

Selbstorganisation amphiphiler Block- Copolymere in Mikromischern

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Raphael Thiermann
geboren in Wiesbaden

An der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer.nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Schomäcker

Berichter/Gutachter: Prof. Dr. Michael Gradzielski

Berichter/Gutachter: Prof. Dr. Michael Maskos

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13.02.2014

Berlin 2014

D83

„Jede Lösung eines Problems ist ein neues Problem“

Johann Wolfgang von Goethe
(aus *Unterhaltungen mit Friedrich v. Müller*)

Kurzfassungen

Selbstorganisation amphiphiler Block-Copolymere in Mikromischern

Die Selbstorganisation zweier Systeme amphiphiler Polymere, dem Diblock-Copolymer PB-PEO und dem Triblock-Copolymer PEO-PPO-PEO, wurde in Mikromischern erfolgreich untersucht. Es wurden drei Mikromischer eingesetzt, zwei auf dem interdigitalen Mischprinzip und einer auf dem Split-and-recombine-Prinzip basierend. Die jeweilige Mischerarchitektur wurde auf die Fähigkeit hin untersucht, Polymersomen kontrolliert und kontinuierlich herstellen zu können. Durch Veränderung der Mischbedingungen wie Mischerarchitektur, Flussraten, Flussratenverhältnisse, Konzentration, Temperatur oder Lösungsmittel-beschaffenheit, wurde die Selbstorganisation von PB-PEO gezielt gesteuert. Unterschiedliche Strukturen wie Polymersomen, scheibenartige Mizellen oder sphärische Mizellen wurden mit enger Größenverteilung hergestellt und mittels DLS und (Cryo)-TEM charakterisiert. Daraus ergab sich ein Einblick in den Mechanismus der Selbstorganisation zu Vesikeln. Gleichzeitige Einlagerung hydrophober Partikel wie Quantum Dots (QDs) oder Eisenoxid-Nanopartikel (USPIO-NPs) diente als Modellsystem für kontinuierlich hergestellte multi-funktionelle Polymersomen. Die Darstellung der PB-PEO-Vesikel wurde auf das Pluronic® System L121 erfolgreich übertragen. Eine durch hydrophobe Beladung entstandene Stabilisierung der sonst sehr instabilen Pluronic®-L121 Vesikel wurde erfolgreich nachgewiesen und lieferte kontinuierlich hergestellte biokompatible, multifunktionelle Polymersomen mit niedriger Polydispersität.

Self-assembly of amphiphilic block copolymers in micro mixers

The self-assembly of two different amphiphilic polymer systems, the diblock-PB-PEO and the triblock-copolymer PEO-PPO-PEO, were investigated in micro mixers. Three different micro mixers were used: two based on interdigital mixing and one on split-and-recombine principle. The micro mixers were investigated to ensure a continuous and controlled synthesis of polymersomes. The self-assembly of PB-PEO was controlled by varying the mixing conditions like mixing architecture, flow rate, flow rate ratio, concentration, temperature or solvent properties. Different morphologies like polymersomes, disc-like micelles or spherical micelles were synthesized with a low polydispersity and characterized by DLS and (Cryo)-TEM. This gave an insight into the mechanism of polymersomes' self-assembly. Simultaneous loading of hydrophobic particles like quantum dots (QDs) or iron oxide nanoparticles (USPIO-NPs) was used as a model system for continuously synthesized multifunctional polymersomes. Based on the mixing of PB-PEO, the controlled self-assembly was transferred to the pluronic® L121 system. A stabilization of the instable pluronic®-vesicles by loading of hydrophobic particles was successfully demonstrated and leads to a controlled and continuous synthesis of multifunctional, biocompatible polymersomes with a low polydispersity.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation und Zielsetzung	3
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Grundlagen der Selbstorganisation	5
2.2	Amphiphile Polymersysteme	9
2.2.1	Mechanismus der Selbstorganisation	10
2.2.2	Kinetik der Selbstorganisation	11
2.3	Polybutadien-Polyethylenoxid	15
2.3.1	Strukturbildung von PB-PEO	15
2.3.2	Synthese von PB-PEO	17
2.3.3	Modifikation der Copolymerkette	20
2.4	Pluronic®-L121 Triblockcopolymer	21
2.5	Synthese von Polymersomen	23
2.5.1	Synthese mittels Filmrehydratation	23
2.5.2	Synthese mittels Cosolvent-Methode	24
2.6	Mikromischer	25
2.6.1	Allgemein	25
2.6.2	Synthese in Mikromischern	27
2.6.3	Mikromischer Architekturen	29
2.6.4	Vergleich der verschiedener Architekturen	36
2.7	Beladung von Polymersomen	37
2.7.1	Quantum Dots	38
2.7.2	Super-Paramagnetische Eisenoxidnanopartikel	40
2.7.3	Beladung mittels Mikromischer	41
3	Charakterisierungsmethoden	43
3.1	Transmissionselektronenmikroskopie	43
3.1.1	Cryo-Transmissionselektronenmikroskop (Cryo-TEM)	44
3.2	Lichtstreuung	45
3.2.1	Statische Lichtstreuung (SLS)	45
3.2.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	48
3.2.3	Das ρ -Verhältnis	52
3.3	Sekundärmethoden	53

