der -gemische waren folgende:

GS-PL-Systeme: PL = DPPC, DPPG, DPPC/DPPG (3:1), DPPC/DPPG (1:1), SPC

GS	Medium	D_t /mM
NaC	H ₂ O	10
NaC	NaCl	4
NaDC	H ₂ O	4
NaDC	NaCl	1

GS/NaO-DPPC-Systeme:

GS/NaO	Medium	D_t /mM
NaC/NaO	H ₂ O	2/0,8
NaC/NaO	NaCl	1/0,4
NaDC/NaO	H ₂ O	2/0,8
NaDC/NaO	NaCl	0,5/0,2

GS/NaP-DPPC-Systeme:

GS/NaP	Medium	D_t /mM
NaC/NaP	H ₂ O	2/0,8
NaC/NaP	NaCl	1/0,4
NaDC/NaP	H ₂ O	2/0,8
NaDC/NaP	NaCl	0,5/0,2

A.1.2.2 Solubilisierungsexperimente

Die Konzentrationen der Lipiddispersionen für die Solubilisierungsexperimente lagen zwischen 0,5 und 10 mM. Die Konzentrationen der Detergenslösungen hatten die in den nachstehenden Tabellen angeführten Werte:

GS-PL-Systeme: PL = DPPC, DPPG, DPPC/DPPG (3:1), DPPC/DPPG (1:1), SPC*

GS	Medium	D_t /mM	D_t^* /mM
NaC	H ₂ O	150	500
NaC	NaCl	100	400
NaDC	H ₂ O	100	200
NaDC	NaCl	50	100

GS/NaO-DPPC-Systeme:

GS/NaO	Medium	D_t /mM
NaC/NaO	H ₂ O	150/60
NaC/NaO	NaCl	100/40
NaDC/NaO	H ₂ O	75/30
NaDC/NaO	NaCl	50/20

GS/NaP-DPPC-Systeme:

GS/NaP	Medium	D_t /mM
NaC/NaP	H ₂ O	150/60
NaC/NaP	NaCl	100/40
NaDC/NaP	H ₂ O	75/30
NaDC/NaP	NaCl	50/20

A.1.2.3 Demizellierungsexperimente

Für die Demizellierungsexperimente dienten NaO-Lösungen mit einer Konzentration von 40 mM in H₂O. Die Detergensgemische waren wie folgt zusammengesetzt:

GS/NaO-Gemische:

GS/NaO	Medium	D_t /mM
NaC/NaO	H ₂ O	150/60
NaC/NaO	NaCl	100/40
NaDC/NaO	H ₂ O	75/30
NaDC/NaO	NaCl	50/20

GS/NaP-Gemische:

GS/NaP	Medium	D_t /mM
NaC/NaP	H ₂ O	150/60
NaC/NaP	NaCl	100/40
NaDC/NaP	H ₂ O	75/30
NaDC/NaP	NaCl	50/20

A.1.3 Versuchsdurchführung

Die ITC-Experimente erfolgten mit einem MicroCal OMEGA- bzw. mit einem MicroCal MCS-Titrationskalorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA).

Die Referenzzelle enthielt ultrareines Wasser, die Messzelle (Zellvolumina: OMEGA-ITC: 1,3684 ml bzw. MCS-ITC: 1,3351 ml) die wässrige Probe mit einem Reaktionspartner. Die Hamilton-Spritze (Spritzenvolumen: 250 μ l) wurde mit der wässrigen Lösung oder der Dispersion des zweiten Reaktionspartners befüllt. Die Injektionsspritze rotierte während des Versuches mit 400 U/min. Drei bis fünf Messungen sicherten die Reproduzierbarkeit jedes Experimentes. Für die Datenauswertung stand die MicroCal ORIGIN™ ITC-Software, Version 5.0, zur Verfügung, für die nichtlineare Kurvenanpassung der Verteilungsexperimente die SCIENTIST™ Software, Version 2.1, (MicroMath Scientific Software Inc., Salt Lake City, UT, USA).

A.1.3.1 Verteilungsexperimente

Bei den Verteilungsexperimenten befand sich eine hochkonzentrierte Lipiddispersion (20 mM) in der Injektionsspritze. Die Messzelle enthielt eine Detergenzlösung oder ein Detergengemisch mit einer Konzentration weit unterhalb der *cmc*. Alle Verteilungsexperimente mit DPPC, DPPG und den DPPC/DPPG-Gemischen (3:1 und 1:1) erfolgten bei 60°C, während die Messungen mit SPC bei 30°C und 60°C vorgenommen wurden. Der Verteilungsversuch umfasste ein Injektionsprogramm von 25x10 μ l oder 50x5 μ l mit Zeitintervallen von 4-5 min zwischen den einzelnen Injektionen. Durch die analoge Injektion der Lipiddispersion (20 mM) in H₂O oder 0,1 M NaCl konnten die Verdünnungswärmen bestimmt und von den Reaktionswärmen subtrahiert werden.

A.1.3.2 Solubilisierungsexperimente

Für die Solubilisierungsexperimente war die Messzelle mit der entsprechend konzentrierten Lipiddispersion und die Injektionsspritze mit einer hochkonzentrierten Detergenzlösung

oder einem Detergensgemisch befüllt. Die Messungen mit DPPC, DPPG und den Gemischen von DPPC/DPPG (3:1) und DPPC/DPPG (1:1) erforderten wiederum 60°C, während die SPC-Messungen bei 30°C und 60°C möglich waren. Der Solubilisierungsversuch umfasste ein Injektionsprogramm von 40x6,25 μl oder 50x5 μl mit Zeitintervallen von 4-5 min zwischen den einzelnen Injektionen. Die Verdünnungswärmen ergaben sich aus der analogen Injektion einer niedrig konzentrierten Detergensiösung in H₂O oder 0,1 M NaCl (siehe Konzentrationen der Verteilungsexperimente) und anschließender Subtraktion von den Reaktionswärmen.

A.1.3.3 Demizellisierungsexperimente

Bei den Demizellisierungsexperimenten befand sich eine hochkonzentrierte Detergensiösung von NaO bzw. ein Detergensgemisch in der Injektionsspritze. Die Messzelle enthielt nur H₂O oder 0,1 M NaCl. Es wurden geringe Volumina von 3-5 μl in aliquoten Teilen in die Messzelle injiziert. Die Versuchstemperaturen lagen im Bereich zwischen 10°C und 70°C. Die Verdünnungswärmen ergaben sich wie bei den Solubilisierungsexperimenten.

A.2 Differentialscanningkalorimetrie

A.2.1 Methode

Für die DSC werden ebenfalls unterschiedliche Kalorimetertypen angeboten. Bei den hier durchgeführten Experimenten kam das VP-DSC-Gerät der Firma MicroCal zum Einsatz (Abb. A.3), dessen Messprinzip im Folgenden kurz vorgestellt wird:

Das Kalorimeter besitzt zwei identische, dem ITC-Gerät analoge Tantal-Zellen, die Proben- und die Referenzzelle, die beide ein Volumen von 0,5 ml fassen und von einem adiabatischen Aluminium-Mantel umschlossen sind [278]. Durch ein Vakuum kann der Wärmeverlust der Zellen minimiert werden. Beide Zellen sind mit je einem Heizungssystem versehen. Auch bei diesem Kalorimeter werden die Temperaturdifferenzen ΔT_1 zwischen der Proben- und der Referenzzelle sowie ΔT_2 zwischen den Zellen und dem Mantel erfasst. Dazu dienen ebenfalls Bismut-Tellurid-Kristalle als thermophile Halbleiterelemente. Die Thermostatierung erfolgt mit einem zirkulierenden Wasserbad bzw. bei dem verwendeten Gerät mit einem Peltier-Element [276].

Beide Zellen werden kontinuierlich mit einer konstanten Rate beheizt oder abgekühlt. Es wird die elektrische Leistung ermittelt, die notwendig ist, um ΔT_1 zwischen der Proben- und der Referenzzelle auf Null zu halten.

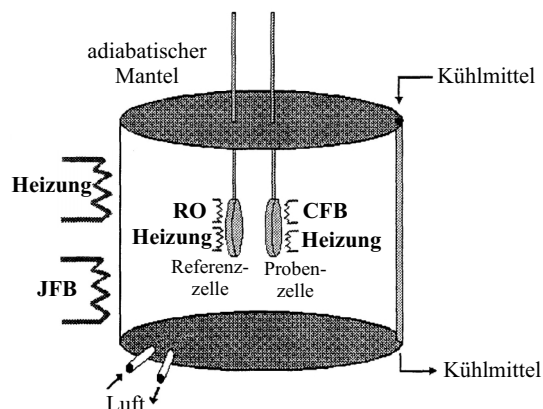


Abb. A.3: Schematische Darstellung eines DSC-Gerätes [401]

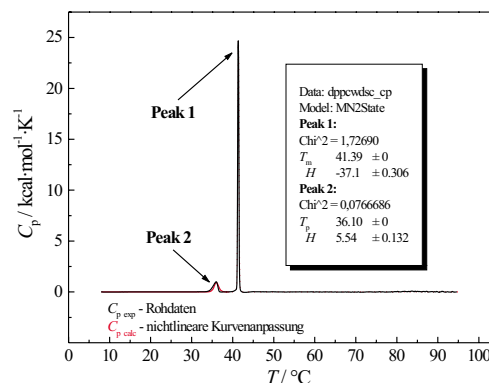


Abb. A.4: Auswertung mittels ORIGIN™ DSC-Software

Das Gerät zeichnet die Änderung der molaren Wärmekapazität bei konstantem Druck ΔC_p , die sich aus der ermittelten Leistung unter Berücksichtigung der Zeit, der Heizrate und der Konzentration der Probe ergibt, als Funktion der Temperatur auf (Abb. A.4) [279, 280].

Durch temperaturinduzierte Zustandsänderungen in der Probe kommt es zu einer Abweichung des ΔT_1 -Wertes von Null, die an der Entstehung eines Peaks im ΔC_p - T -Diagramm erkennbar ist. Durch einen Rückkopplungsmechanismus wird wie bei der ITC eine Zusatzheizung aktiviert, die die Temperaturdifferenz auf Null zurückreguliert [281]. Das VP-DSC-Kalorimeter erlaubt Messungen im Temperaturbereich zwischen 1°C und 110°C [276].

A.2.2 Probenpräparation

Mit der DSC wurden Solubilisierungsprozesse in binären NaC-DPPC- und NaDC-DPPC-Gemischen sowie in ternären Systemen von NaC/NaO-DPPC und NaDC/NaO-DPPC als auch von NaC/NaP-DPPC und NaDC/NaP-DPPC in H₂O bzw. in 0,1 M NaCl untersucht.

Es kamen dafür DPPC-Dispersionen mit einer Konzentration von jeweils 6 mM zum Einsatz, deren Präparation der der ITC-Experimente entsprach. Zu den fertigen Dispersionen wurde die entsprechende Masse an Detergens bzw. Detergensgemisch (molares Verhältnis GS:FS = 5:2) zugesetzt. Die Wahl der Detergenskonzentrationen ergab sich aus den durch die ITC-Solubilisierungsmessungen ermittelten Phasendiagrammen. Die Detergenskonzentrationen der binären und ternären Mischungen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen:

GS-DPPC-Systeme:

GS	Medium	D_t/mM				
		5	10	15	18	21
NaC	H ₂ O	5	10	15	18	21
NaC	NaCl	2	5	8	11	15
NaDC	H ₂ O	3	6	8,5	11	15
NaDC	NaCl	0,5	1,5	3,5	5,5	7,5

GS/NaO-DPPC-Systeme:

GS/NaO	Medium	D_t/mM					
		3/1,2	6/2,4	9/3,6	12/5,5	15/6	20/8
NaC/NaO	H ₂ O	3/1,2	6/2,4	9/3,6	12/5,5	15/6	20/8
NaC/NaO	NaCl	2/0,8	4/1,6	6/2,4	8/3,2	11/4,4	14/5,6
NaDC/NaO	H ₂ O	2/0,8	5/2	7/2,8	9/3,6	12/4,8	15/6
NaDC/NaO	NaCl	1/0,4	2/0,8	3/1,2	4/1,6	5/2	7/2,8

GS/NaP-DPPC-Systeme:

GS/NaP	Medium	D_t/mM				
		4/1,6	7/2,8	11/4,4	15/6	20/8
NaC/NaP	H ₂ O	4/1,6	7/2,8	11/4,4	15/6	20/8
NaC/NaP	NaCl	2/0,8	5/2	7/2,8	10/4	15/6
NaDC/NaP	H ₂ O	2/0,8	5/2	7/2,8	10/4	15/6
NaDC/NaP	NaCl	1/0,4	2/0,8	3,5/1,4	5/2	8/3,2

Die Probe wurde anschließend im Wasserbad auf 60°C erwärmt und 20 min mit dem Vortexer geschüttelt. Vor der DSC-Messung erfolgte eine 10minütige Entgasung der Probe und die Einstellung des *pH*-Wertes auf 7,5 mit 0,1 N HCl oder 0,1 N NaOH. Alle Proben kamen frisch hergestellt zum Einsatz.

A.2.3 Versuchsdurchführung

Die DSC-Experimente wurden mit einem MicroCal VP-DSC-Gerät (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die Messzelle enthielt die Probe, die Referenzzelle das Lösungsmedium H₂O oder 0,1 M NaCl (Zellvolumina: 0,5 ml). Die DSC-Messungen konnten bei einem Druck von ca. 30 lbs./sq.in. (= 206,7 kPa [403]) mit einer Heizrate von 1 K·min⁻¹ in einem Temperaturbereich von 2°C bis 95°C realisiert werden. Da es

sich um Phospholipidproben handelte, empfahl sich die Auswahl eines hohen Feedback-Modus, der sich durch das stärkste Basislinienrauschen, aber auch durch die sehr kurzen, für die scharfen Phospholipidpeaks geeigneten Feedback-Reaktionszeiten von ca. 5 s auszeichnet [404].

Von dem dreimal durchlaufenen Aufheiz-Abkühl-Zyklus diente jeweils die mittlere Aufheizkurve zur Auswertung. Für die Datenanalyse stand die MicroCal ORIGIN™ DSC-Software, Version 5.0, zur Verfügung. Die Basislinie, die von der DSC-Kurve zu subtrahieren war, ergab sich durch das Vermessen des Mediums in der Proben- und Referenzzelle.

A.3 Dynamische Lichtstreuung

A.3.1 Methode

Der prinzipielle Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Lichtstreu-Gerätes ist in der Abb. A.5 zu sehen.

Die Lichtquelle ist ein Laser, der kohärentes, monochromatisches Licht hoher Intensität liefert und somit eine hohe Messgenauigkeit und kurze Analysenzeiten gewährleistet. Aufgrund des speziellen Messprinzips der nichtinvasiven Rückstreuung beträgt der Streuwinkel nicht wie üblich 90° sondern 173° [405].

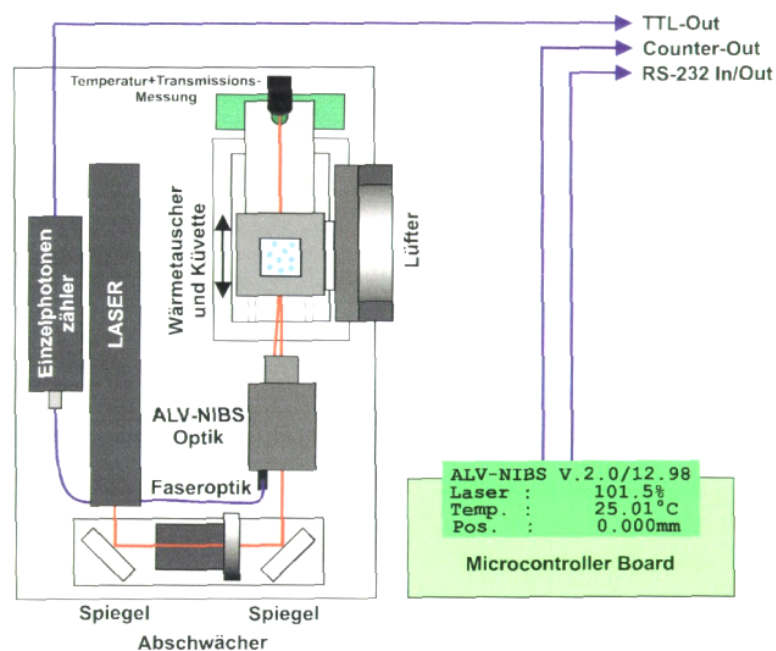


Abb. A.5: Schematische Darstellung des ALV-NIBS-Lichtstreuengerätes [406]

Die mit einem Teflondeckel verschlossene Küvette mit der Probe befindet sich während der Messung in einer Halterung mit verstellbarer Position, die zusätzlich mit einer Temperierungseinheit (Peltier-Element) und einem Temperatursensor ausgerüstet ist. Die Strahlführung erfolgt über zwei Spiegel, eine Abschwächereinheit sowie die Beleuchtungs- und Detektionsoptik. Letztere besitzt bei dem hier verwendeten Gerät eine hohe Detektionsempfindlichkeit und ist deshalb für die Messung sehr kleiner Teilchen und Proben mit sehr geringen Konzentrationen geeignet.

Die Digitalkorrelation wird zur Spektralanalyse verwendet, die die Korrelationsfunktion der Lichtfluktuation ermittelt. Das gestreute Licht trifft mit einer Intensität, die einer Leistung von ca. 10 pW bzw. 30 Millionen Photonen/s entspricht, auf den Einzelphotonenzähler. Davon werden etwa 3% in zählbare, elektrische Impulse umgewandelt, die der Streuintensität proportional sind und in die Intensitätsautokorrelationsfunktion umgerechnet werden.

A.3.2 Probenpräparation

Die DLS diente zur Charakterisierung der mizellaren Lösungen der Gallensalze NaC und NaDC sowie von NaO als auch der mischmizellaren Lösungen von NaC/NaO bzw. NaDC/NaO und von NaC/NaP bzw. NaDC/NaP. Die Untersuchungen richteten sich dabei auf den Einfluss der Temperatur und der Ionenstärke der Lösung. Des Weiteren wurden Solubilisierungsexperimente mit binären Gemischen der Gallensalze NaC und NaDC sowie den Phospholipiden DPPC, DPPG und SPC als auch den Phospholipidgemischen DPPC/DPPG (3:1) und DPPC/DPPG (1:1) durchgeführt. Die Solubilisierungsuntersuchungen erfolgten auch an ternären Systemen von GS/NaO- und GS/NaP-Gemischen mit dem Phospholipid DPPC.

Für die Charakterisierung der mizellaren Lösungen hatten die Proben nachstehende Konzentrationen:

Detergenzlösungen:

Detergens	Medium	D_t/mM
NaC	H ₂ O	150
NaC	NaCl	100
NaDC	H ₂ O	100
NaDC	NaCl	50
NaO	H ₂ O	40
NaO	NaCl	20

Die mischmizellaren Lösungen besaßen folgende Konzentrationen:

GS/NaO-Gemische:

GS/NaO	Medium	D_t/mM
NaC/NaO	H ₂ O	150/60
NaC/NaO	NaCl	100/40
NaDC/NaO	H ₂ O	75/30
NaDC/NaO	NaCl	50/20

GS/NaP-Gemische:

GS/NaP	Medium	D_t/mM
NaC/NaP	H ₂ O	150/60
NaC/NaP	NaCl	100/40
NaDC/NaP	H ₂ O	75/30
NaDC/NaP	NaCl	50/20

Bei der Herstellung der Lipiddispersionen sowie der Detergenslösungen und der Detergensgemische konnte analog den ITC-Proben verfahren werden. Die Lipiddispersionen kamen in den Konzentrationen 1 mM, 3 mM und 6 mM zum Einsatz. Die Detergenskonzentrationen entsprachen denen der ITC-Untersuchungen.

Für die DLS-Studien war zusätzlich die Entfernung von Staubpartikeln aus der Probe erforderlich. Dies gelang durch das direkte Filtrieren der Lipiddispersionen mit Nylon-Spritzenfiltern der Porengröße 0,45 μm in die zuvor gründlich gereinigte Küvette. Für die Detergenslösungen wurden Nylon-Spritzenfilter der Porengröße 0,2 μm benutzt und die Lösungen direkt in die Applikationspipette (Multipipette[®]: 1 ml-Pipettieraufsatz; kleinste Zugabemenge: 20 μl) filtriert.

A.3.3 Versuchsdurchführung

Für die DLS-Experimente kam das ALV-NIBS-Lichtstreugerät (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen) zum Einsatz. Das Messgerät arbeitet mit einem HeNe-Laser der Wellenlänge 632,8 nm und einer Leistung von 3 mW sowie dem speziellen Detektionsprinzip der nichtinvasiven Rückstreuung mit einem Streuwinkel von 173° [405]. Für die Messungen dienten Quarzglasküvetten (HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim).

Die Messdauer des Einzelerperimentes betrug 30 s. Eine Dreifachbestimmung führte zu den erhaltenen Ergebnissen.

Die ALV-5000/E Software ermöglichte die Datenauswertung [405] in Form der Verteilungsfunktions-Analyse nach der CONTIN-Methode [407] unter Einbeziehung der Temperaturkorrektur der Viskosität. Dieses Analysenverfahren ist für multimodale Verteilungen besonders geeignet, da die Teilchen in Klassen unterschiedlicher Radien eingeteilt werden. Es wurde die „ungewichtete“ Verteilung ermittelt, die die Streuintensität der jeweiligen Partikelgrößenart widerspiegelt.

Die Größenbestimmung der mizellaren u. mischmizellaren Lösungen erfolgte bei verschiedenen Temperaturen: 15, 25, 35, 45 und 55°C. Für die Solubilisierungsexperimente wurde bei den synthetischen Lipiden (DPPC, DPPG, DPPC/DPPG (3:1) und DPPC/DPPG (1:1)) eine Temperatur von 55°C gewählt. Die Temperaturen für die SPC-Proben betragen 25°C und 55°C. Die Detergenzugabe konnte durch das Hinzutitrieren der Detergenlösung zu der Vesikeldispersion in der Küvette in 20 μl -Schritten mit einer Multipette[®] erreicht werden. Nach jeder Zugabe war eine dreifache Größenbestimmung erforderlich.

A.4 Kleinwinkel-Neutronenstreuung

A.4.1 Methode

Das SANS-Messprinzip ist in der Abb. A.6 dargestellt. Der Kernreaktor enthält den mit 30-40 Brennelementen ausgestatteten Reaktorkern in einem Wasserbecken. Durch die Kernspaltung von Uran (^{235}U) werden zwei bis drei hochenergetische, schnellfliegende, „heiße“ Neutronen erzeugt.

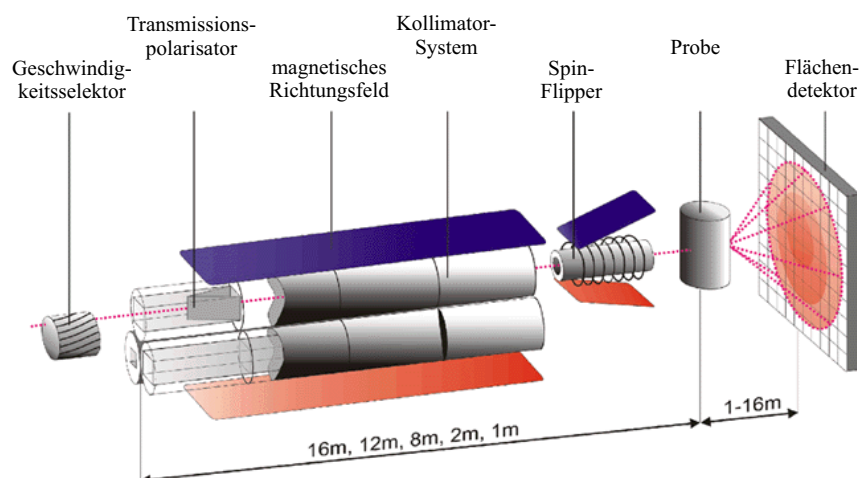


Abb. A.6: Schematische Darstellung des V4-Kleinwinkelstreugerätes am Berliner Neutronenstreuungszentrum des Hahn-Meitner-Institutes [408]

Da nur ein Neutron für eine geregelte Kettenreaktion erforderlich ist, werden die restlichen Neutronen über Neutronenfänger, den Steuerstäben, entfernt. Durch den Zusammenstoß der Kerne mit Brems-Moderatoren erfolgt die Abgabe von kinetischer Energie und die Erzeugung von langsamen, „kalten“ Neutronen [328]. Ein Geschwindigkeitsselektor wählt aus dem Neutronenfluss einen sehr schmalen Bereich mit einer Wellenlänge von 6 \AA aus, der dem Primärstrahl entspricht. Der Typ des durchzuführenden Experimentes entscheidet über die Erfordernis des Einsatzes eines Transmissionspolarisators.

Der Primärstrahl wird anschließend über das 1-16 m lange Kollimator-System geleitet, das ein gleichbleibendes Auflösungsvermögen gewährleistet. Der Neutronenstrahl wird nun durch die Probe geführt und die gestreute Strahlung mit einem Flächendetektor registriert. Dieses quadratische Element mit einer Seitenlänge von 64 cm und 1 cm^2 -Streuelementen erfasst die Streuintensität der Probe, die zur Auswertung der Experimente herangezogen wird. Der Flächendetektor ist von einer äußeren Strahlenabschirmung umgeben, welche die entweichende Strahlung absorbiert [408].

A.4.2 Probenpräparation

Mit der SANS-Methode wurden binäre Mischungen von NaDC-DPPC in 0,1 M NaCl untersucht und die Proben zu diesem Zweck mit jeweils 6 mM DPPC sowie unterschiedlichen Anteilen NaDC vorbereitet.

Für diese Methode war die Probenpräparation zur Verbesserung des Streukontrastes in deuteriertem Wasser (D_2O : Deuteriumanteil von 99,8%) erforderlich. Die anhand des durch ITC ermittelten Phasendiagramms ausgewählten NaDC-Konzentrationen betragen 1,5, 3,5, 5,5, 7,5 und 10 mM. Zu den DPPC-Dispersionen kamen die entsprechenden Massen an NaDC hinzu. Daran schloss sich die Inkubation dieser Gemische über fünf Stunden bei ca. 60°C im Wasserbad mit einem Magnetprüher an. Die binären Mischungen wurden anschließend ebenfalls mit Nylon-Spritzenfiltern der Porengröße $0,2 \mu\text{m}$ direkt in die Quarzglasküvetten (HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim) filtriert, da auch bei den SANS-Experimenten die Staubfreiheit der Proben gewährleistet sein musste.

A.4.3 Versuchsdurchführung

Die SANS-Experimente an den binären NaDC-DPPC-Systemen konnten am Berliner Neutronenstreuzentrum (BENSZ) des Hahn-Meitner-Institutes (HMI) durchgeführt werden. Die Messungen erfolgten mit dem V4-Kleinwinkelstreugerät. Um die Ergebnisse mit denen der ITC-Experimente vergleichen zu können, wurden die Proben ebenfalls bei 60°C vermessen.

A.5 Chemikalienverzeichnis

Substanz	$M_r/\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	Hersteller
Chloroform (CHCl_3)	119,4	Roth
Deuteriumoxid (D_2O)	20,0	Sigma
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC)	734,0	Genzyme
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG)	745,0	Lipoid
Methanol (MeOH)	32,0	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	58,4	Roth
Natrium-Cholat (NaC)	430,6	Sigma
Natrium-Desoxycholat (NaDC)	432,6	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	40,0	Merck
Natrium-Oleat (NaO)	304,4	Sigma
Natrium-Palmitat (NaP)	278,4	Sigma
Salzsäure (HCl)	36,5	Merck
Soja-Phosphatidylcholin* (SPC)	775,0	Nattermann

* Zusammensetzung des Soja-Lecithins (SPC) „Phospholipon 90G“ (Charge 90010) nach Angaben des Herstellers:

Bestandteile	Anteil/%(w/w)
Phosphatidylcholin	93±3
Lyso-Phosphatidylcholin	3±3
d,l- α -Tocopherol	0,1
FS-Komponenten	Anteil/%(w/w)
Palmitinsäure	12±2
Stearinsäure	3±1
Ölsäure	10±3
Linolsäure	66±5
Linolensäure	5±2

Anhang B

Thermodynamische Parameter

B.1 Na-Oleat

Tab. B.1: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaO in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/$ $^{\circ}C$	cmc1/ mM	cmc2/ mM	$\Delta H_{demic}/$ $kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta G_{1demic}/$ $kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta G_{2demic}/$ $kJ \cdot mol^{-1}$	$T\Delta S_{1demic}/$ $kJ \cdot mol^{-1}$	$T\Delta S_{2demic}/$ $kJ \cdot mol^{-1}$
10	1,2	2,1	-16,8	25,4	23,9	-42,1	-40,7
15	1,1	2,3	-8,3	25,8	24,2	-34,1	-32,4
20	1,0	2,3	-1,5	26,6	24,6	-28,1	-26,1
25	0,9	2,4	3,3	27,3	24,9	-24,0	-21,6
30	1,0	2,5	5,0	27,5	25,2	-22,5	-20,2
35	1,1	2,5	6,3	27,6	25,6	-21,3	-19,3
40	1,2	2,5	8,9	28,1	26,0	-19,1	-17,1
45	1,2	2,6	11,4	28,5	26,3	-17,1	-14,9
50	1,2	2,7	12,4	29,0	26,7	-16,6	-14,3
55	1,2	2,8	14,1	29,3	27,0	-15,2	-12,9
60	1,3	2,8	16,8	29,5	27,4	-12,6	-10,6
65	1,4	2,9	17,3	29,7	27,6	-12,4	-10,3
70	1,6	3,0	18,3	29,8	28,0	-11,5	-9,7

B.2 Gallensalz/Na-Oleat-Gemische

Tab. B.2: Berechnung der cmc_{mix} -Werte von NaC/NaO-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur aus den experimentellen cmc -Werten von NaC ($cmc_{NaC-exp}$) [84] und NaO ($cmc_{NaO-exp}$) nach CLINT ($cmc_{mix-calc}$) bzw. RUBINGH ($cmc_{mix-fcalc}$) unter Einbeziehung des NaC-Molenbruchs in den Mischmizellen (x_{NaC}) und des Wechselwirkungsparameters (β_W) sowie der Aktivitätskoeffizienten von NaC (f_{NaC}) und NaO (f_{NaO}), Vergleich mit den experimentellen cmc -Werten der NaC/NaO-Gemische ($cmc_{mix-exp}$)

T/ °C	$cmc_{NaC}/$ (exp) mM	$cmc_{NaO}/$ (exp) mM	$cmc_{mix}/$ (exp) mM	$cmc_{mix}/$ (calc) mM	$cmc_{mix}/$ (fcalc) mM	x_{NaC}	β_W	f_{NaC}	f_{NaO}
10	17,2	1,2	3,3	3,60	3,41	0,171	-0,38	0,69	0,99
20	16,3	1,0	2,6	3,45	3,02	0,214	-1,04	0,37	0,95
30	16,0	1,0	2,3	3,53	3,02	0,226	-1,23	0,31	0,94
40	16,5	1,2	2,6	3,89	3,39	0,215	-1,02	0,38	0,95
50	17,9	1,2	2,9	3,94	3,43	0,222	-1,06	0,37	0,95
60	19,7	1,3	3,1	4,60	3,94	0,227	-1,15	0,34	0,94
70	22,3	1,6	3,6	5,61	4,62	0,260	-1,26	0,31	0,92

Tab. B.3: Berechnung der cmc_{mix} -Werte von NaDC/NaO-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur aus den experimentellen cmc -Werten von NaDC ($cmc_{NaDC-exp}$) [84] und NaO ($cmc_{NaO-exp}$) nach CLINT ($cmc_{mix-calc}$) bzw. RUBINGH ($cmc_{mix-fcalc}$) unter Einbeziehung des NaDC-Molenbruchs in den Mischmizellen (x_{NaDC}) und des Wechselwirkungsparameters (β_W) sowie der Aktivitätskoeffizienten von NaDC (f_{NaDC}) und NaO (f_{NaO}), Vergleich mit den experimentellen cmc -Werten der NaDC/NaO-Gemische ($cmc_{mix-exp}$)

T/ °C	$cmc_{NaDC}/$ (exp) mM	$cmc_{NaO}/$ (exp) mM	$cmc_{mix}/$ (exp) mM	$cmc_{mix}/$ (calc) mM	$cmc_{mix}/$ (fcalc) mM	x_{NaDC}	β_W	f_{NaDC}	f_{NaO}
10	6,7	1,2	2,5	3,29	2,79	0,331	-0,53	0,62	0,94
20	6,1	1,0	2,4	2,42	2,48	0,293	0,07	1,07	1,01
30	6,4	1,0	2,5	2,35	2,51	0,238	0,21	1,21	1,01
40	7,4	1,2	2,6	2,89	2,87	0,247	-0,02	0,98	0,99
50	8,9	1,2	2,9	3,06	3,01	0,270	-0,06	0,95	0,99
60	11,5	1,3	3,1	3,78	3,57	0,249	-0,23	0,81	0,99
70	14,4	1,6	3,5	4,66	4,29	0,264	-0,35	0,72	0,98