3.3.1	UV-VIS-Spektroskopie.....	53
3.3.2	IR-Spektroskopie	53
3.3.3	Fluoreszenzspektroskopie	54
4	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	Polymere Nanopartikel durch Selbstorganisation	57
4.1.1	Polymervesikel durch Filmrehydration.....	58
4.1.2	Cosolventverfahren im Batch.....	59
4.2	Vesikelbildung in Mikromischern	61
4.3	PB-PEO Polymersomen.....	67
4.3.1	Selbstorganisation von PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ im Mikromischer.....	67
4.3.2	PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ -OH Vesikel durch Vormischung im Mikromischer.....	74
4.3.3	PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ -COOH im Mikromischer.....	77
4.3.4	PB ₁₆₀ -EO ₆₀ -COOH im Mikromischer	79
4.3.5	Konzentrationsabhängigkeit	82
4.3.6	Temperaturabhängigkeit.....	92
4.3.7	Kontinuierliche hydrophobe Beladung von PB-PEO.....	95
4.4	Pluronic®-L121-Vesikel.....	103
4.4.1	Pluronic®-L121 im Mikromischer.....	103
4.4.2	Kontinuierliche Beladung von Pluronic®	105
4.4.3	Stabilität von Pluronic® Vesikeln	108
4.5	Pluronic® und PB-PEO Vesikel im Vergleich.....	119
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	121
6	Experimenteller Teil.....	127
6.1	Vesikelpräparation	127
6.1.1	Batch	127
6.1.2	Vesikelvernetzung.....	127
6.1.3	Mikromischer	128
6.2	Charakterisierung	131
6.2.1	Elektronenmikroskopie.....	131
6.2.2	Lichtstreuung	131
6.2.3	CMC-Messungen.....	133
7	Anhang.....	135
8	Literatur.....	153

1 Einleitung

Die Nanotechnologie steht seit mehr als 20 Jahren im Fokus der Wissenschaften. Die „National Science Foundation“ in den USA definiert sie als Systeme und Partikel, die in mindestens einer Dimension eine Ausdehnung von 1-100 nm aufweisen. Hier spiegelt sich der allgemeine Trend zur Miniaturisierung in der industriellen Produktion wider, wie etwa in schnelleren Computerchips, effizienteren Batterien, hauchdünnen Beschichtungen oder als Transportvehikel für Arzneien. Schon jetzt sind Nanopartikel aus dem Alltag kaum mehr wegzudenken, denn sie kommen in Oberflächenbeschichtungen, zur Viskositätsoptimierung in Flüssigkeiten (Silika-Nanopartikel) oder als Silbrenano-partikel in Socken und Deodorants vor.[1]

Nanopartikel konnten lange Zeit nicht visualisiert werden. Mit Entwicklung der Elektronenmikroskopie oder der Rasterkraftmikroskopie ließen sich diese Partikel in Bildern darstellen. Damit wuchs der Wunsch diese Partikel gezielt herzustellen und auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen. Sie besitzen, bedingt durch die sehr große Oberfläche im Verhältnis zu ihrer Größe, einzigartige Eigenschaften.

Das Phänomen der Selbstorganisation ist aus vielen biologischen Systemen bekannt, so zum Beispiel die Faltung von Proteinen, die Helixbildung der DNS oder der Aufbau einer Zellmembran als Doppelschicht amphiphiler Phospholipide. Seit der Entdeckung der Selbstorganisation der Lipide zu Vesikeln besteht ein großes Interesse an der Synthese ähnlicher Strukturen.[2]

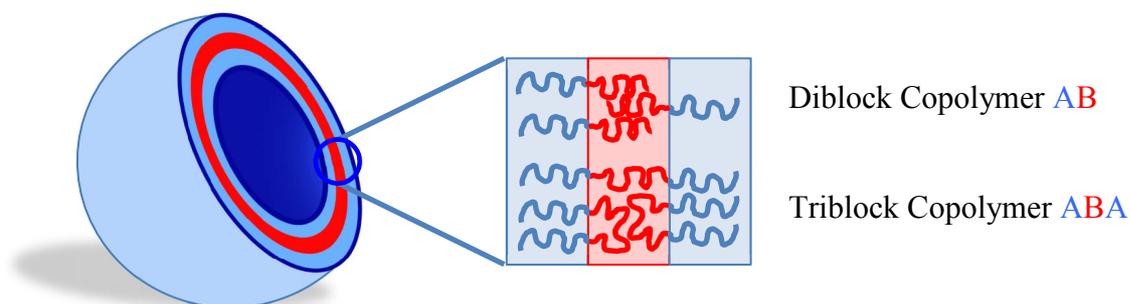


Abb. 1.1: Querschnitt eines Polymersomes und dessen Membran

Amphiphile Blockcopolymer zeigen ebenfalls das Verhalten der Selbstorganisation in selektiven Lösemitteln und bilden Vesikel analog zu den Liposomen in Abhängigkeit der Lösemittelselektivität, der Molmasse und dem Blocklängenverhältnis.[3]

Im Vergleich zu Lipiden sind Block Copolymere über die chemische Synthese leichter und in größerem Maße zugänglich. Außerdem bieten sie eine deutlich erhöhte Stabilität und bedingt durch ihre dickere Membran mehr Möglichkeiten zur hydrophoben Beladung.[4]

Durch die gezielte Synthese dieser beladenen Vesikel lassen sich neue Einsatzgebiete erschließen, wie z.B. Transportsysteme für Medikamente, künstliche Zellsysteme oder Nanoreaktoren für die chemische Synthese.[5]

Trotz einer großen Anzahl an Arbeiten im Bereich der Polymersomen ist der Mechanismus der Vesikelbildung noch nicht genau bekannt.

1.1 Motivation und Zielsetzung

Das große Forschungsinteresse an Polymersomen begründet sich auf den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. Im Vergleich zu Liposomen zeichnen sie sich durch eine hohe Stabilität und große individuelle Anpassungsmöglichkeiten an die chemische oder biomedizinische Anwendung aus.

Für eine weitreichende Nutzung ist vor allem ein Scale-Up der Laborsynthese nötig. Der Einsatz von Mikromischertechnologie zur Herstellung von Polymersomen bietet neben dem Scale-Up einen Einblick in den Mechanismus ihrer Selbstorganisation. Genauere Kenntnisse ermöglichen die gezielte Einlagerung von hydrophilen und hydrophoben Partikeln, Farb- oder Wirkstoffen.[6, 7] Die Größe und Einheitlichkeit der Polymersomen bestimmt nicht nur die Beladungskapazitäten, sondern auch ihre Nutzung in Medikamenten zum Beispiel gegen Krebs. Krebszellen zeigen eine erhöhte Anreicherung von Nanopartikeln mit einem Radius von 50-100 nm.[8] Gleichzeitige Einlagerung von magnetischen Partikeln und Wirkstoffen machen sie für die Theranostik interessant.[9-11]

Als Nanoreaktoren bieten sie ebenfalls im chemischen Bereich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.[12] Enzyme können beispielsweise innerhalb der Vesikelmembran effektiv geschützt werden. Lagert man gleichzeitig Tunnelproteine in die Membran ein, können funktionelle Nanoreaktoren geschaffen werden.[13, 14]

Sehr enge Größenverteilungen und einheitliche Morphologien die im Mikromischer hergestellt werden könnten, böten die Grundlage zur Entwicklung eines Referenzmaterials für Partikel mit Hohlraumarchitektur.

In vorherigen Arbeiten ist bereits die Präparation und Beladung von Vesikeln untersucht worden. Dabei wurden auf die gängigen Methoden zur Liposomen-Präparation der Filmrehydratation und der Cosolvent-Methode zurückgegriffen. Beide können für die Herstellung einheitlicher Polymervesikel eingesetzt werden, erfordern allerdings für enge Größenverteilungen einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand und weitere Prozessschritte.

Davon ausgehend sollte die kontrollierte und kontinuierliche Selbstorganisation verschiedener Block Copolymere zu Nanopartikeln unterschiedlicher Größe und Morphologien im Mikromischer untersucht werden. Die kontinuierlichen und reproduzierbaren Bedingungen in Mikromischern sollten genutzt werden, um den Mechanismus der Selbstorganisation von Polymersomen zu untersuchen. Unterschiedliche Übergangszustände von der einzelnen Polymerkette bis hin zum Vesikel mit Hohlkugelstruktur sollten analysiert werden.

Die Beladung der Vesikel mit Modellsubstraten im Mikromischer erweitern die möglichen Anwendungsgebiete und ebnen den Weg zu multifunktionellen Wirkstoffträgern oder Nanoreaktoren. Durch die kontinuierliche und gleichbleibende Synthese ließe sich ein erstes Referenzmaterial für vesikuläre Nanopartikel herstellen. Die Charakterisierung mittels TEM als abbildende und Lichtstreuung als Ensemble-Methode sollen die erfolgreiche Synthese und Beladung bestätigen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Selbstorganisation

Das Phänomen der Selbstorganisation (englisch "self-assembly") ist aus vielen Systemen bekannt. Ohne die Selbstorganisationen von Lipiden zu Doppelschichten in der Zellmembran wäre das Leben, wie wir es kennen, nicht möglich. Diese Phospholipide bestehen aus hydrophoben langkettigen Fettsäuren, Glycerin und einem hydrophilen Phosphorsäurerest, an den eine Base gebunden ist. Diese Moleküle ordnen sich im wässrigen Medium zu einer Doppelschicht an. Sie können damit die ungünstige Wechselwirkung von Wasser mit der hydrophoben Fettsäure vermeiden. Die Zelle wird von dieser Doppelschicht umschlossen und schützt sich auf diese Weise vor dem umgebenden Medium.[15]

Die Tenside sind die einfachste Form von amphiphilen Molekülen und eignen sich daher besonders gut zur Beschreibung des Phänomens der Selbstorganisation. Aufgebaut aus unpolaren Alkylketten und einer polaren Säuregruppe bilden diese Moleküle in Wasser unterschiedliche Strukturen aus. Die einfachste Form ist die sphärische Mizelle und bildet sich ab einer bestimmten Tensidkonzentration (cmc engl. für „critical micelle concentration“). Bei diesen sphärischen Partikeln zeigen die hydrophoben Ketten nach innen, während die Säuregruppe nach außen zum umgebenden Medium steht. Bei Erhöhung der Tensidkonzentration treten neben den Mizellen auch andere Strukturen wie Scheiben, Stäbchen, Doppelschichten oder ein- oder mehrwandige Vesikel auf (Abb. 2.1).[16]