Tab. B.4: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaC/NaO-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	3,3	-1,9	22,9	-24,8
20	2,6	2,1	24,3	-22,1
30	2,3	4,2	25,4	-21,3
40	2,6	8,3	25,9	-17,6
50	2,9	10,9	26,5	-15,6
60	3,1	12,3	27,1	-14,8
70	3,6	13,8	27,5	-13,7

Tab. B.5: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaC/NaO-Gemischen (5:2) in 0,1 M NaCl, pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	1,8	-4,3	24,3	-28,6
20	1,4	-2,3	25,8	-28,1
30	1,5	1,5	26,5	-25,0
40	1,6	4,6	27,2	-22,6
50	1,8	6,2	27,8	-21,5
60	2,0	6,9	28,3	-21,4
70	2,2	8,5	28,9	-20,4

Tab. B.6: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaDC/NaO-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	2,5	-2,4	23,5	-25,9
20	2,5	1,7	24,4	-22,7
30	2,4	5,7	25,3	-19,6
40	2,6	10,9	25,9	-15,1
50	2,9	15,1	26,5	-11,4
60	3,1	17,5	27,1	-9,6
70	3,5	19,6	27,6	-8,0

Tab. B.7: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaDC/NaO-Gemischen (5:2) in 0,1 M NaCl, pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	1,3	-4,9	25,1	-30,0
20	1,1	-2,5	26,4	-28,8
30	0,8	2,8	28,1	-25,2
40	0,9	6,2	28,7	-22,5
50	1,0	9,7	29,3	-19,6
60	1,1	11,8	30,0	-18,2
70	1,2	14,1	30,6	-16,5

B.3 Gallensalz/Na-Palmitat-Gemische

Tab. B.8: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaC/NaP-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	8,2	-11,0	20,7	-31,7
20	6,8	-7,6	21,9	-29,6
30	4,4	-2,8	23,8	-26,6
40	4,8	3,6	24,3	-20,7
50	5,2	7,7	24,9	-17,2
60	5,5	12,0	25,5	-13,5
70	6,4	14,7	25,8	-11,1

Tab. B.9: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaC/NaP-Gemischen (5:2) in 0,1 M NaCl, pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	3,8	-13,9	22,6	-36,5
20	3,0	-9,8	23,9	-33,7
30	1,9	-3,4	25,9	-29,3
40	2,1	2,8	26,5	-23,7
50	2,4	6,5	27,0	-20,5
60	2,7	9,4	27,5	-18,1
70	3,0	12,5	28,0	-15,5

Tab. B.10: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaDC/NaP-Gemischen (5:2) in H_2O , pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	4,0	-10,9	22,4	-33,3
20	3,3	-7,0	23,7	-30,7
30	3,1	-1,9	24,7	-26,5
40	3,3	4,4	25,3	-20,9
50	3,7	11,0	25,8	-14,8
60	4,0	16,0	26,4	-10,4
70	4,4	18,7	26,9	-8,2

Tab. B.11: cmc-Werte und thermodynamische Parameter (Änderung der Enthalpie ΔH_{demic} , der Freien Enthalpie ΔG_{demic} und der Entropie ΔS_{demic}) der Demizellisierung von NaDC/NaP-Gemischen (5:2) in 0,1 M NaCl, pH 7,5, in Abhängigkeit von der Temperatur

$T/^\circ\text{C}$	cmc/mM	$\Delta H_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_{demic}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	1,3	-13,0	25,1	-38,1
20	1,2	-9,7	26,2	-35,9
30	0,9	-4,4	27,8	-32,2
40	1,0	2,7	28,4	-25,8
50	1,1	6,5	29,1	-22,5
60	1,2	10,4	29,7	-19,4
70	1,3	14,4	30,4	-16,0

Literaturverzeichnis

- [1] CAREY, M.C. ; SMALL, D.M. ; BLISS, C.M.: Lipid digestion and absorption. In: *Annu. Rev. Physiol.* 45 (1983), S. 651–668
- [2] CASPARY, W.F.: Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 55 (1992), S. 299S–308S
- [3] LAIRON, D.: Lipid absorption and metabolism: physiological and molecular aspects. In: *Proc. Nutr. Soc.* 55 (1996), S. 1–3
- [4] STREMMEL, W.: Absorption of fat and fat-soluble vitamins. In: CASPARY, W.F. (Hrsg.): *Structure and Function of the Small Intestine.* Excerpta Medica - Amsterdam, 1987, S. 175–184
- [5] PATTON, J.S.: Physiology of the gastrointestinal tract. In: JOHNSON, L.R. (Hrsg.): *Gastrointestinal Lipid Digestion.* Raven Press - New York, 1981, S. 1123–1146
- [6] BECK, T.: Zur Anatomie des Menschen: Magen, Dünn- und Dickdarm. In: *Pharm. Ztg.* 42 (1998), S. 11–26
- [7] BORGSTRÖM, B. ; BARROWMAN, J.A. ; LINDSTRÖM, M.: Role of bile acids in intestinal lipid digestion and absorption. In: DANIELSSON, H. (Hrsg.) ; SJÖVALL, J. (Hrsg.): *New Comprehensive Biochemistry - Sterols and Bile Acids* Bd. 12. Elsevier - Amsterdam, 1985, Kapitel 14, S. 405–425
- [8] ROSOFF, M. ; SERAJUDDIN, A.T.M.: Solubilization of diazepam in bile salts and in sodium cholate-lecithin-water phases. In: *Int. J. Pharm.* 6 (1980), S. 137–146
- [9] BJÖRKHEM, I.: Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver. In: DANIELSSON, H. (Hrsg.) ; SJÖVALL, J. (Hrsg.): *New Comprehensive Biochemistry - Sterols and Bile Acids* Bd. 12. Elsevier - Amsterdam, 1985, Kapitel 9, S. 231–278
- [10] ELLIOT, W.H.: Metabolism of bile acids in liver and extrahepatic tissues. In: DANIELSSON, H. (Hrsg.) ; SJÖVALL, J. (Hrsg.): *New Comprehensive Biochemistry - Sterols and Bile Acids* Bd. 12. Elsevier - Amsterdam, 1985, Kapitel 11, S. 303–329
- [11] HYLEMON, P.B.: Metabolism of bile acids in intestinal microflora. In: DANIELSSON, H. (Hrsg.) ; SJÖVALL, J. (Hrsg.): *New Comprehensive Biochemistry - Sterols and Bile Acids* Bd. 12. Elsevier - Amsterdam, 1985, Kapitel 12, S. 331–343
- [12] SHIPLEY, G.G.: Structural studies of the lipid components of bile. In: *Hepatology* 12 (1990), S. 33S–38S
- [13] GURR, M.: Fat digestion and assimilation. In: *Lipid Technol.* 9 (1997), S. 94–97
- [14] THOMSON, A.B. ; KEELAN, M. ; GARG, M.L. ; M.T.CLANDININ: Intestinal aspects of lipid absorption: in review. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67 (1989), S. 179–191
- [15] DUANE, W.C. ; LEVITT, M.D. ; STALEY, N.A. ; HALE, A.P. M. ; WIEGAND, D.M. ; FETZER, C.A.: Role of the unstirred layer in protecting the murine gastric mucosa from bile salt. In: *Gastroenterology* 91 (1986), S. 913–918
- [16] THOMSON, A.B. ; SCHOELLER, C. ; KEELAN, M. ; SMITH, L. ; CLANDININ, M.T.: Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71 (1993), S. 531–555

- [17] GERICKE, A. ; SMITH, E.R. ; MOORE, D.J. ; MENDELSON, R. ; STORCH, J.: Adipocyte fatty acid-binding protein: interaction with phospholipid membranes and thermal stability studied by FTIR spectroscopy. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 8311–8317
- [18] MINICH, D.M. ; VONK, R.J. ; VERKADE, H.J.: Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions. In: *J. Lipid Res.* 38 (1997), S. 1709–1721
- [19] TSO, P. ; FUJIMOTO, K.: The absorption and transport of lipids by the small intestine. In: *Brain Res. Bull.* 27 (1991), S. 477–482
- [20] THURNHOFER, H. ; IMFELD, D. ; LIPKA, G. ; HAUSER, H.: The absorption of cholesterol by small intestinal brush border membrane from cholate mixed micelles is protein-mediated. In: *Acta Pharm. Jug.* 41 (1991), S. 351–360
- [21] WOUNTERS, F.S. ; MARKMAN, M. ; DE GRAAF, P. ; HAUSER, H. ; TABAK, H.F. ; WIRTZ, K.W. ; MOORMAN, A.F.M.: The immunohistochemical localization of non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) in rat small intestine enterocytes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1259 (1995), S. 192–196
- [22] DIETSCHY, J.M.: Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. In: *J. Lipid Res.* 9 (1968), S. 297–309
- [23] WILSON, F.A.: Intestinal transport of bile acids. In: *Am. J. Physiol.* 241 (1981), S. G83–G92
- [24] KRAMERT, W. ; GIRBIG, F. ; GUTJAHR, U. ; KOWALEWSKI, S. ; JOUVENAL, K. ; MÜLLER, G. ; TRIPIER, D. ; WESS, G.: Intestinal bile acid absorption. In: *J. Biol. Chem.* 268 (1993), S. 18035–18046
- [25] MEIER, P.J. ; STIEGER, B.: Molecular mechanisms in bile formation. In: *News Physiol. Sci.* 15 (2000), S. 89–93
- [26] KULLAK-UBLICK, G.A. ; STIEGER, B. ; HAGENBUCH, B. ; MEIER, P.J.: Hepatic transport of bile salts. In: *Sem. Liver Dis.* 20 (2000), S. 273–292
- [27] HOFMANN, A.F. ; SMALL, D.M.: Detergent properties of bile salts: correlation with physicochemical function. In: *Annu. Rev. Med.* 18 (1967), S. 333–376
- [28] KRITCHEVSKY, D. ; NAIR, P.P.: Chemistry of the bile acids. In: NAIR, P.P. (Hrsg.) ; KRITCHEVSKY, D. (Hrsg.): *The Bile Acids - Chemistry, Physiology, and Metabolism* Bd. 1: Chemistry. Plenum Press - New York, 1971, Kapitel 1, S. 1–9
- [29] CAREY, M.C. ; SMALL, D.M.: Micelle formation by bile salts. In: *Arch. Intern. Med.* 130 (1972), S. 506–527
- [30] SMALL, D.M.: *Handbook of Lipid Research*. Bd. 4: *The Physical Chemistry of Lipids*. Plenum Press - New York, 1986
- [31] CEVC, G. ; MARSH, D.: *Cell Biology: a Series of Monographs*. Bd. 5: *Phospholipid Bilayers - Physical Principles and Models*. Wiley - New York, 1987
- [32] LASIC, D.D.: *Liposomes: from Physics to Application*. Elsevier - Amsterdam, 1993
- [33] SMALL, D.M.: A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. In: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45 (1968), S. 108–119
- [34] SMALL, D.M.: Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. In: *Fed. Proc.* 29 (1970), S. 1320–1326
- [35] CAREY, M.C. ; SMALL, D.M.: The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. In: *Am. J. Med.* 49 (1970), S. 590–608
- [36] HARTLEY, G.S. *Aqueous solutions of paraffin-chain salts. A study in micelle formation*. Actualités Scientifiques et Industrielles, Hermann & Cie - Paris. 1936
- [37] LICHTENBERG, D. ; ROBSON, R.J. ; DENNIS, E.A.: Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. In: *Biochim. Biophys. Acta* 737 (1983), S. 285–304

- [38] PRIVALOV, P.L. ; GILL, S.J.: The hydrophobic effect: a reappraisal. In: *Pure Appl. Chem.* 61 (1989), S. 1097–1104
- [39] BLOKZIJL, W. ; ENGBERTS, J.B.F.N.: Hydrophobe Effekte - Ansichten und Tatsachen. In: *Angew. Chem.* 105 (1993), S. 1610–1648
- [40] GILL, S.J. ; WADSÖ, I.: An equation of state describing hydrophobic interactions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976), S. 2955–2958
- [41] TANFORD, C.: *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Krieger - Malabar, 1991
- [42] TANFORD, C.: Monolayers, micelles, lipid vesicles and biomembranes. In: DEGIORGIO, V. (Hrsg.) ; CORTI, M. (Hrsg.): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions* Bd. 90, 1985, S. 547–662
- [43] ISRAELCHVILI, J.N.: Thermodynamic and geometric aspects of amphiphile aggregation into micelles, vesicles, and bilayers, and the interaction between them. In: DEGIORGIO, V. (Hrsg.) ; CORTI, M. (Hrsg.): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions* Bd. 90, 1985, S. 24–58
- [44] ISRAELACHVILI, J.N. ; MITCHELL, D.J. ; NINHAM, B.W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 72 (1976), S. 1525–1568
- [45] FATTAL, D. ; ANDELMAN, D. ; BEN-SHAUL, A.: The vesicle-micelle transition in mixed lipid-surfactant systems: a molecular model. In: *Langmuir* 11 (1995), S. 1154–1161
- [46] ISRAELACHVILI, J.N.: *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press - London, 1992
- [47] LICHTENBERG, D.: Micelles and liposomes. In: SHINITZKY, M. (Hrsg.): *Biomembranes - Physical Aspects* Bd. 1. VCH - Weinheim, 1993, S. 63–96
- [48] SCHUBERT, R. *Gallensatz-Lipid-Wechselwirkungen in Liposomen und Mischmizellen*. Habilitationsschrift, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. 1992
- [49] LIPOWSKY, R.: Self-organization of membranes. In: *Europhys. Lett.* 3 (1999), S. 76–77
- [50] JONES, M.N. ; CHAPMAN, D.: *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*. Wiley - New York, 1995
- [51] LICHTENBERG, D. ; MARKELLO, T.: Structural characteristics of phospholipid multilamellar vesicles. In: *J. Pharm. Sci.* 73 (1984), S. 122–125
- [52] SINGER, S.J. ; NICOLSON, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In: *Science* 175 (1972), S. 720–731
- [53] ISRAELACHVILI, J.N.: Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure. In: *Biochim. Biophys. Acta* 469 (1977), S. 221–225
- [54] ISRAELACHVILI, J.N. ; MITCHELL, D.J. ; NINHAM, B.W.: Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 470 (1977), S. 185–201
- [55] BANGHAM, A.D.: Membrane models with phospholipids. In: BUTLER, J.A.V. (Hrsg.) ; NOBLE, D. (Hrsg.): *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Pergamon Press - Oxford, 1968, Kapitel 2, S. 29–95
- [56] LEHMANN, O.: Concerning liquid crystals. In: *Physik. Z.* 8 (1907), S. 42–51
- [57] LEHMANN, O.: *Die neue Welt der flüssigen Kristalle und deren Bedeutung für Physik, Chemie, Technik und Biologie*. Akademische Verlagsgesellschaft - Leipzig, 1911
- [58] CEVC, G.: *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker - New York, 1993
- [59] LAGGNER, P. ; KRIECHBAUM, M.: Phospholipid phase transitions: kinetics and structural aspects. In: *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991), S. 121–145