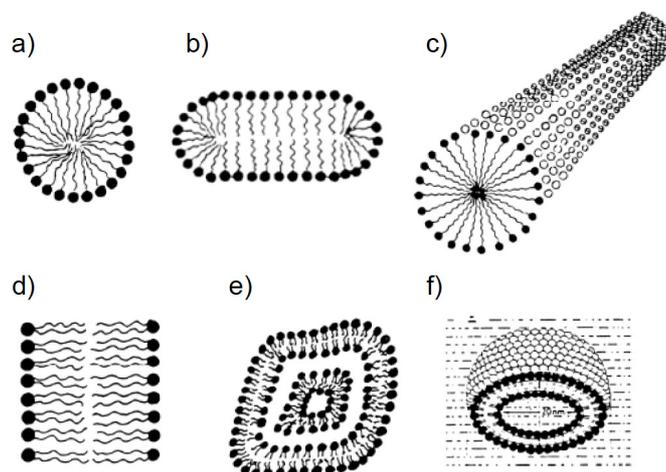


Abb. 2.1 [Vögtle]: Organisierte Tensidstrukturen: a) sphärische, b) ellipsoide, c) zylinderförmige Mizellen; h) Doppelschicht; i) Multischalen-, j) Mikro-Vesikel

Die Ursache für die Ausbildung dieser Strukturen ist vor allem auf den sogenannten „Hydrophoben Effekt“ zurückzuführen. Entropisch äußerst ungünstige Wechselwirkungen der hydrophoben Ketten mit Wasser können dadurch vermieden werden.[17] Die anziehenden Kräfte der hydrophoben Ketten untereinander und der hydrophilen Endgruppe mit dem Wasser stabilisieren diese Strukturen zusätzlich.

In Abb. 2.2 ist eine schematische Beschreibung einer Mizelle skizziert. Die Form kann über die Parameter aus hydrophiler Kopfgruppenfläche a_0 (resultierend aus abstoßender hydrophiler Wechselwirkungen), der Segmentlänge R (resultierend aus der hydrophoben Anziehung und der maximalen hydrophoben Kettenlänge l_c) und dem Segmentvolumen v beschrieben werden. [18]

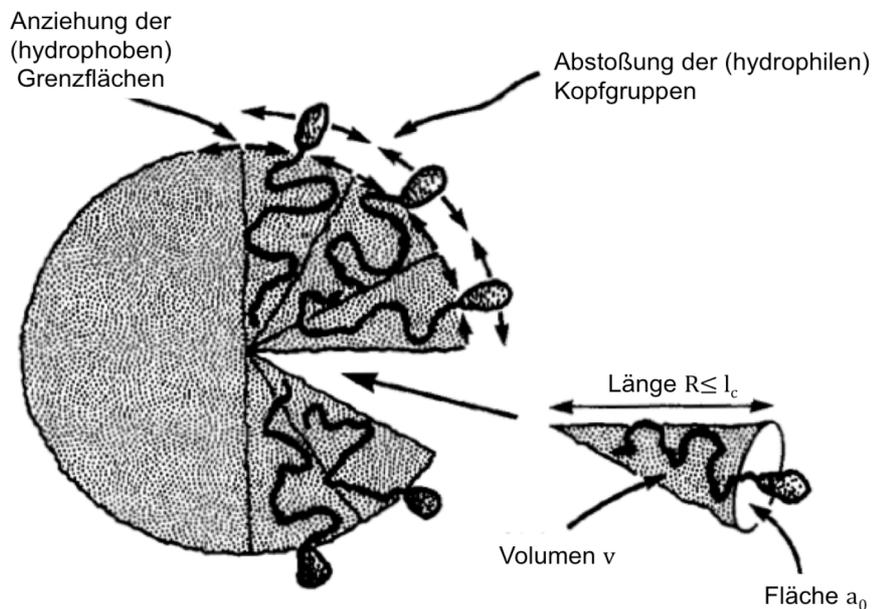


Abb. 2.2: [Israelachvili]: Schematischer Aufbau einer Mizelle

Anhand des dimensionslosen Packungsparameter $v/a_0 l_c$ kann die Form der bevorzugten Aggregate bestimmt werden. Jede dieser Strukturen entspricht dabei dem kleinstmöglichen Aggregat, in dem die Lipide die minimale freie Energie aufweisen (Abb. 2.3). Sphärische Mizellen entstehen bei großer Oberfläche a_0 im Vergleich zum hydrophoben Volumen v (z.B. bei geladenen Kopfgruppen). Hierbei übersteigt der Radius R der Mizelle nicht die kritische Kettenlänge l_c .

Bei kleinen Kopfgruppen (ungeladene Gruppen), ist die sphärische Strukturierung nicht begünstigt und es werden zylinderförmige Mizellen favorisiert.