- [60] GARIDEL, P. ; BLUME, A.: Lipid model membranes and biomembranes. In: KEMP, R. (Hrsg.): *The Handbook on Thermal Analysis and Calorimetry - From Macromolecules to Man* Bd. 4. Elsevier - Amsterdam, 1998, Kapitel 4, S. 109–173
- [61] MISHIMA, K.: Light scattering of dipalmitoyl lecithin vesicles. In: *J. Phys. Soc. Japan* 41 (1976), S. 2139–2140
- [62] SMALL, D.M.: Phase equilibria and structure of dry and hydrated egg lecithin. In: *J. Lipid Res.* 8 (1967), S. 551–557
- [63] WACKER, M. ; SCHUBERT, R.: From mixed micelles to liposomes: critical steps during detergent removal by membrane dialysis. In: *Int. J. Pharm.* 162 (1998), S. 171–175
- [64] FROMHERZ, P. ; RÜPPEL, D.: Lipid vesicle formation: the transition from open disks to closed shells. In: *FEBS Lett.* 179 (1985), S. 155–159
- [65] HELFRICH, W.: The size of bilayer vesicles generated by sonication. In: *Phys. Lett.* 50 A (1974), S. 115–116
- [66] GELBART, W.M. ; BEN-SHAUL, A. ; ROUX, D.: *Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers*. Springer - New York, 1994
- [67] MOROI, Y.: *Micelles - Theoretical and Applied Aspects*. Plenum Press - New York, 1992
- [68] MUKERJEE, P.: Micellar properties of drugs: micellar and nonmicellar patterns of self-association of hydrophobic solutes of different molecular structures - monomer fraction, availability, and misuses of micellar hypothesis. In: *J. Pharm. Sci.* 63 (1974), S. 972–981
- [69] HELENIUS, A. ; SIMONS, K.: Solubilization of membranes by detergents. In: *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975), S. 29–79
- [70] SMALL, D.M.: The physical chemistry of cholanic acids. In: NAIR, P.P. (Hrsg.) ; KRITCHEVSKY, D. (Hrsg.): *The Bile Acids - Chemistry, Physiology, and Metabolism* Bd. 1: Chemistry. Plenum Press - New York, 1971, Kapitel 8, S. 249–355
- [71] SWANSON-VETHAMUTHU, M. ; ALMGREN, M. ; MUKHTAR, E. ; BAHAPUR, P.: Fluorescence quenching studies of the aggregation behavior of the mixed micelles of bile salt and cetyltrimethylammonium halides. In: *Langmuir* 8 (1992), S. 2396–2404
- [72] MARQUES, E.F. ; EDLUND, H. ; LA MESA, C. ; KHAN, A.: Liquid crystals and phase equilibria binary bile salt-water systems. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 5178–5186
- [73] EKWALL, P. ; STEN, A. ; NORMAN, A.: Some differences between solubilization in bile salt and paraffin chain salt solutions. In: *Acta Chem. Scand.* 10 (1956), S. 681–704
- [74] MATUBAYASI, N. ; SUGIYAMA, S. ; KANZAKI, M. ; MATUZAWA, A.: Thermodynamic studies of the adsorbed films and micelles of sodium taurodeoxycholate. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 196 (1997), S. 123–127
- [75] WETZEL, P.B. ; CAMMENGA, H.K.: Equilibrium penetration of DMPC monolayers by sodium cholate. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 207 (1998), S. 70–77
- [76] SASAKI, Y. ; IGURA, T. ; MIYASSU, Y.I. ; LEE, S. ; NAGADOME, S. ; TAKIGUCHI, H. ; SUGIHARA, G.: The adsorption behavior of four bile salt species on graphite in water - evaluation of effective hydrophobicity of bile salts. In: *Colloids Surf. B* 5 (1995), S. 241–247
- [77] SASAKI, Y. ; NAGATA, H.D. ; FUJII, Y.K. ; LEE, S. ; NAGADOME, S. ; SUGIHARA, G.: A thermodynamic study of the adsorption behavior of four bile salt species on graphite in water. In: *Colloids Surf. B* 9 (1997), S. 169–176
- [78] FONTELL, K.: Micellar behavior in solutions of bile acid salts. II. Light-scattering by the aqueous solutions. In: *Kolloid Z. Z. Polym.* 244 (1971), S. 253–257

- [79] MAZER, N.A. ; KWASNICK, R.F. ; CAREY, M.C. ; BENEDEK, G.B.: Quasielastic light scattering spectroscopic studies of aqueous bile salt, bile salt-lecithin and bile salt-lecithin-cholesterol solutions. In: MITTAL, K.L. (Hrsg.): *Micellization, Solubilization, Microemulsions* Bd. 1. Plenum Press - New York, 1977, S. 383–402
- [80] MAZER, N.A. ; CAREY, M.C. ; KWASNICK, R.F. ; BENEDEK, G.B.: Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape and thermodynamics of bile salt micelles. In: *Biochemistry* 18 (1979), S. 3064–3075
- [81] MAZER, N.A.: Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems and native bile. In: *Hepatology* 12 (1990), S. 39S–44S
- [82] FONTELL, K.: Micellar behavior in solutions of bile acid salts. IV. An X-ray study of the aqueous solutions. In: *Kolloid Z. Z. Polym.* 246 (1971), S. 710–718
- [83] FONTELL, K.: Micellar behavior in solutions of bile acid salts. III. Viscosity and density measurements in the aqueous solutions. In: *Kolloid Z. Z. Polym.* 246 (1971), S. 614–625
- [84] GARIDEL, P. ; HILDEBRAND, A. ; NEUBERT, R. ; BLUME, A.: Thermodynamic characterization of bile salt formation as a function of temperature and ionic strength using isothermal titration calorimetry. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 5267–5275
- [85] GYIMESI, J. ; BARCZA, L.: Dimerization: first step for micelle preorganization of bile salts. In: *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* 15 (1993), S. 153–158
- [86] HILDEBRAND, A. *Charakterisierung mizellarer Systeme hinsichtlich thermodynamischer Stabilität und Wechseleffektkapazität*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1998
- [87] SMALL, D.M.: Size and structure of bile salt micelles: influence of structure, concentration, counterion concentration, pH, and temperature. In: *Adv. Chem. Ser. B* 84 (1968), S. 31–52
- [88] SMALL, D.M. ; PENKETT, S.A. ; CHAPMAN, D.: Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Biochim. Biophys. Acta* 176 (1969), S. 178–189
- [89] CAREY, M.C.: Physical-chemical properties of bile acids and their salts. In: DANIELSSON, H. (Hrsg.) ; SJÖVALL, J. (Hrsg.): *New Comprehensive Biochemistry - Sterols and Bile Acids* Bd. 12. Elsevier - Amsterdam, 1985, Kapitel 13, S. 345–403
- [90] COELLO, A. ; MELJIDE, F. ; RODRIGUEZ NUÑEZ, E. ; VAZQUEZ TATO, J.: Aggregation behavior of sodium cholate in aqueous solution. In: *J. Phys. Chem.* 97 (1993), S. 10186–10191
- [91] HAO, L. ; LU, R.H. ; LEAIST, D.G. ; POULIN, P.R.: Aggregation number of aqueous sodium cholate micelles from mutual diffusion measurements. In: *J. Sol. Chem.* 26 (1997), S. 113–125
- [92] JOVER, A. ; MELJIDE, F. ; RODRIGUEZ NUÑEZ, E. ; VAZQUEZ TATO, J. ; MOSQUERA, M.: Aggregation number for sodium deoxycholate from steady-state and time-resolved fluorescence. In: *Langmuir* 13 (1997), S. 3161–3164
- [93] LOPEZ, F. ; SAMSETH, J. ; MORTENSEN, K. ; ROSENQVIST, E. ; ROUCH, J.: Micro- and macrostructural studies of sodium deoxycholate micellar complexes in aqueous solutions. In: *Langmuir* 12 (1996), S. 6188–6196
- [94] LI, Y. ; HOLZWARTH, J.F. ; BOHNE, C.: Aggregation dynamics of sodium taurodeoxycholate and sodium deoxycholate. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 2038–2041
- [95] OAKENFULL, D. ; FISHER, L.: The role of hydrogen bonding in the formation of bile salt micelles. In: *J. Phys. Chem.* 81 (1977), S. 1838–1841
- [96] OAKENFULL, D. ; FISHER, L.: Comments on the role of hydrogen bonding in the formation of bile salt micelles. In: *J. Phys. Chem.* 82 (1978), S. 2443–2445
- [97] FISHER, L. ; OAKENFULL, D.: The environment of solubilized molecules in bile salt micelles. In: *Austr. J. Chem.* 32 (1979), S. 31–39

- [98] FISHER, L. ; OAKENFULL, D.: The role of hydrogen bonding in the formation of bile salt micelles. 2. A demonstration of geometric effects on the stabilizing role of hydrogen bonding. In: *J. Phys. Chem.* 84 (1980), S. 936–937
- [99] VADNERE, M. ; NATARAJAN, R. ; LINDENBAUM, S.: Apparent molal volumes of bile salts in H₂O and D₂O solutions. In: *J. Phys. Chem.* 84 (1980), S. 1900–1903
- [100] LINDMAN, B. ; KAMENKA, N. ; BRUN, B.: Translational motion and association in aqueous sodium cholate solutions. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 56 (1976), S. 328–336
- [101] LINDMAN, B. ; KAMENKA, N. ; FABRE, H. ; ULMUS, J. ; WIELOCH, T.: Aggregation, aggregate composition, and dynamics in aqueous sodium cholate solutions. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 73 (1980)
- [102] SCHURTENBERGER, P. ; MAZER, N.A. ; KÄNZIG, W.: Static and dynamic light scattering studies of micellar growth and interactions in bile salt solutions. In: *J. Phys. Chem.* 87 (1983), S. 308–315
- [103] SCHURTENBERGER, P. ; MAZER, N.A. ; KÄNZIG, W.: Static and dynamic light scattering studies of micellar growth and interactions in bile salt solutions. In: DEGIORGIO, V. (Hrsg.) ; CORTI, M. (Hrsg.): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions* Bd. 90, 1985, S. 674–676
- [104] ZAKRZEWSKA, J. ; MARKOVIC, V. ; VUCELIC, D. ; FEIGIN, L. ; DEMBO, A. ; MOGILEVSKY, L.: Investigations of aggregation behavior of bile salts by small-angle X-ray scattering. In: *J. Phys. Chem.* 94 (1990), S. 5078–5081
- [105] KAWAMURA, H. ; MURATA, Y. ; YAMAGUCHI, T. ; IGIMI, H. ; TANAKA, M. ; SUGIHARA, G. ; KRATHOVIL, J.P.: Spin label studies of bile salt micelles. In: *J. Phys. Chem.* 93 (1989), S. 3321–3326
- [106] SANTHANALAKSHMI, J. ; LAKSHMI, G.S. ; ASWAL, V.K. ; GOYAL, P.S.: Small-angle neutron scattering study of sodium cholate and sodium deoxycholate interacting micelles in aqueous medium. In: *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* 113 (2001), S. 55–62
- [107] D’ALAGNI, M. ; GIGLIO, E. ; PETRICONI, S.: Calorimetric and optical study of micellar aggregates of sodium taurodeoxycholate. In: *Colloid Polym. Sci.* 265 (1987), S. 517–521
- [108] CAMPANELLI, A.R. ; CANDELORO DE SANCTIS, S. ; GIGLIO, E. ; PAVEL, N.V. ; QUAGLIATA, C.: From crystal to micelle: a new approach to the micellar structure. In: *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* 7 (1989), S. 391–400
- [109] D’ALAGNI, M. ; D’ARCHIVIO, A. ; GALANTINI, L. ; GIGLIO, E.: Structural study of the micellar aggregates of sodium chenodeoxycholate and sodium deoxycholate. In: *Langmuir* 13 (1997), S. 5811–5815
- [110] BONINCONTRO, A. ; BRIGANTI, G. ; D’ARCHIVIO, A.A. ; GALANTINI, L. ; GIGLIO, E.: Structural study of the micellar aggregates of sodium taurodeoxycholate. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 10303–10309
- [111] D’ARCHIVIO, A.A. ; GALANTINI, L. ; GAVUZZO, E. ; GIGLIO, E. ; SCARAMUZZA, L.: Possible models for the micellar aggregates of glycocholate and taurocholate salts from crystal structures; QELS and CD measurements. In: *Langmuir* 12 (1996), S. 4660–4667
- [112] BOTTARI, E. ; D’ARCHIVIO, A.A. ; FESTA, M.R. ; GALANTINI, L. ; GIGLIO, E.: Structure and composition of sodium taurocholate micellar aggregates. In: *Langmuir* 15 (1999), S. 2996–2998
- [113] BONINCONTRO, A. ; D’ARCHIVIO, A.A. ; GALANTINI, L. ; GIGLIO, E. ; PUNZO, F.: X-ray, electrolytic conductance, and dielectric studies of bile salt micellar aggregates. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 10436–10443
- [114] KRATHOVIL, J.P.: Size of bile salt micelles: techniques, problems and results. In: *Hepatology* 4 (1984), S. 85S–97S
- [115] KRATHOVIL, J.P. ; HSU, W.P. ; KWOK, D.I.: How large are the micelles of di- α -hydroxy bile salts at the critical micellization concentration in aqueous electrolyte solutions ? Results from sodium taurodeoxycholate and sodium deoxycholate. In: *Langmuir* 2 (1986), S. 256–258

- [116] KALLAY, N. ; COLIC, M. ; SIMEON, V. ; KRATOHVIL, J.P.: Enthalpies of dilution of bile salt solutions: sodium taurodeoxycholate and sodium taurocholate. In: *Croat. Chem. Acta* 60 (1987), S. 555–563
- [117] BLUME, A. ; TUCHTENHAGEN, J. ; PAULA, S.: Application of titration calorimetry to study binding of ions, detergents, and polypeptides to lipid bilayers. In: *Prog. Colloid Polym. Sci* 93 (1993), S. 118–122
- [118] PAULA, S. ; SÜS, W. ; TUCHTENHAGEN, J. ; BLUME, A.: Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity titration calorimetry study. In: *J. Phys. Chem.* 99 (1995), S. 11742–11751
- [119] MAJHI, P.R. ; MOULIK, S.P.: Energetics of micellization: reassessment by a high-sensitivity titration calorimeter. In: *Langmuir* 14 (1998), S. 3986–3990
- [120] MAJHI, P.R. ; MOULIK, S.P. ; BURKE, S.E. ; RODGERS, M. ; PALEPU, R.: Physicochemical investigations on the interaction of surfactants and salts with polyvinylpyrrolidone in aqueous medium. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 235 (2001), S. 227–234
- [121] GOUIN, S. ; ZHU, X.X.: Fluorescence and NMR studies of the effect of a bile acid dimer on the micellization of bile salts. In: *Langmuir* 14 (1998), S. 4025–4029
- [122] DIAZ, A.N. ; SANCHEZ, F.G. ; PAREJA, A.G.: Cholic acid behavior in water and organic solvent: study of normal and inverted aggregates. In: *Colloids Surf. A* 142 (1998), S. 27–34
- [123] FUNASAKI, N. ; NOMURA, M. ; ISHIKAWA, S. ; NEYA, S.: Hydrophobic self-association of sodium taurochenodeoxycholate and tauroursodeoxycholate. In: *J. Phys. Chem.* 104 (2000), S. 7745–7751
- [124] RODA, A. ; HOFMANN, A.F. ; MYSELS, K.J.: The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. In: *J. Biol. Chem.* 258 (1983), S. 6362–6370
- [125] LASCH, J. ; BERDICHEVSKY, V.R. ; TORCHILIN, V.P. ; KOELSCH, R. ; KRETSCHMER, K.: A method to measure critical detergent parameters. Preparation of liposomes. In: *Anal. Biochem.* 133 (1983), S. 486–491
- [126] COELLO, A. ; MEIJIDE, F. ; RODRIGUEZ NUÑEZ, E. ; VAZQUEZ TATO, J.: Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. In: *J. Pharm. Sci.* 85 (1996), S. 9–15
- [127] FONTELL, K.: Micellar behavior in solutions of bile acid salts. In: *Kolloid Z. Z. Polym.* 244 (1971), S. 246–252
- [128] SUGIOKA, H. ; MOROI, Y.: Micelle formation of sodium cholate and solubilization into the micelle. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1394 (1998), S. 99–110
- [129] NAGADOME, S. ; YAMAUCHI, A. ; MIYASHITA, K. ; IGIMI, H. ; SUGIHARA, G.: Transport behavior of four bile salt micelles and cholesterol solubilized by their micelles across porous membrane. In: *Colloid Polym. Sci.* 276 (1998), S. 59–65
- [130] SHINODA, K.: *Colloidal Surfactants. Some Physical Chemical Properties.* Academic Press - New York, 1969
- [131] MYSELS, K.J. ; MUKERJEE, P.: Reporting experimental data dealing with critical micellization concentrations (CMCs) of aqueous surfactant systems. In: *Pure Appl. Chem.* 51 (1979), S. 1083–1089
- [132] CAREY, M.C. ; SMALL, D.M.: Micellar properties of dihydroxy and trihydroxy bile salts: effects of counterion and temperature. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 31 (1969), S. 382–396
- [133] ZANA, R. ; GÜVELI, D.: Fluorescence probing study of the association of bile salts in aqueous solutions. In: *J. Phys. Chem.* 89 (1985), S. 1687–1690
- [134] SMALL, D.M.: Physicochemical studies of cholesterol gallstone formation. In: *Gastroenterology* 52 (1967), S. 607–610
- [135] DERVICHIAN, D.G.: Molecular associations considered from the point of view of the lipophilic-hydrophilic balance. In: *Adv. Chem. Ser. B* 84 (1968), S. 78–87

- [136] MAZER, N.A. ; CAREY, M.C. ; KWASNICK, R.F. ; BENEDEK, G.B.: Quasielastic light scattering studies of micelle formation and cholesterol precipitation in model bile solutions. In: *Hepatology* 4 (1979), S. 143–150
- [137] MAZER, N.A. ; CAREY, M.C. ; BENEDEK, G.B.: Quasielastic light scattering studies of model bile systems. In: *NATO Adv. Study Inst. Ser. A* 34 (1980), S. 127–150
- [138] MAZER, N.A. ; SCHURTENBERGER, P.: Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems and native bile. In: DEGIORGIO, V. (Hrsg.) ; CORTI, M. (Hrsg.): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions* Bd. 90, 1985, S. 587–606
- [139] MÜLLER, K.: Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile ? X-ray structural analysis. In: *Biochemistry* 20 (1981), S. 404–414
- [140] ULMUS, J. ; LINDBLOM, G. ; WENNERSTRÖM, H.: Molecular organization in the liquid crystalline phases of lecithin-sodium cholate-water systems studied by nuclear magnetic resonance. In: *Biochemistry* 21 (1982), S. 1553–1560
- [141] HJELM, R.P. ; THIYAGARAGAN, P. ; ALKAN, H.: A small-angle neutron scattering study of the effects of dilution on particle morphology in mixture of glycocholate and lecithin. In: *J. Appl. Cryst.* 21 (1988), S. 858–863
- [142] HJELM, R.P. ; ALKAN, H. ; THIYAGARAGAN, P.: Small-angle neutron scattering studies of mixed bile salt-lecithin colloids. In: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 180 (1990), S. 155–164
- [143] HJELM, R.P. ; THIYAGARAGAN, P. ; SIVIA, D.S. ; LINDNER, P. ; ALKAN, H. ; SCHWAHN, D.: Small-angle neutron scattering from aqueous mixed colloids of lecithin and bile salt. In: *Prog. Colloid Poly. Sci.* 81 (1990), S. 225–231
- [144] HJELM, R.P. ; THIYAGARAJAN, P. ; ALKAN-ONYUKSEL, H.: Organization of phosphatidylcholine and bile salt in rodlike mixed micelles. In: *J. Phys. Chem.* 96 (1992), S. 8653–8661
- [145] NICHOLS, J.W. ; OZAROWSKI, J.: Sizing of lecithin-bile salt mixed micelles by size-exclusion high performance liquid chromatography. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 4600–4606
- [146] EGELHAAF, S.U. ; SCHURTENBERGER, P.: Shape transformation in the lecithin-bile salt system: from cylinders to vesicles. In: *J. Phys. Chem.* 98 (1994), S. 8560–8573
- [147] HJELM, R.P. ; THIYAGARAJAN, P. ; SCHTEINGART, C. ; HOFMANN, A.F. ; ALKAN-ONYUKSEL, H. ; H.T.TON-NU: Structure of mixed micelles present in bile and intestinal contents based on studies of model systems. In: HOFMANN, A.F. (Hrsg.) ; PAUMGARTNER, G. (Hrsg.) ; STIEHL, A. (Hrsg.): *Bile Acids in Gastroenterology - Basic and Clinical Advances*. Kluwer Academic Publishers - Dordrecht, 1995, Kapitel 4, S. 41–58
- [148] HJELM, R.P. ; THIYAGARAJAN, P. ; HOFFMANN, A. ; SCHTEINGART, C. ; ALKAN-ONYUKSEL, H.: Probing self assembly in biological mixed colloids by SANS, deuteration and molecular manipulation. In: *Basic Life Sci.* 64 (1996), S. 175–190
- [149] LONG, M.A. ; KALER, E.W. ; LEE, S.P. ; WIGNALL, G.D.: Characterization of lecithin-taurodeoxycholate mixed micelles using small-angle neutron scattering and static and dynamic light scattering. In: *J. Phys. Chem.* 98 (1994), S. 4402–4410
- [150] LONG, M.A. ; KALER, E.W. ; LEE, S.P.: Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions. In: *Biophys. J.* 67 (1994), S. 1733–1742
- [151] PEDERSEN, J.S. ; EGELHAAF, S.U. ; SCHURTENBERGER, P.: Formation of polymerlike mixed micelles and vesicles in lecithin-bile salt solutions: A small-angle neutron-scattering study. In: *J. Phys. Chem.* 99 (1995), S. 1299–1305
- [152] COHEN, D.E. ; CHAMBERLIN, R.A. ; THURSTON, G.M. ; BENEDEK, G.B.: Cylindrical 'worm-like' micelles in bile salt-lecithin solutions: implications for the earliest events in bile formation. In: *Falk Sympos.* 58 (1991), S. 147–150

- [153] CATES, M.E. ; CANDAU, S.J.: Statics and dynamics of worm-like surfactant micelles. In: *J. Phys.: Cond. Matter* 2 (1990), S. 6869–6892
- [154] COHEN, D.E. ; THURSTON, G.M. ; CHAMBERLIN, R.A. ; BENEDEK, G.B. ; CAREY, M.C.: Laser light scattering evidence for a common wormlike growth structure of mixed micelles in bile salt - and straight-chain detergent - phosphatidylcholine aqueous systems: relevance to the micellar structure of bile. In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 14798–14814
- [155] SMALL, D.M. ; BOURGÈS, M. ; DERVICHIAN, D.G.: Ternary and quaternary aqueous systems containing bile salt, lecithin and cholesterol. In: *Nature* 211 (1966), S. 816–818
- [156] SMALL, D.M. ; BOURGÈS, M. ; DERVICHIAN, D.G.: The biophysics of lipid associations: I. The ternary system lecithin-bile salt-water. In: *Biochim. Biophys. Acta* 125 (1966), S. 563–580
- [157] SMALL, D.M. ; BOURGÈS, M.: Lyotropic paracrystalline phases obtained with ternary and quaternary aqueous systems of amphiphilic substances in water. In: *Molec. Cryst.* 1 (1966), S. 541–561
- [158] COHEN, D.E. ; ANGELICO, M. ; CAREY, M.C.: Structural alterations in lecithin-cholesterol vesicles following interactions with monomeric and micellar bile salts: Physical-chemical basis for subselection of biliary lecithin species and aggregative states of biliary lipids during bile formation. In: *J. Lipid Res.* 31 (1990), S. 55–70
- [159] LASCH, J.: Interaction of detergents with lipid vesicles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995), S. 269–292
- [160] DENNIS, E.A.: Micellization and solubilization of phospholipids by surfactants. In: *Adv. Colloid Interf. Sci.* 26 (1986), S. 155–175
- [161] KOZLOV, M.M. ; ANDELMAN, D.: Theory and phenomenology of mixed amphiphilic aggregates. In: *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 1 (1996), S. 362–366
- [162] ANDELMAN, D. ; KOZLOV, M.M. ; HELFRICH, W.: Phase transition between vesicles and micelles driven by competing curvatures. In: *Europhys. Lett.* 25 (1994), S. 231–236
- [163] KOZLOV, M.M. ; LICHTENBERG, D. ; ANDELMAN, D.: Shape of phospholipid/surfactant mixed micelles: cylinders or disks ? Theoretical analysis. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 6600–6606
- [164] EVANS, E. ; RAWICZ, W. ; HOFMANN, A.F.: Lipid bilayer expansion and mechanical disruption in solutions of water-soluble bile acids. In: HOFMANN, A.F. (Hrsg.) ; PAUMGARTNER, G. (Hrsg.) ; STIEHL, A. (Hrsg.): *Bile Acids in Gastroenterology - Basic and Clinical Advances*. Kluwer Academic Publishers - Dordrecht, 1995, Kapitel 5, S. 59–68
- [165] LASCH, J. ; HOFFMANN, J. ; OMELYANENKO, W.G. ; KLIBANOV, A.A. ; TORCHILIN, V.P. ; BINDER, H. ; GAWRISCH, K.: Interaction of Triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1022 (1990), S. 171–180
- [166] NAGATA, M. ; YOTSUYANAGI, T. ; IKEDA, K.: Bile salt-induced disintegration of egg phosphatidylcholine liposomes: a kinetic study based on turbidity changes. In: *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990), S. 1341–1344
- [167] WÜSTNER, D. ; HERRMANN, A. ; MÜLLER, P.: Head group-independent interaction of phospholipids with bile salts: a fluorescent and EPR study. In: *J. Lipid Res.* 41 (2000), S. 351–404
- [168] CABRAL, D.J. ; SMALL, D.M. ; LILLY, H.S. ; HAMILTON, J.A.: Transbilayer movement of bile acids in model membranes. In: *Biochemistry* 26 (1987), S. 1801–1804
- [169] LICHTENBERG, D. ; ZILBERMAN, Y. ; GREENZAD, P. ; ZAMIR, S.: Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. In: *Biochemistry* 18 (1979), S. 3517–3525
- [170] WALTER, A. ; VINSON, P.K. ; KAPLUN, A. ; TALMON, Y.: Intermediate structure in the cholate-PC vesicle-micelle transition. In: *Biophys. J.* 60 (1991), S. 1315–1325

- [171] STONE, B.G. ; LARSEN, L.J. ; KNOLL, D.A. ; BLOOMFIELD, V.A. ; DUANE, W.C.: Separation of bile vesicles and micelles by gel filtration chromatography: the importance of the intermicellar bile salt concentration. In: *J. Lab. Clin. Invest.* 119 (1992), S. 557–565
- [172] DE LA MAZA, A. ; PARRA, J.L.: Vesicle to micelle phase transitions involved in the interaction of sodium cholate with phosphatidylcholine liposomes. In: *Colloids Surf. A* 127 (1997), S. 125–134
- [173] DE LA MAZA, A. ; MANICH, A.M. ; PARRA, J.L.: Intermediate aggregates resulting in the interaction of bile salt with liposomes studied by transmission electron microscopy and light scattering techniques. In: *J. Microsc.* 186 (1997), S. 75–83
- [174] EGELHAAF, S.U. ; SCHURTENBERGER, P.: Micelle-to-vesicle transition: a time-resolved structural study. In: *Phys. Rev. Lett.* 82 (1999), S. 2804–2807
- [175] ANDRIEUX, K. ; GRABIELLE-MADELMONT, C. ; KELLER, G. ; BOURGAUX, C. ; LESIEUR, P. ; OLLIVON, M.: Equilibrium process in bile salt-phospholipid systems as studied by combined DSC and X-ray diffraction. In: *S.T.P. Pharm. Sci.* 11 (2001), S. 341–348
- [176] LICHTENBERG, D. ; OPATOWSKI, E. ; KOZLOV, M.M.: Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000), S. 1–19
- [177] JACKSON, M.L. ; SCHMIDT, C.F. ; LICHTENBERG, D. ; LITMAN, B.J. ; ALBERT, A.D.: Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. In: *Biochemistry* 21 (1982), S. 4576–4582
- [178] OLLIVON, M. ; EIDELMAN, O. ; BLUMENTHAL, R. ; WALTER, A.: Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 1695–1703
- [179] UENO, M.: Partition behavior of a nonionic detergent, octyl glucoside, between membrane and water phases, and its effect on membrane permeability. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 5631–5634
- [180] VINSON, P.K. ; TALMON, Y. ; WALTER, A.: Vesicle-micelle transition of PC and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. In: *Biophys. J.* 56 (1989), S. 669–681
- [181] ALMOG, S. ; LITMAN, B.J. ; WIMLEY, W. ; COHEN, J. ; WACHTEL, E.J. ; BARENHOLZ, Y. ; BEN-SHAUL, A. ; LICHTENBERG, D.: States of the aggregation and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and octyl glucoside. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 4582–4592
- [182] DE LA MAZA, A. ; PARRA, J.L.: Structural phase transitions involved in the interaction of phospholipid bilayers with octyl glucoside. In: *Eur. J. Biochem.* 226 (1994), S. 1029–1038
- [183] DAHIM, M. ; PANSU, R. ; RONCIN, J. ; OLLIVON, M.: Micelle-vesicle transition of phospholipids studied by electron spin resonance spectroscopy. In: *S.T.P. Pharm. Sci.* 9 (1999), S. 509–520
- [184] EDWARDS, K. ; ALMGREN, M. ; BELLARE, J.: Effects of Triton X-100 on sonicated lecithin vesicles. In: *Langmuir* 5 (1989), S. 473–478
- [185] DE LA MAZA, A. ; PARRA, J.L.: Vesicle-micelle structural transition of phosphatidylcholine bilayers and Triton X-100. In: *Biochem. J.* 303 (1994), S. 907–914
- [186] CSUCS, G. ; RAMSDEN, J.J.: Solubilization of planar bilayers with detergent. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1369 (1998), S. 304–308
- [187] OBERDISSE, J. ; REGEV, O. ; PORTE, G.: Experimental study of the micelle-to-vesicle transition. In: *J. Phys. Chem.* 102 (1998), S. 1102–1108
- [188] EDWARDS, K. ; ALMGREN, M.: Solubilization of lecithin vesicles by $C_{12}E_8$. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 147 (1991), S. 1–21
- [189] EDWARDS, K. ; ALMGREN, M.: Surfactant induced leakage and structural change of lecithin vesicles: effect of surfactant headgroup size. In: *Langmuir* 8 (1992), S. 824–832
- [190] GUTBERLET, T. ; KISELEV, M. ; HEERKLOTZ, H. ; KLOSE, A.: SANS study of mixed POPC/ $C_{12}E_n$ aggregates. In: *Physica B* 276-278 (2000), S. 381–383

- [191] DE LA MAZA, A. ; PARRA, J.L.: Vesicle-micelle structural transitions of phospholipid bilayers and sodium dodecyl sulfate. In: *Langmuir* 11 (1995), S. 2435–2441
- [192] SILVANDER, M. ; KARLSSON, G. ; EDWARDS, K.: Vesicle solubilization by alkyl sulfate surfactants: a cryo-TEM study of the vesicle to micelle transition. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 179 (1996), S. 104–113
- [193] EDWARDS, K. ; GUSTAFSSON, J. ; ALMGREN, M.: Solubilization of lecithin vesicles by a cationic surfactant: intermediate structures in the vesicle-micelle transition observed by cryo-transmission electron microscopy. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 161 (1993), S. 299–309
- [194] GUSTAFSSON, J. ; ORÄDD, G. ; ALMGREN, M.: Disintegration of the lecithin lamellar phase by cationic surfactants. In: *Langmuir* 13 (1997), S. 6956–6963
- [195] ZHENG, Y. ; LIN, Z. ; ZAKIN, J.L. ; TALMON, Y. ; DAVIS, H.T. ; SCRIVEN, L.E.: Cryo-TEM imaging the flow-induced transition from vesicles to threadlike micelles. In: *J. Phys. Chem.* 104 (2000), S. 5263–5271
- [196] DE LA MAZA, A. ; PARRA, J.L.: Solubilization of unilamellar phospholipid bilayers by nonionic surfactants. In: *Colloid Polym. Sci.* 272 (1994), S. 721–730
- [197] LASCH, J. ; HOFFMANN, J. ; RICHTER, W. ; MEYERS, H.W.: Structural perturbations of phospholipid bilayers induced by the neutral detergent octyl glucoside. In: *J. Lipos. Res.* 2 (1992), S. 1–9
- [198] EGELHAAF, S.U. ; MÜLLER, M. ; SCHURTENBERGER, P.: Size determination of polymer-like micelles using cryo-electron microscopy. In: *Langmuir* 14 (1998), S. 4345–4349
- [199] EGELHAAF, S.U. ; SCHURTENBERGER, P. ; MÜLLER, M.: New controlled environment vitrification system for cryo-transmission electron microscopy: design and application to surfactant solutions. In: *J. Microsc.* 200 (2000), S. 128–139
- [200] SCHUBERT, R. ; BEYER, K. ; WOLBURG, H. ; SCHMIDT, K.H.: Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. In: *Biochemistry* 25 (1986), S. 5263–5269
- [201] SCHUBERT, R. ; BEYER, K. ; WOLBURG, H. ; JARONI, H. ; SCHMIDT, K.: Membrane alterations induced by bile salts: transient membrane holes as one possible mechanism of drug release from liposomes. In: SCHMIDT, K. (Hrsg.): *Liposomes as Drug Carriers*. Thieme - Stuttgart, 1986, S. 61–72
- [202] LASCH, J. ; SCHUBERT, R.: The interaction of detergents with liposomal membranes. In: GREGORIADIS, G. (Hrsg.): *Liposome Technology*. CRC Press - Boca Raton, 1993, S. 233–260
- [203] SCHUBERT, R.: Gallensäure-Membran-Wechselwirkung. In: *Proc. MoBBEL* 2 (1987), S. 29–40
- [204] SCHUBERT, R.: Liposomale Membranen als Permeations-Barrieren. In: *Proc. MoBBEL* 3 (1988), S. 68–84
- [205] SCHUBERT, R.: Relationship between the structure of bile salts and their interaction with membrane lipids. In: *Proc. MoBBEL* 4 (1989), S. 1–17
- [206] SCHUBERT, R. ; SCHMIDT, K.H.: Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 8787–8794
- [207] LICHTENBERG, D.: Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. In: *Biochim. Biophys. Acta* 821 (1985), S. 470–478
- [208] INOUE, T. ; YAMAHATA, T. ; SHIMOZAWA, R.: Systematic study on the solubilization of phospholipid vesicles by various surfactants. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 149 (1992), S. 345–358
- [209] OLLIVON, M. ; LESIEUR, S. ; GRABIELLE-MADELMONT, C. ; PATERNOSTRE, M.: Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000), S. 34–50
- [210] ALMGREN, M.: Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000), S. 146–163