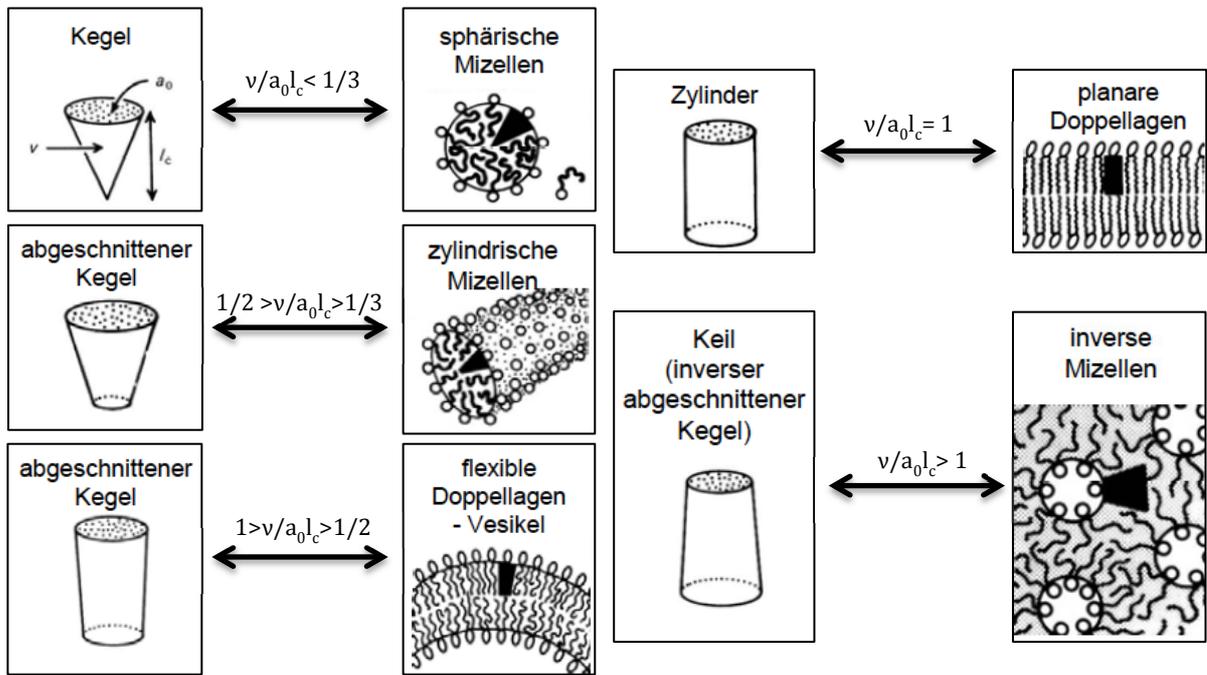


Abb. 2.3 [Israelachvili]: Strukturbestimmung der geformten Aggregate anhand des Packungsparameters

Lipide, deren hydrophobes Volumen v im Vergleich zur Kopfgruppe a_0 sehr groß ist, stabilisieren sich durch Aggregation zu Doppellagen ($v/a_0 l_c = 1$). Um unendlich ausgedehnte Doppellagen zu vermeiden, können sich auch geschlossene sphärische Vesikel bilden ($v/a_0 l_c < 1$), die keine energetisch ungünstigen Ränder an den Doppellagen aufweisen. Dafür muss sich das Lipid in Form gegensätzlicher Kegelschnitte anordnen können. Überschreitet das hydrophobe Volumen den Punkt, an dem der Packungsparameter $v/a_0 l_c > 1$ ist, kann sich das Lipid nur noch in Form inverser Kegelschnitte anordnen. [18] Mit Hilfe des Packungsparameters kann ebenfalls die Krümmung der hydrophob-hydrophilen Oberfläche wie folgt ausgedrückt werden. [19]

$$\frac{v}{al} = 1 + Hl + \frac{Kl^2}{3} \quad H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad K = \frac{1}{R_1 R_2} \quad (2.1)$$

Dabei entspricht H der mittleren Krümmung und K der Gaußkrümmung, aufgebaut aus den zwei Krümmungsradien R_1 und R_2 . Für sphärische Mizellen ist $R_1 = R_2$ und somit $H = 1/R$ und $K = 1/R^2$. Bei Zylindern ist R_2 unendlich groß und somit $H = 1/(2R)$ und $K = 0$. Für Doppellagen ist keine Krümmung mehr vorhanden und somit ist $H = 0$ und $K = 0$.

Die Bildung von Vesikeln beruht auf der Tatsache, dass sich die amphiphilen Moleküle parallel ausrichten und Doppellagen bilden. Das allein würde die Entstehung von Vesikeln nicht erklären, denn dann bilden sich nur scheibenartige Doppellagen aus. Diese finden sich beispielsweise für viele fluorhaltige Tenside. Geschlossene Vesikel bilden sich aus, wenn zum einen die Aggregate groß sind und zum anderen der Energieverlust durch

Oberflächenspannungseffekte hoch ist. Der Rand der Scheibe führt zu einem Energieanstieg E_{disk} , mit γ als Linienspannung.

$$E_{\text{disk}} = 2\pi R_D \gamma \quad (2.2)$$

Der Zusammenschluss bzw. die Biegung einer Doppellage zu einem Vesikel erfordert eine sogenannte Biegeenergie E_{bend} , mit κ als Biegemodul.

$$E_{\text{bend}} = 8\pi\kappa \quad (2.3)$$

Betrachtet man nur die Oberfläche einer Kugel und einer Scheibe, entspricht dem Scheibenradius das Zweifache des Vesikelradius. Die Balance zwischen Scheibenrandspannung und Biegeenergie liefert dann eine „minimale Vesikelgröße“ $R_{v,\text{min}}$.

$$R_{v,\text{min}} = 2\kappa/\gamma \quad (2.4)$$

Vesikel bilden sich umso leichter, je niedriger die Biegeenergie ist und je höher die Linienspannung ist.

Die Linienspannung steht mit der thermischen Energie in Zusammenhang, daher kann die Anzahl großer Vesikel thermisch beeinflusst werden. Trotzdem lässt sich eine Gleichgewichtsgröße für Vesikel definieren. Diese entsteht aus dem Gleichgewicht der Mischungsentropie (höhere Anzahl an Vesikeln) und der Biegeenergie (größere Vesikel und damit niedrigere Anzahl an Vesikeln).

Ein solcher Gleichgewichtszustand ist meistens nicht von Relevanz, da dieser durch die geringe Löslichkeit einzelner Amphiphile selten erreicht wird. Hier spielt vor allem die Präparationsmethode eine Rolle, bei der Vesikel nicht durch Austausch und Gleichgewichtsprozessen entstehen, sondern über die jeweiligen Bedingungen der Herstellung definiert und gefangen werden. Beispiele solcher Präparationsmethoden sind die Filmrehydratation, Elektroformation oder das direkte Lösen des Bulkmaterials in Wasser.[20]

2.2 Amphiphile Polymersysteme

Block-Copolymere können analog zu Tensidmolekülen aufgebaut werden. Dazu wird ein Polymer mit mindestens einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil gebildet. Dabei entstehen die sogenannten amphiphilen Blockcopolymere. Diese Polymere bilden analog zu den Tensiden unterschiedliche Strukturen in Wasser. Die Strukturbildung wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Molmasse, Monomere, relative Blocklängenverhältnisse, aber auch die jeweilige Löslichkeit der einzelnen Ketten im Lösungsmittel bestimmen die ausgebildete Struktur. Außerdem hat auch die Probenpräparation, wie z.B. die Verwendung von Co-Lösemitteln, die Nutzung von Dialyse oder Ultraschall, einen Einfluss auf die entstehenden Strukturen in Lösung.

Dabei lassen sich von Mizellen über Zylinder bis hin zu Vesikeln analog zu Tensiden viele

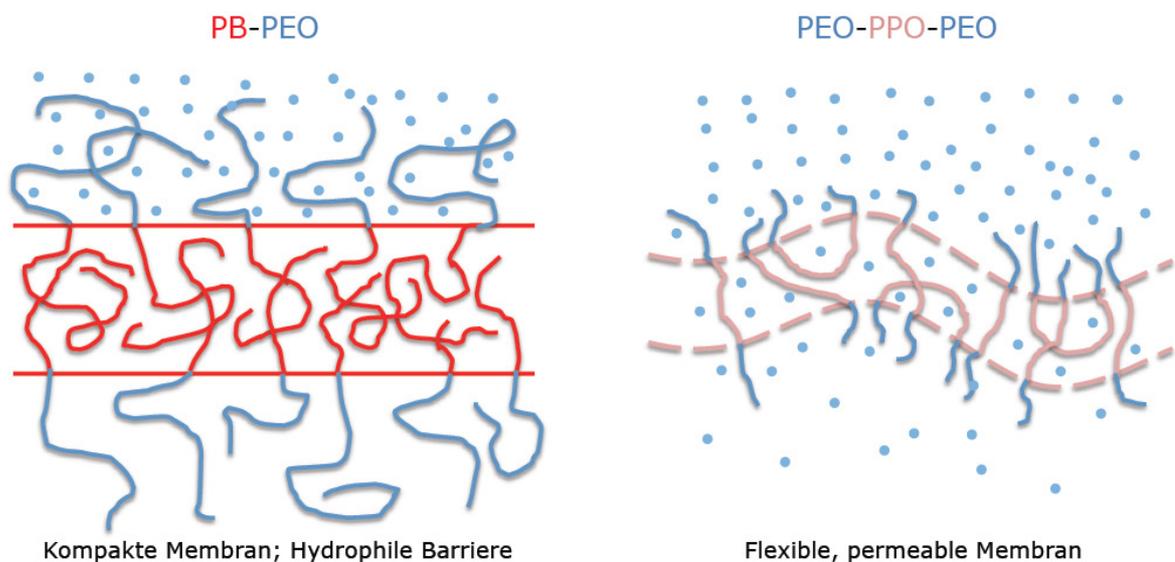


Abb. 2.4 [Garcia]: Unterschiedliche Membraneigenschaften von PB-PEO und PEO-PPO-PEO verschiedene Strukturen realisieren.

Abbildung 2.4 zeigt zwei Blockcopolymere, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Das Polybutadien-Polyethylenoxid hat eine sehr kompakte und für hydrophile Moleküle undurchdringliche Membran. Das Triblockcopolymer Pluronic®-L121 hingegen hat eine sehr flexible Membran und ist sehr permeabel für hydrophile Moleküle.[21]

2.2.1 Mechanismus der Selbstorganisation

Trotz vieler Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Polymersomen ist der Mechanismus der Entstehung von Vesikeln aus einzelnen Block-Copolymeren noch nicht umfassend verstanden. Als erster und schnellster Schritt der Selbstorganisation bilden sich aus vollständig gelösten Polymeren kleine sphärische Mizellen aus (Abb. 2.5). [22]