- [211] LAPPE, G. ; EIKERMANN, H. *Process for the preparation of natural choline phosphoric acid diglyceride ester compounds*. Nattermann & Cie GmbH: Patent - Offenlegungsschrift US 3197368. 1965
- [212] STEFFEN, H. ; SCHMIDT, D. *Injektionslösungen*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift DE 2730570. 1978
- [213] STEFFEN, H.: Prinzip Mischmizelle. In: *Roche Magazin* 20 (1984), S. 2–9
- [214] MATTILA, M.A.K. ; SUISTOMAA, M.: Intravenous premedication with diazepam. In: *Anaesthesia* 39 (1984), S. 879–882
- [215] FEE, J.P.H. ; COLLIER, P.S. ; DUNDEE, J.W.: Bioavailability of three formulations of intravenous diazepam. In: *Acta Anaesthesiol. Scand.* 30 (1986), S. 337–340
- [216] REINHART, T. ; BAUER, K.H.: Parenterale Zubereitungen von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen. In: *Krankenhauspharmazie* 9 (1994), S. 529–533
- [217] TEELMANN, K. ; SCHLÄPPI, B. ; SCHÜPBACH, M. ; KISTLER, A.: Preclinical safety evaluation of intravenously administered mixed micelles. In: *Arzneim. Forsch.* 34 (1984), S. 1517–1523
- [218] MARTIN, G.P. ; MARRIOTT, C.: Membrane damage by bile salts: the protective function of phospholipids. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 31 (1981), S. 754–759
- [219] FERRO, A. ; STEFFEN, H. *Injektionslösungen für Vitamin E*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0133258. 1984
- [220] FERRO, A. ; STEFFEN, H. *Mischmicell-Lösungen mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0280887. 1988
- [221] HEIN, W. ; SUPERSAXO, A. ; STEFFEN, H. *Verwendung von Mischmicellen und Mischmicell-Lösungen von Immunmodulatoren*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0388817. 1990
- [222] ECKERT, T. *Solubilisierung von in Wasser schwerlöslichen Wirkstoffen*. Patent - Offenlegungsschrift DE 3221579. 1983
- [223] GELLER, L. ; GLANZMANN, P. ; KÜNZI, M. ; WEISS, K. *Pharmaceutical compositions for parenteral application*. Ciba Geigy AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0252004. 1988
- [224] AMEDEE-MANESME, O. ; GRÜTER, J. ; HANCK, A. *Verwendung von Mischmicellen (zur Herstellung peroraler Applikationsformen von Vitamin K₁)*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0471309. 1991
- [225] PITTROF, F. ; SUPERSAXO, A. *Verwendung von pharmazeutischen und kosmetischen Präparaten mit Mischmicellen*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0439042. 1991
- [226] PITTROF, F. ; STEFFEN, H. *Mischmicellen*. Hoffmann - La Roche AG: Patent - Offenlegungsschrift EP 0730860. 1996
- [227] Valium[®] MM - Fachinformation. (1999). – Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
- [228] Konakion[®] MM 2 mg - Fachinformation. (1998). – Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
- [229] Konakion[®] MM 10 mg - Fachinformation. (1998). – Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
- [230] RÖSSLING, G. ; GÖRITZ, D. ; MICHEL, H. *Verfahren zur Herstellung wässriger Mischmicelllösungen*. Schering AG: Patent - Offenlegungsschrift DE 3938030. 1989
- [231] MICHEL, H. ; GÖRITZ, D. ; RÖSSLING, G. ; TACK, J.W. *Verfahren zur Herstellung wässriger Mischmicelllösungen*. Schering AG: Patent - Offenlegungsschrift DE 3903753. 1990
- [232] MICHEL, H. ; GÖRITZ, D. ; RÖSSLING, G. ; TACK, J.W. *Process for producing aqueous mixed micelle solutions*. Schering AG: Patent - Offenlegungsschrift WO 9008534. 1990
- [233] MURANISHI, S.: Modification of intestinal absorption of drugs by lipoidal adjuvans. In: *Pharm. Res.* 2 (1985), S. 108–118

- [234] VAN HOOGDALEM, E.J. ; DE BOER, A.G. ; BREIMER, D.D.: Intestinal drug absorption enhancement: an overview. In: *Pharm. Ther.* 44 (1989), S. 407–443
- [235] SCHREIER, S. ; MALHEIROS, S.V.P. ; DE PAULA, E.: Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000), S. 210–234
- [236] ALKAN-ONYUKSEL, H. ; RAMAKRISHNAN, S. ; CHAI, H.B. ; PEZZUTO, J.M.: A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of taxol. In: *Pharm. Res.* 11 (1994), S. 206–212
- [237] ALKAN-ONYUKSEL, H. ; SON, K.: Mixed micelles as proliposomes for the solubilization of teniposide. In: *Pharm. Res.* 9 (1992), S. 1556–1562
- [238] LI, C.Y. ; ZIMMERMANN, C.L. ; WIEDMANN, T.S.: Diffusivity of bile salt phospholipid aggregates in mucin. In: *Pharm. Res.* 13 (1996), S. 535–541
- [239] HAMMAD, M.A. ; MÜLLER, B.W.: Factors affecting solubility and stability of indomethacin in mixed micelles. In: *Pharmazie* 53 (1998), S. 790–794
- [240] HAMMAD, M.A. ; MÜLLER, B.W.: Solubility and stability of clonazepam in mixed micelles. In: *Int. J. Pharm.* 169 (1998), S. 55–64
- [241] HAMMAD, M.A. ; MÜLLER, B.W.: Solubility and stability of lorazepam in bile salt/soya phosphatidylcholine-mixed micelles. In: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999), S. 409–417
- [242] DE CASTRO, B. ; GAMEIRO, P. ; GUIMARAES, C. ; LIMA, J.L.F.C. ; REIS, S.: Study of partition of nitrazepam in bile salt micelles and the role of lecithin. In: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001), S. 595–602
- [243] DE CASTRO, B. ; GAMEIRO, P. ; GUIMARAES, C. ; LIMA, J.L.F.C. ; REIS, S.: Partition coefficients of β -blockers in bile salt/lecithin micelles as a tool to assess the role of mixed micelles in gastrointestinal absorption. In: *Biophys. Chem.* 90 (2001), S. 31–43
- [244] GUENTERT, T.W. ; OIE, S. ; PAALZOW, L. ; FREY, B.M. ; BRANDT, R. ; AARONS, L.J. ; ROWLAND, M.: Interaction of mixed micelles formed from glycocholic acid and lecithin with the protein binding of various drugs. In: *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 23 (1987), S. 569–577
- [245] BRAJTBURG, J. ; ELBERG, S. ; KOBAYASHI, G.S. ; BOLARD, J.: Amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles: molecular and cellular aspects relevant to therapeutic efficacy in experimental mycoses. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994), S. 300–306
- [246] DANGI, J.S. ; VYAS, S.P. ; VIXIT, V.K.: Effect of various lipid bile salt mixed micelles in the intestinal absorption of Amphotericin B in rat. In: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998), S. 631–635
- [247] HÖRTER, D. ; DRESSMAN, J.B.: Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25 (1997), S. 3–14
- [248] DÜRR, M. ; HAGER, J. ; LÖHR, J.P.: Investigations on mixed micelle and liposome preparations for parenteral use based on soya phosphatidylcholine. In: *Eur. J. Pharm. Sci.* 40 (1994), S. 147–159
- [249] DANZINGER, R.G. ; HOFMANN, A.F. ; SCHOENFIELD, L.J. ; THISTLE, J.L.: Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. In: *N. Engl. J. Med.* 286 (1972), S. 1–8
- [250] MAKINO, I. ; SHINOZAKI, K. ; YOSHINO, K. ; NAKAGAWA, S.: Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. In: *Jap. J. Gastroenterol.* 72 (1978), S. 690–702
- [251] *ROTE LISTE 2002 - Arzneimittelverzeichnis*. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie (BPI) u. Verband Forschender Arzneimittelhersteller (VFA); ECV - Aulendorf, 2002
- [252] NAKADA, Y. ; AWATA, N. ; IKUTA, Y. ; GOTO, S.: The effect of bile salts on the oral mucosal absorption of human calcitonin in rats. In: *J. Pharmacobio-Dyn.* 12 (1989), S. 736–743
- [253] GORDON, G.S. ; MOSES, A.C. ; SILVER, R.D. ; FLIES, J.S. ; CAREY, M.C.: Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), S. 7419–7423

- [254] BALDWIN, P.A. ; KLINGBEIL, C.K. ; GRIMM, C.J. ; LONGENECKER, J.P.: The effect of sodium tauro-24,25-dihydrofusidate on the nasal absorption of human growth hormone in three animal models. In: *Pharm. Res.* 7 (1990), S. 547–552
- [255] MØLLER, J.V. ; LE MAIRE, M. ; ANDERSEN, J.P.: Use of non-ionic and bile salt detergents in the study of membrane proteins. In: WATTS, A. (Hrsg.): *Progress in Protein-Lipid Interactions* Bd. 2. Elsevier - Amsterdam, 1986, S. 147–196
- [256] CONRAD, H. ; DOSE, K. ; NAWROTH, T.: Neutron small angle scattering of micelles from detergents suitable for the solubilization of native membrane proteins. In: *Physica B* 156-157 (1989), S. 474–476
- [257] BANERJEE, P. ; JOO, J.B. ; BUSE, J.T. ; DAWSON, G.: Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. In: *Chem. Phys. Lipids* 77 (1995), S. 65–78
- [258] SIDHU, A.: A novel affinity purification of D-1 dopamine receptors from rat striatum. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 10065–10072
- [259] STERNWEIS, P.C. ; GILMAN, A.G.: Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase. In: *J. Biol. Chem.* 254 (1979), S. 3333–3340
- [260] SABOUNY, A. ; RITSCHER, W.A. ; ASHRAF, M.: Effect of formulation conditions on size and size distribution of neutral liposomes prepared by detergent dialysis and ultrasonication methods. In: *Pharm. Ind.* 54 (1992), S. 74–78
- [261] COOPER, A.: Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. In: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999), S. 557–563
- [262] WISEMANN, T. ; WILLISTON, S. ; BRANDTS, J.F. ; LIN, L.N.: Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. In: *Anal. Biochem.* 179 (1989), S. 131–137
- [263] COOPER, A. ; JOHNSON, C.M.: Introduction to microcalorimetry and biomolecular energetics. In: JONES, C. (Hrsg.) ; MULLOY, B. (Hrsg.) ; THOMAS, A.H. (Hrsg.): *Methods in Molecular Biology* Bd. 22. Marcel Dekker - New York, 1994, Kapitel 9, S. 109–124
- [264] DOYLE, M.L.: Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997)
- [265] CHELLANI, M.: Isothermal titration calorimetry: biological applications. In: *Am. Biotechnol. Lab.* 17 (1999), S. 14–18
- [266] REHM, H.: Ultrasensitive Isotherme Titrations-Kalorimetrie. In: *Laborjournal* 4 (2000), S. 25
- [267] BRANDTS, J.F. ; LIN, L.N. ; WISEMANN, T. ; WILLISTON, S. ; YANG, C.P.: An instrument for rapid determination of binding constants for biomolecules. In: *Am. Lab.* 22 (1990), S. 30–41
- [268] WADSÖ, I.: Isothermal microcalorimetry for the characterization of interactions between drugs and biological materials. In: *Thermochim. Acta* 267 (1995), S. 45–59
- [269] JELESAROV, I. ; BOSSHARD, H.R.: Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. In: *J. Mol. Recogn.* 12 (1999), S. 3–18
- [270] FREIRE, E. ; MAYORGA, O.L. ; STRAUME, M.: Isothermal titration calorimetry. In: *Anal. Chem.* 62 (1990), S. 950A–959A
- [271] LADBURY, J.E. ; CHOWDHRY, B.Z.: Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. In: *Chem. Biol.* 3 (1996), S. 791–801
- [272] TAME, J.R.H. ; O'BRIEN, R. ; LADBURY, J.E.: Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In: LADBURY, J.E. (Hrsg.) ; CHOWDHRY, B.Z. (Hrsg.): *Biocalorimetry - Application of Calorimetry in the Biological Science*. Wiley - New York, 1998, Kapitel 2, S. 27–38

- [273] WEDLER, G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 3. Aufl. VCH - Weinheim, 1987
- [274] ATKINS, P.W.: *Physikalische Chemie*. 1. Aufl. VCH - Weinheim, 1990
- [275] LICHTENBERG, D. ; OPATOWSKI, E. ; KOZLOV, M.M.: Heat evolution of the self-assembly of amphiphiles in aqueous solutions. In: GARTI, N. (Hrsg.): *Thermal Behavior of Dispersed Systems*. Marcel Dekker - New York, 2001, S. 295–334
- [276] LEHARNE, S.A. ; CHOWDHRY, B.Z.: Thermodynamic background to differential scanning calorimetry. In: LADBURY, J.E. (Hrsg.) ; CHOWDHRY, B.Z. (Hrsg.): *Biocalorimetry - Application of Calorimetry in the Biological Science*. Wiley - New York, 1998, Kapitel 12, S. 157–182
- [277] BURGER, A.: DTA und DSC: Grundlagen, Methodik und Anwendung. In: *Pharmazie u. Z.* 6 (1982), S. 177–189
- [278] COOPER, A. ; JOHNSON, C.M.: Differential scanning calorimetry. In: JONES, C. (Hrsg.) ; MULLOY, B. (Hrsg.) ; THOMAS, A.H. (Hrsg.): *Methods in Molecular Biology* Bd. 22. Marcel Dekker - New York, 1994, Kapitel 10, S. 125–136
- [279] BLANDAMER, M.J. ; CULLIS, P.M. ; ENGBERTS, J.B.F.N.: Differential scanning and titration calorimetric studies of macromolecules in aqueous solution. In: *J. Therm. Anal.* 45 (1995), S. 599–613
- [280] BLANDAMER, M.J. ; CULLIS, P.M. ; ENGBERTS, J.B.F.N.: Calorimetric studies of macromolecular aqueous solutions. In: *Pure Appl. Chem.* 68 (1996), S. 1577–1582
- [281] REMMELE, R.L. ; GOMBOTZ, W.R.: Differential scanning calorimetry - a practical tool for evaluating stability of liquid biopharmaceuticals. In: *Biopharm Europe* (2000)
- [282] BLUME, A.: Applications of calorimetry to lipid model membranes. In: HIDALGO, C. (Hrsg.): *Physical Properties of Biological Membranes and their Functional Implications*. Plenum Press - New York, 1988, Kapitel 3, S. 71–121
- [283] BERNE, B.J. ; PECORA, R.: *Dynamic Light Scattering with Application to Chemistry, Biology, and Physics*. Kieker - Malabar, 1990
- [284] CHU, B.: *Laser Light Scattering*. Academic Press - New York, 1974
- [285] BROWN, W.: *Dynamic Light Scattering*. Clarendon Press - Oxford, 1993
- [286] HOLZBACH, R.T. ; OH, S.Y. ; MCDONNELL, M.E. ; JAMIESON, A.M.: Quasielastic laser spectroscopy studies of pure bile salt and bile salt-mixed lipid micellar systems. In: MITTAL, K.L. (Hrsg.): *Micellization, Solubilization, Microemulsions* Bd. 1. Plenum Press - New York, 1977, S. 403–418
- [287] KOTLARCHYK, M. ; CHEN, S.H.: Analysis of small angle neutron scattering spectra from poly-disperse interacting colloids. In: *J. Chem. Phys.* 79 (1983), S. 2461–2469
- [288] JANICH, M.: *Licht- und Neutronenstreuungsexperimente an Gallensalzmicellen*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 1998
- [289] KUCHINKA, E. ; SEELIG, J.: Interaction of mellitin with phosphatidylcholine membranes. Binding isotherm and lipid head-group conformation. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 4216–4221
- [290] NAGLE, J.F. ; PETRACHE, R. Z. ; TRISTAM-NAGLE, S. ; SUN, W. ; PETRACHE, H.I. ; SUTER, R.M.: X-ray structure determination of fully hydrated L_{α} -phase DPPC bilayers. In: *Biophys. J.* 70 (1996), S. 1419–1431
- [291] GÖNI, F.M. ; ALONSO, A.: Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000), S. 51–68
- [292] KELLER, M. ; KERTH, A. ; BLUME, A.: Thermodynamics of interaction of octyl glucoside with phosphatidylcholine vesicles: partitioning and solubilization as studied by high sensitivity titration calorimetry. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1326 (1997), S. 178–192
- [293] DÖRFLER, H.D.: *Grenzflächen- und Kolloidchemie*. VCH - Weinheim, 1994

- [294] BLANDAMER, M.J. ; CULLIS, P.M. ; ENGBERTS, J.B.F.N.: Titration microcalorimetry. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 94* (1998), S. 2261–2267
- [295] HUANG, C. ; LI, S.: Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1422 (1999), S. 273–307
- [296] OLLILA, F. ; SLOTTE, J.P.: A thermodynamic study of bile salt interactions with phosphatidylcholine and sphingomyelin unilamellar vesicles. In: *Langmuir* 17 (2001), S. 2835–2840
- [297] HILDEBRAND, A. ; BEYER, K. ; NEUBERT, R. ; GARIDEL, P. ; BLUME, A.: Interactions of physiological detergents with fluid biomembranes. In: *Colloids Surf. B* (in Vorbereitung)
- [298] KELLER, M.: *Thermodynamik der Demizellisierung und Solubilisierung von Alkylglucosiden mit ausgewählten Phospholipiden sowie das rheologische Verhalten am Beispiel Octylglucosid/Dimyristoylphosphatidylglyzerol*, Universität Kaiserslautern, Diss., 2001
- [299] WENK, M.R. ; ALT, T. ; SEELIG, A. ; SEELIG, J.: Octyl- β -D-glucopyranoside partitioning into lipid bilayers: Thermodynamics of binding and structural changes of the bilayer. In: *Biophys. J.* 72 (1997), S. 1719–1731
- [300] WENK, M.R. ; SEELIG, J.: Interaction of octyl- β -thioglucopyranoside with lipid membranes. In: *Biophys. J.* 73 (1997), S. 2565–2574
- [301] SMALLWOOD, R.A. ; RESTALL, C.J. ; CHAPMAN, D.: Bile salt-lipid interactions: the effect of NaTC on the permeability of lipid bilayers to water and urea. In: *Falk Sympos.* 29 (1981), S. 171–180
- [302] HEERKLOTZ, H.H. ; LANTZSCH, G. ; BINDER, H. ; KLOSE, G. ; BLUME, A.: Thermodynamic characterization of dilute aqueous lipid/detergent mixtures of POPC and C₁₂EO₈ by means of isothermal titration calorimetry. In: *J. Phys. Chem.* 100 (1996), S. 6764–6774
- [303] HEERKLOTZ, H. ; BINDER, H.: Isothermal titration calorimetry on aqueous lipid/detergent dispersion - an experimental approach to the thermodynamics of multiphase systems. In: *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* 1 (1997), S. 221–240
- [304] HEERKLOTZ, H.H. ; BINDER, H. ; LANTZSCH, G. ; KLOSE, G. ; BLUME, A.: Lipid/detergent interaction thermodynamics as a function of molecular shape. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 639–645
- [305] SAITO, H. ; SUGIMOTO, Y. ; TABETA, R. ; SUZUKI, S. ; IZUMI, G. ; KODAMA, M. ; TOYOSHIMA, S. ; NAGATA, C.: Incorporation of bile acid of low concentration into model and biological membranes studied by ²H and ³¹P-NMR. In: *J. Biochem.* 94 (1983), S. 1877–1887
- [306] HEERKLOTZ, H. ; SEELIG, J.: Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000), S. 69–85
- [307] EDWARDS, K. ; ALMGREN, M.: Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles. In: *Prog. Colloid Poly. Sci.* 82 (1990), S. 190–197
- [308] KOZLOV, M. ; OPATOWSKI, E. ; LICHTENBERG, D.: Calorimetric studies of the interactions between micelle-forming and bilayer-forming amphiphiles. In: *J. Therm. Anal.* 51 (1998), S. 173–189
- [309] WENK, M.R. ; SEELIG, J.: Vesicle-micelle transformation of phosphatidylcholine/octyl- β -D-glucopyranoside mixtures as detected with titration calorimetry. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 5224–5231
- [310] HEERKLOTZ, H. ; SEELIG, J.: Correlation of the membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. In: *Biophys. J.* 78 (2000), S. 2435–2440
- [311] ROTH, Y. ; OPATOWSKI, E. ; LICHTENBERG, D. ; KOZLOV, M.M.: Phase behavior of dilute aqueous solutions of lipid-surfactant mixtures: effects of finite size of micelles. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 2052–2061
- [312] HILDEBRAND, A. ; NEUBERT, R. ; GARIDEL, P. ; BLUME, A.: Bile salt induced solubilization of synthetic phosphatidylcholine vesicles studied by isothermal titration calorimetry. In: *Langmuir* 18 (2002), S. 2836–2847

- [313] OPATOWSKI, E. ; KOZLOV, M.M. ; LICHTENBERG, D.: Partitioning of octyl glucoside between octyl glucoside/phosphatidylcholine mixed aggregates and aqueous media as studied by isothermal titration calorimetry. In: *Biophys. J.* 73 (1997), S. 1448–1457
- [314] MEYUHAS, D. ; BOR, A. ; PINCHUK, I. ; KAPLUN, A. ; TALMON, Y. ; KOZLOV, M.M. ; LICHTENBERG, D.: Effect of ionic strength on the self-assembly in mixtures of phosphatidylcholine and sodium cholate. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 188 (1997), S. 351–362
- [315] PATERNOSTRE, M.T. ; ROUX, M. ; RIGAUD, J.L.: Mechanism of membrane protein insertion into liposomes during reconstruction procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 2668–2677
- [316] LICHTENBERG, D. ; ZILBERMAN, Y.: Surface curvature and mobility in phospholipid bilayers. NMR studies of lecithin-deoxycholate mixed micelles. In: *J. Magn. Res.* 34 (1979), S. 491–497
- [317] ELORZA, M.A. ; ELORZA, B. ; CHANTRES, J.R.: Stability of liposomal formulations: action of amphiphilic molecules. In: *Int. J. Pharm.* 158 (1997), S. 173–183
- [318] ZITA, F.: *Effect of surfactants on the thermodynamic and kinetic properties of liposome emulsions*, Babes-Bolyai University of Cluj-Napoca, Diss., 2000
- [319] HEERKLOTZ, H.H. ; LANTZSCH, G. ; BINDER, H. ; KLOSE, G. ; BLUME, A.: Application of isothermal titration calorimetry for detecting lipid membrane solubilization. In: *Chem. Phys. Lett.* 235 (1995), S. 517–520
- [320] HEERKLOTZ, H.: Thermodynamics of hydrophobic and steric lipid/additive interactions. In: LADBURY, J.E. (Hrsg.) ; CHOWDHRY, B.Z. (Hrsg.): *BioCalorimetry - Application of Calorimetry in the Biological Science*. Wiley - New York, 1998, Kapitel 6, S. 89–100
- [321] SCHÜRHOLZ, T.: Critical dependence of the solubilization of lipid vesicles by the detergent CHAPS on the lipid composition. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor into preformed vesicles above the critical micellization concentration. In: *Biophys. Chem.* 58 (1996), S. 87–96
- [322] VIARD, M. ; CHAMPAGNE, N. ; OLLIVON, M. ; PATERNOSTRE, M.: Solubilization of artificial and natural biological membranes. In: *S.T.P. Pharm. Sci.* 11 (2001), S. 317–329
- [323] MAZER, N.A. ; BENEDEK, G.B. ; CAREY, M.C.: Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. In: *Biochemistry* 19 (1980), S. 601–615
- [324] SCHURTENBERGER, P. ; MAZER, N.A. ; KÄNZIG, W.: Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salt and lecithin. In: *J. Phys. Chem.* 89 (1985), S. 1042–1049
- [325] JANICH, M. ; KISELEV, M.A. ; HILDEBRAND, A. ; NEUBERT, R. ; STRUNZ, P.: Structure of phosphatidylcholine/sodium deoxycholate supramolecular aggregates as a function of lipid/detergent ratio; SANS and DLS study. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* (in Vorbereitung)
- [326] BALGAVY, P. ; DUBNICKOVA, M. ; UHRIKOVA, D. ; YARADAIKIN, S. ; KISELEV, M. ; GORDELIY, V.: Bilayer thickness in unilamellar extruded egg yolk phosphatidylcholine liposomes: A small-angle neutron scattering study. In: *Acta Phys. Slovaca* 48 (1998), S. 509–533
- [327] KOPPEL, D.E.: Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. In: *J. Phys. Chem.* 57 (1972), S. 4814–4820
- [328] DACHS, H.: *Neutron Diffraction*. Springer - Berlin, 1978
- [329] GORDELIY, V.I. ; GOLUBCHIKOVA, L.V. ; KUKLIN, A. ; SYRYKH, A.G. ; WATTS, A.: The study of single biological and model membranes via small-angle neutron scattering. In: *Progr. Colloid Polym. Sci.* 93 (1993), S. 252–256
- [330] EGELHAAF, S.U. ; SCHURTENBERGER, P.: The micelle-to-vesicle transition as observed by time-resolved scattering experiments. In: *Prog. Colloid Poly. Sci.* 104 (1997), S. 152–154

- [331] EGELHAAF, S.U. ; SCHURTENBERGER, P.: A time-resolved small angle neutron scattering study of the micelle-to-vesicle transition. In: *Physica B* 234-236 (1997), S. 276–278
- [332] EGELHAAF, S.U. ; OLSSON, U. ; SCHURTENBERGER, P.: Time-resolved SANS for surfactant phase transitions. In: *Physica B* 276-278 (2000), S. 326–329
- [333] TOMOAI COTISEL, M. ; LEVIN, I.W.: Thermodynamic study of the effects of ursodeoxycholic acid and ursodeoxycholate on aqueous dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer dispersions. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 8477–8485
- [334] POLOZOVA, A.I. ; DUBACHEV, G.E. ; SIMONOVA, T.N. ; BARSUKOV, L.I.: Temperature-induced micellar-lamellar transformation in binary mixtures of saturated phosphatidylcholines with sodium cholate. In: *FEBS Lett.* 358 (1995), S. 17–22
- [335] FORTE, L. ; ANDRIEUX, K. ; KELLER, G. ; GABRIELLE-MADELMONT, C. ; LESIEUR, S. ; PATERNOSTRE, M. ; OLLIVON, M. ; BOURGAUX, C. ; LESIEUR, P.: Sodium taurocholate-induced lamellar-micellar phase transitions of DPPC determined by DSC and X-ray diffraction. In: *J. Therm. Anal.* 51 (1998), S. 773–782
- [336] MÜLLER, K.: Structural aspects of bile salt-lecithin mixed micelles. In: *Hepatology* 4 (1984), S. 134S–137S
- [337] SPINK, C.H. ; MÜLLER, K. ; STURTEVANT, J.M.: Precision scanning calorimetry of bile salt-phosphatidylcholine micelles. In: *Biochemistry* 21 (1982), S. 6598–6605
- [338] SPINK, C.H. ; LIETO, V. ; MEREAND, E. ; PRUDEN, C.: Micelle-vesicle transition in phospholipid-bile salt mixtures. A study by precision scanning calorimetry. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 5104–5112
- [339] BAYERL, T.M. ; WERNER, G.D. ; SACKMANN, E.: Solubilization of DMPC and DPPC vesicles by detergents below their critical micellization concentration: high-sensitivity differential scanning calorimetry, Fourier transformed infrared spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy reveal two interaction sites of detergents in vesicles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 984 (1989), S. 214–224
- [340] BLUME, A.: Phospholipid - ligand interactions. In: LADBURY, J.E. (Hrsg.) ; CHOWDHRY, B.Z. (Hrsg.): *Biocalorimetry - Application of Calorimetry in the Biological Science*. Wiley - New York, 1998, Kapitel 5, S. 77–88
- [341] LOHNER, K. ; LATAL, A. ; DEGOVICS, G. ; GARIDEL, P.: Packing characteristics of a model system mimicking cytoplasmic bacterial membranes. In: *Chem. Phys. Lipids* 111 (2001), S. 177–192
- [342] HAUSER, H. ; GAINS, N. ; LASIC, D.D.: The spontaneous formation of unilamellar lipid vesicles: a fundamental property of the phase behaviour of charged lipids. In: DEGIORGIO, V. (Hrsg.) ; CORTI, M. (Hrsg.): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions* Bd. 90, 1985, S. 648–662
- [343] DA GRACA MIGUEL, M. ; EIDELMAN, O. ; OLLIVON, M. ; WALTER, A.: Temperature dependence of the vesicle-micelle transition off egg PC and octyl glucoside. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 8921–8928
- [344] EGELHAAF, S.U. ; MÜLLER, M. ; SCHURTENBERGER, P.: Spontaneous vesiculation: Mixed lecithin-bile salt solutions as biologically relevant model systems. In: *Prog. Colloid Poly. Sci.* 97 (1994), S. 267–270
- [345] KAMENKA, N. ; EL ARMANI, M. ; APPELL, J. ; LINDHEIMER, M.: Mixed micelle-to-vesicle transition in aqueous nonionic phospholipid systems. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 143 (1991), S. 463–471
- [346] MEYUHAS, D. ; LICHTENBERG, D.: Effect of water-soluble polymers on the stage of aggregation, vesicle size and phase transformations in mixtures of PC and sodium cholate. In: *Biophys. J.* 71 (1996), S. 2613–2622
- [347] MEMOLI, A. ; PALERMITI, L.G. ; TRAVAGLI, V. ; ALHAIQUE, F.: Egg and soya phospholipids - sonication and dialysis: a study on liposome characterization. In: *Int. J. Pharm.* 117 (1995), S. 159–163