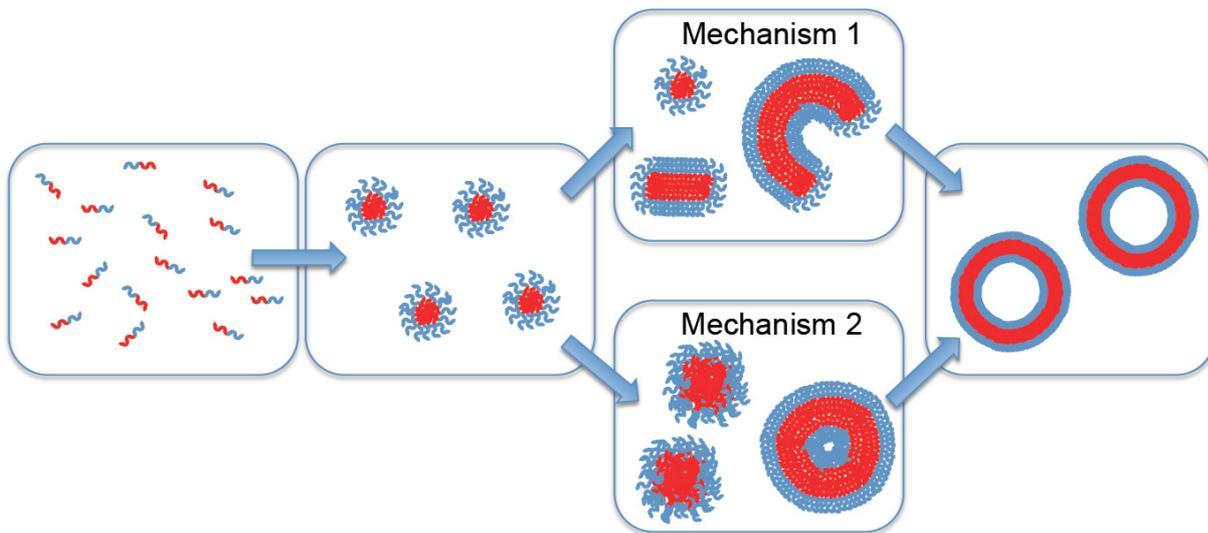


Abb. 2.5 [Uneyama]: Mechanismen der Vesikelbildung durch Selbstorganisation
 Vollständig gelöste Polymerketten (links); Bildung von sphärischen Mizellen (2. v. links); Bildung anisotroper Partikel wie Scheiben/Stäbchen und Zusammenschluss in Vesikel (Mechanismus 1);
 Bildung nicht orientierter Cluster und Reorganisation in Vesikel (Mechanismus 2);
 Vesikel mit Doppelschicht und hydrophilem Kern

Von hier ab unterscheiden sich die zurzeit diskutierten Mechanismen voneinander. Mechanismus 1 schlägt vor, dass sich zunächst durch Kollision kleiner Mizellen größere anisotrope Mizellen wie Scheiben oder Stäbchen bilden. Diese wachsen so lange weiter, bis die Flexibilität des Bilayers eine Krümmung zulässt, damit sich dieser schließen kann. Der Zusammenschluss erfolgt immer irreversibel, da durch das Verschwinden der Kanten der Scheibe eine Stabilisierung erfolgt und die Krümmung gleichmäßig ist. Schließen sich diese Scheiben schon bei minimal erforderlicher Krümmung zusammen, ist eine hydrophile Einlagerung schwierig. Eine Beladung des inneren Kerns ist deutlich einfacher, wenn sie länger wachsen und erst nach Beendigung der Selbstorganisation zusammenschließen.

In den meisten Fällen können keine Zwischenzustände vom einzelnen Polymermolekül zum Vesikel gefunden werden. Die Zeit, die zur Bildung des Vesikels benötigt wird, ist sehr kurz. Sogar Mizellen, die als erste Struktur auftreten, können in Experimenten nur selten beobachtet werden.[23] Immerhin konnten bei der Selbstorganisation von Tensiden durch sehr schnelles Mischen mit fluorierten Tracern anisotrope Zwischenzustände mittels SAXS/SANS beobachtet werden.[24] Auch die Ergebnisse einer Mischung aus Tensiden und dem

Pluronic® Triblockcopolymer L35 lassen auf scheibenartige Morphologie als möglichen Übergangszustand der Selbstorganisation in Polymersomen schließen.[25]

Im Kontrast dazu steht Mechanismus 2. Dieser geht von einem raschen Wachsen der Mizellen in metastabile Aggregate aus. Aus diesen zum Teil unorientierten Clustern erfolgt nach einiger Zeit ein internes Umstülpen und ermöglicht die Bildung des Vesikels. Allerdings würde dieser Mechanismus es quasi unmöglich machen, hydrophile Partikel oder Moleküle einzuschließen. Das entstehende innere Volumen dieser Vesikel wäre klein und damit nur geringe Kapazitäten für hydrophile Partikel vorhanden. Dies konnte bei einem pH-wechselnden Polymer gezeigt werden, welches eine sehr niedrige Einlagerung hydrophiler Stoffe in das Vesikel zeigte.[26]

2.2.2 Kinetik der Selbstorganisation

Die Kinetik der Selbstorganisation ist seit Jahrzehnten Bestand der Forschung. Ihre Beschreibung stellt trotzdem immer noch eine enorme Herausforderung dar. Amphiphile Moleküle zeichnen sich durch unterschiedlichste Monomere mit differenzierten physikalischen Eigenschaften, Blockverhältnissen, Ladungen etc. aus. Durch die Vielzahl an Wechselwirkungen, die bei der Selbstorganisation dieser Moleküle berücksichtigt werden müssen, verwundert es nicht, dass lediglich die Organisation von Lipidsystemen vollständig gelöst werden konnte.