- [348] SCHÖLMEIRICH, J. ; BECHER, M.S. ; SCHMIDT, K. ; SCHUBERT, R. ; KREMER, B. ; FELDHAUS, S. ; GEROK, W.: Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties - studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. In: *Hepatology* 4 (1984), S. 661–666
- [349] NARAIN, P.K. ; DEMARIA, E.J. ; HEUMANN, D.M.: Lecithin protects against plasma membrane disruption by bile salts. In: *J. Surg. Res.* 78 (1998), S. 131–136
- [350] MOSCHETTA, A. ; VAN BERGE-HENEGOUWEN, G.P. ; PORTINCASA, P. ; RENOUIJ, W. ; GROEN, A.K. ; VAN ERPECUM, K.J.: Hydrophilic bile salts enhance differential distribution of sphingomyelin and phosphatidylcholine between micellar and vesicular phases: potential implications for their effects in vivo. In: *J. Hepatol.* 34 (2001), S. 492–499
- [351] FALK, M.: *Messung der Permeation von Gallensäuren durch Liposomenmembranen und der gallensäureinduzierten Membrandefekte mittels Pyranin als pH-Fluoreszenzindikator*, Albert-Ludwigs-Universität, Diss., 1999
- [352] DE LA MAZA, A. ; PARRA, J.L.: Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant dodecylmaltoside in phosphatidylcholine liposomes. In: *Biophys. J.* 72 (1997), S. 1668–1675
- [353] KRESHECK, G.C. ; HARGRAVES, W.A.: Thermometric titration studies of the effect of head group, chain length, solvent, and temperature on the thermodynamics of micelle formation. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 48 (1974), S. 481–493
- [354] NUSSELDER, J.J.H. ; ENGBERTS, J.B.F.N.: Towards a better understanding of the driving force for micelle formation and micellar growth. In: *J. Colloid Interf. Sci.* 148 (1992), S. 353–361
- [355] TAMAMUSHI, B. ; SHIRAI, M. ; TAMAKI, K.: Micellar solutions of sodium oleate and elaidate. In: *Bull. Chem. Soc. Japan* 31 (1958), S. 467–472. – Abstract
- [356] DROBOSYUK, V.M. ; KRYLATOV, M.R. ; YU, A. ; TALMUD, S.L.: Dispersing power of resin and fatty acids. In: *Zh. Prikl. Khim.* 55 (1982), S. 2105–2107. – Abstract
- [357] AKHTER, M.S.: Effect of acetamide on the critical micelle concentration of aqueous solutions of some surfactants. In: *Colloids Surf. A* 121 (1997), S. 103–109
- [358] MAHIEU, N. ; CANET, D. ; CASES, J.M. ; BOUBEL, J.C.: Micellization of sodium oleate in D₂O as probed by proton longitudinal magnetic relaxation and self-diffusion measurements. In: *J. Phys. Chem.* 95 (1991), S. 1844–1846
- [359] ZIMMELS, Y. ; LIN, I.J.: Stepwise association properties of some surfactant aqueous solutions. In: *Colloid Polym. Sci.* 252 (1974), S. 594–612
- [360] CISTOLA, D.P. ; HAMILTON, J.A. ; JACKSON, D. ; SMALL, D.M.: Ionization and phase behavior of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 1881–1888
- [361] JOHNSON, I. ; OLOFSSON, G. ; JÖNSSON, B.: Micelle formation of ionic amphiphiles. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 83 (1987), S. 3331–3344
- [362] MAJHI, P.R. ; BLUME, A.: Thermodynamic characterization of temperature-induced micellization and demicellization of detergents studied by differential scanning calorimetry. In: *Langmuir* 17 (2001), S. 3844–3851
- [363] JOLICEUR, C. ; PHILIP, R.R.: Enthalpy-entropy compensation for micellization and other hydrophobic interactions in aqueous solutions. In: *Can. J. Chem.* 52 (1974), S. 1834–1839
- [364] MARCUS, Y.: A simple empirical model describing the thermodynamics of hydration of ions of widely varying charges, sizes, and shapes. In: *Biophys. Chem.* 51 (1994), S. 111–127
- [365] LIU, C.L.: Interactions and molecular weights of simple micelles and mixed micelles in taurocholate and taurocholate-lecithin solutions. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 7055–7059
- [366] JANICH, M. ; LANGE, J. ; GRAENER, H. ; NEUBERT, R.: Extended light scattering investigations on dihydroxy bile salt micelles in low-salt aqueous solutions. In: *J. Phys. Chem.* 102 (1998), S. 5957–5962

- [367] OH, S.Y. ; McDONNELL, M.E. ; HOLZBACH, R.T. ; JAMIESON, A.M.: Diffusion coefficients of single bile salt and bile salt mixed lipid micelles in aqueous solution measured by quasielastic laser light scattering. In: *Biochim. Biophys. Acta* 488 (1977), S. 25–35
- [368] OEDBERG, L. ; FORSBERG, S. ; MCBRIDE, G. ; PERSSON, M. ; STENIUS, P. ; STROEM, G.: Surfactant behavior of wood resin components. Part 2. Solubilization in micelles of rosin and fatty acids. In: *Sven. Papperstidn.* 88 (1985), S. R118–R125. – Abstract
- [369] KAIBARA, K. ; IWATA, E. ; EGUCHI, Y. ; SUZUKI, M. ; MAEDA, H.: Dispersion behavior of oleic acid in aqueous media: from micelles to emulsions. In: *Colloid Polym. Sci.* 275 (1997), S. 777–783
- [370] REISS-HUSSON, F. ; LUZZATI, V.: The structure of the micellar solutions of some amphiphilic compounds in pure water as determined by absolute small-angle X-ray scattering techniques. In: *J. Phys. Chem.* 68 (1964), S. 3504–3511
- [371] TERUI, G.: Photon correlation spectroscopy in micellar solutions of sodium and potassium oleate. In: *Phys. Lett. A* 120 (1987), S. 89–94
- [372] BENZONANA, G: Study of bile salts micelles: Properties of mixed oleate-deoxycholate solutions at pH 9,0. In: *Biochim. Biophys. Acta* 176 (1969), S. 836–848
- [373] LANGE, H. ; BECK, K.H.: Zur Mizellbildung in Mischlösungen homologer und nichthomologer Tenside. In: *Kolloid Z. Z. Polym.* 251 (1973), S. 424–431
- [374] CLINT, J.H.: Micellization of mixed nonionic surface active agents. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 71 (1975), S. 1327–1334
- [375] RUBINGH, D.N.: Mixed micelle solutions. In: MITTAL, K.L. (Hrsg.): *Solution Chemistry of Surfactants* Bd. 1. Plenum Press - New York, 1979, S. 337–354
- [376] HOLLAND, P.M. ; RUBINGH, D.N.: Nonideal multicomponent mixed micelle model. In: *J. Phys. Chem.* 87 (1983), S. 1984–1990
- [377] JANA, P.K. ; MOULIK, S.P.: Interaction of bile salts with hexadecyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate. In: *J. Phys. Chem.* 95 (1991), S. 9525–9532
- [378] HAQUE, M.E. ; DAS, A.R. ; RAKSHIT, A.K. ; MOULIK, S.P.: Properties of mixed micelles of binary surfactant combinations. In: *Langmuir* 12 (1996), S. 4084–4089
- [379] HAQUE, M.E. ; DAS, A.R. ; MOULIK, S.P.: Mixed micelles of sodium deoxycholate and polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80). In: *J. Colloid Interf. Sci.* 217 (1999), S. 1–7
- [380] CORET, J. ; SHILOACH, A. ; BERGER, P. ; BLANKSCHTEIN, D.: Critical micelle concentrations of ternary surfactant mixtures: theoretical prediction with user-friendly computer programs and experimental design analysis. In: *J. Surfact. Det.* 2 (1999), S. 51–58
- [381] HJELM, R.P. ; SCHTEINTGART, C.D. ; HOFMANN, A.F. ; THIYAGARAJAN, P.: Structure of conjugated bile salt - fatty acid - monoglyceride mixed colloids: studies by small-angle neutron scattering. In: *J. Phys. Chem.* 104 (2000), S. 197–211
- [382] MADELMONT, C. ; PERRON, R.: Study of the influence of the chain length on some aspects of soap/water diagrams. In: *Colloid Polym. Sci.* 254 (1976), S. 581–595
- [383] CAMERON, D.G. ; UMEMURA, J. ; WONG, P.T.T. ; MANTSCH, H.H.: A Fourier transformed infrared study of the coagel to micelle transitions of sodium laurate and sodium oleate. In: *Colloids Surf.* 4 (1982), S. 131–145
- [384] DE MUL, M.N.G. ; DAVIS, H.T. ; EVANS, D.F. ; BHAVE, A.V. ; WAGNER, J.R.: Solution phase behavior and solid phase structure of long-chain sodium soap mixtures. In: *Langmuir* 16 (2000), S. 8276–8284
- [385] LICHTENBERG, D. ; WERKER, E. ; BOR, A. ; ALMOG, S. ; NIR, S.: Precipitation of calcium palmitate from bile salt-containing dispersions. In: *Chem. Phys. Lipids* 48 (1988), S. 231–243
- [386] SALLEE, V.L.: Apparent monomer activity of saturated fatty acids in micellar bile salt solutions measured by a polyethylene partitioning system. In: *J. Lipid Res.* 15 (1974), S. 56–64

- [387] SMITH, A. ; LOUGH, A.K.: Micellar solubilization of fatty acids in aqueous media containing bile salts and phospholipids. In: *Brit. J. Nutr.* 35 (1976), S. 77–88
- [388] LOUGH, A.K. ; SMITH, A.: Influence of the products of phospholipolysis of phosphatidylcholine on micellar solubilization of fatty acids in the presence of bile salts. In: *Brit. J. Nutr.* 35 (1976), S. 89–96
- [389] FERNANDEZ, M.S. ; M.T.GONZALEZ-MARTINEZ ; CALDERON, E.: The effect of pH on the phase transition temperature of dipalmitoylphosphatidylcholine-palmitic acid liposomes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 863 (1986), S. 156–164
- [390] SCHWARZ, M.A. ; RAITH, K. ; NEUBERT, R.H.H.: Characterization of micelles by capillary electrophoresis. In: *Electrophoresis* 19 (1998), S. 2145–2150
- [391] SCHWARZ, M.A. ; RAITH, K. ; DONGOWSKI, G. ; NEUBERT, R.H.H.: The effect on the partition equilibrium of various drugs by the formation of mixed bile salt/phosphatidylcholine/fatty acid micelles. A characterization by micellar affinity capillary electrophoresis (MACE). Part IV. In: *J. Chromatogr. A* 809- (1998), S. 219–229
- [392] SCHWARZ, M.A.: *Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen und Gallensalzmizellen mittels mizellarer elektrokinetischer Affinitätschromatographie (MEAC)*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 1998
- [393] NEUBERT, R.H.H. ; HILDEBRAND, A. ; JANICH, M. ; MRESTANI, Y. ; PLÄTZER, M.: Stabile Physiologische Mischmizellen, eine zukunftssträchtige Arzneiform. In: *Pharm. Ztg.* 44 (2000), S. 11–17
- [394] LIEBAU, M. ; HILDEBRAND, A. ; BENDAS, G. ; ROTHE, U. ; NEUBERT, R.H.H.: Entwicklung eines Bioadhäsionsmodells auf der Basis der Quarzmikrobalance für die Charakterisierung pharmazeutischer Vehikelsysteme, 1. Teil: Einführung und Methoden. In: *Pharm. Ind.* 5 (1999), S. 459–462
- [395] LIEBAU, M. ; HILDEBRAND, A. ; BENDAS, G. ; ROTHE, U. ; NEUBERT, R.H.H.: Entwicklung eines Bioadhäsionsmodells auf der Basis der Quarzmikrobalance für die Charakterisierung pharmazeutischer Vehikelsysteme, 2. Teil: Ergebnisse und Diskussion. In: *Pharm. Ind.* 6 (1999), S. 558–563
- [396] LIEBAU, M. ; HILDEBRAND, A. ; NEUBERT, R.H.H.: Bioadhesion of supramolecular structures at supported planar bilayers as studied by quartz crystal microbalance. In: *Eur. Biophys. J.* 30 (2001), S. 42–52
- [397] HILDEBRAND, A. ; SCHÄDLICH, A. ; ROTHE, U. ; NEUBERT, R.H.H.: Sensing specific adhesion of liposomal and micellar systems with attached carbohydrate recognition structures at lectin surfaces. In: *J. Colloid Interf. Sci.* (im Druck)
- [398] COOPER, A. ; JOHNSON, C.M.: Isothermal titration microcalorimetry. In: JONES, C. (Hrsg.) ; MULLOY, B. (Hrsg.) ; THOMAS, A.H. (Hrsg.): *Methods in Molecular Biology* Bd. 22. Marcel Dekker - New York, 1994, Kapitel 11, S. 137–150
- [399] <http://www.microcalorimetry.com>.
- [400] <http://www.thermometric.com>.
- [401] MicroCal Inc., Northampton, MA, USA: *MicroCal MCS Unit - User's Manual*
- [402] BLANDAMER, M.J.: Thermodynamic background to isothermal titration calorimetry. In: LADBURY, J.E. (Hrsg.) ; CHOWDHRY, B.Z. (Hrsg.): *Biocalorimetry - Application of Calorimetry in the Biological Science*. Wiley - New York, 1998, Kapitel 1, S. 5–25
- [403] BEITZ, W. ; KÜTTNER, K.H.: *Dubbel's Taschenbuch für den Maschinenbau*. 18. Aufl. Springer - Berlin, 1995, S. Z2
- [404] PLOTNIKOV, V.V. ; BRANDTS, J.M. ; LIN, L.N. ; BRANDTS, J.F.: A new ultrasensitive scanning calorimeter. In: *Anal. Biochem.* 250 (1997), S. 237–244
- [405] <http://www.alvgmbh.de>.

- [406] ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, D-Langen: *ALV-NIBS/HPPS High Performance Particle Sizer - Benutzerhandbuch*
- [407] PROVENCHER, S.W.: CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. In: *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982), S. 229–242
- [408] <http://www.hmi.de>.
- [409] KOPKA, H.: *LaTeX Einführung, Band 1*. 2. Aufl. Addison-Wesley - Bonn, 1996
- [410] KOPKA, H.: *LaTeX Ergänzungen - Mit einer Einführung in METAFONT*. 2. Aufl. Addison-Wesley - Bonn, 1997
- [411] GÜNTHER, K. ; ZILM, T.: *Mit LaTeX wissenschaftliche Arbeiten erstellen*. bhv - Kaarst, 1998
- [412] RAICHLE, B. ; NIEPRASCHK, R. ; HAFNER, T.: *Fragen und Antworten (FAQ) über das Textsatzsystem TeX und DANTE, Deutschsprachige Anwendervereinigung TeX e.V.* <http://www.dante.de>, 2001

Zur Anfertigung dieser Arbeit dienten weiterhin die Quellen [409–412].

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Neubert für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der MLU Halle, für seine Betreuung und sein stetiges Interesse sowie für die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Alfred Blume vom Institut für Physikalische Chemie der MLU Halle für die Ermöglichung der Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, seine vielen Beiträge und Anregungen zum Thema, seine fortwährende wissenschaftliche Unterstützung und fachlichen Diskussionen.

Besonders danke ich Herrn Dr. Martin Janich aus der Arbeitsgruppe Optik des Fachbereiches Physik der MLU Halle für die Durchführung und Auswertung der SANS-Experimente und seine stete Diskussionsbereitschaft zur Interpretation der SANS- und DLS-Daten. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Mikael Kiselev vom Institut für Nuklearforschung, Dubna, Russland, für die Erstellung der Modelle zur Berechnung der SANS-Daten.

Bei Herrn Dr. Patrick Garidel, Boehringer-Ingelheim Pharma KG, möchte ich mich ganz herzlich für die vielen wertvollen Ideen sowie seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung trotz weiter Entfernungen bedanken.

Für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Kalorimetriemessungen, auch schon zu sehr früher Stunde, gebührt Frau Bettina Fölting vom Institut für Physikalische Chemie ein ganz großes Dankeschön.

Für die fachlichen Anregungen bei der Erstellung der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Jürgen Lasch vom Institut für Physiologische Chemie der MLU Halle zu Dank verpflichtet.

Ein liebes Dankeschön für die vielen gemeinsamen Arbeitsstunden, wertvollen Diskussionen und ihre ständige Hilfsbereitschaft gilt Frau Apothekerin Konstanze Jahn, Frau Dr. Annett Krause und Frau Dipl.-Pharm. Manuela Plätzer. Frau Dipl.-Pharm. Anita Schädlich und Frau Dipl.-Pharm. Katja Beyer danke ich herzlich für die sehr angenehme Zusammenarbeit während der Zeit ihrer Diplomarbeiten.

Allen Mitgliedern der genannten Institute danke ich für die freundliche Aufnahme und die gute Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, die mir dies alles ermöglicht haben, danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung und Geduld.

Lebenslauf

Name: Annegret Elisabeth Hildebrand
Geburtsdatum: 21.01.1975
Geburtsort: Freiberg/Sa.
Eltern: Prof. Dr.-Ing. habil. Martin Hildebrand, Diplom-Ingenieur
Dr.-Ing. Helga Hildebrand, geb. Wenzlaff, Diplom-Ingenieur
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981 - 1983: POS „Pestalozzi“ in Freiberg/Sa.
1983 - 1991: POS „Clara Zetkin“ in Freiberg/Sa.
1991 - 1993: Gymnasium „Geschwister Scholl“ in Freiberg/Sa.
29.06.1993: Abitur

Berufsausbildung:

1993 - 1997: Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle
09/1995 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/1997 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1997 - 03/1998: Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie u.
Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle
30.07.1998: Diplom
04/1998 - 09/1998: Pharmaziepraktikum in der Park-Apotheke in Freiberg/Sa.
10/1998 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
02.11.1998: Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit:

11/1998 - 04/2002: wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische
Technologie u. Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle
seit 01.05.2002: Laborleiter Pharmazeutische Entwicklung/Analytik bei Viatrix
GmbH & Co. KG in Radebeul

Freiberg/Sa., Mai 2002

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich versichere weiterhin, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Diese Dissertationsschrift habe ich an keiner anderen Hochschule vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Freiberg/Sa., Mai 2002