Die Bildung von Liposomen konnten auf einer Zeitskala bis 240 ns simuliert werden. Diese Simulation basierte auf einem atomistischen Ansatz mit einem System von 1017 Lipiden mit jeweils 50 Wechselwirkungszentren in 106563 Wassermolekülen. Wie man anhand zahlreicher Poren in der Schale feststellen konnte, war die Bildung des Liposoms bei 90 ns noch nicht abgeschlossen. Erst nach 200 ns war ein Liposom entstanden. [27]

Aufgrund der enormen Anforderungen von Simulationstechniken an die Rechenleistung von Computersystemen stoßen heutzutage atomare Modelle schnell an ihre Grenzen. Für größere Zeitskalen bei niedrigeren Konzentrationen oder bei anderen amphiphilen Systemen werden diese atomaren Modelle sehr komplex.[28]

Um die Grenzen der Moleküldynamik zu überwinden, wird heute meist die DPD-Simulation (Dissipative Partikel Dynamik) angewandt. Bei dieser Methode werden Wasser oder amphiphile Monomere Kugeln zugeordnet. Jede Kugel korrespondiert mit einem Volumen einer Gruppe von Wassermolekülen oder amphiphilen Monomeren. Anschließend kann man ihnen bestimmte Eigenschaften zuweisen. Durch diese Zuordnung sind die nicht bindenden Wechselwirkungen zwischen zwei DPD-Partikeln „weich“ und können durch die Kraft F_{ij} beschrieben werden:

$$F_{ij} = -a_{ij} \left(1 - \frac{|r|}{r_c}\right) \frac{\mathbf{r}}{|r|} \text{ mit } r \leq r_c \text{ und } F_{ij} = 0 \text{ mit } r > r_c \quad (2.5)$$

\mathbf{r} entspricht hier dem Vektor zwischen zwei Partikeln der Spezies i und j , r_c bestimmt die Länge einer Einheit und der Koeffizient a_{ij} bestimmt die Stärke der Wechselwirkung. Das amphiphile Konstrukt wird durch ein Potential bindender Wechselwirkungen $V_{\text{bond}}(|r|)$ festgehalten und kann durch Federn analog zum Hook'schen Gesetz beschrieben werden:

$$V_{(1)\text{bond}}(|r|) = k_{\text{bond}} \mathbf{r}^2 \text{ oder } V_{(2)\text{bond}}(|r|) = \frac{k_{\text{bond}}}{2} (|r| - l_0)^2 \quad (2.6)$$

mit \mathbf{r} als Vektor der aufeinanderfolgende Kugeln verbindet, k_{bond} der Federkonstante und der Bindungslänge l_0 . Dies kann nun noch weiter vereinfacht werden zu:

$$V_{(1)\text{bond}} = \frac{k_{\text{bend}}}{2} (\vartheta - \vartheta_0)^2 \text{ oder } V_{(2)\text{bend}} = k_{\text{bend}} (1 - \cos(\vartheta - \vartheta_0)) \quad (2.7)$$

In dieser Gleichung steht k_{bend} für die Federkonstante, während ϑ and ϑ_0 für den momentanen und den Durchschnittswinkel aufeinanderfolgender Bindungen stehen.

Der entscheidende Parameter für viele Systeme beruht auf den unterschiedlich starken Wechselwirkungen, also a_{ij} . Dabei beschränkt sich a_{ij} meist auf die Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel, hydrophobem und hydrophilem Teil bzw. diesen untereinander. Die wichtigste Wechselwirkung wird dabei der hydrophoben Abstoßung mit dem Lösungsmittel zugeschrieben, denn diese ist die Triebkraft der Selbstorganisation.[18]

Shillcock konnte anhand dieser Methode die Selbstorganisation von amphiphilen Molekülen bis zu 415 μs simulieren.[29] Er konnte auch zeigen, dass der Prozess in mehrere Abschnitte aufgliedert werden kann. Zunächst entstehen in einem sehr schnellen Prozess Mizellen. Diese wachsen in einer zweiten, längeren Periode durch Kollision mit anderen Mizellen oder durch Aufnahme einzelner Amphiphile an und verbinden sich zum Teil zu Doppellagen. Dabei entstehen immer größere Doppelschichten, die sich anschließend in Vesikel zusammenschließen. Der darauffolgende Abschnitt ist der am langsamsten ablaufende, denn hier fusionieren die bereits geformten Vesikel zu noch größeren Vesikeln. Durch den deutlich kleineren Diffusionskoeffizienten liegt dieser Prozess außerhalb der möglichen Simulationszeiten.

Abb. 2.6 zeigt die DPD-Simulation einer Selbstorganisation amphiphiler Moleküle bei verschiedenen Konzentrationen. Shillcock et al. kam zu dem Ergebnis, dass die Konzentration einen starken Einfluss auf die Selbstorganisation ausübt. Bei höheren Konzentrationen werden nicht die Vesikel nicht nur größer, sondern sie entstehen auch viel schneller.

Bei der niedrigsten Konzentration zeigt sich nicht das erwartete Wachstums-gesetz (durchgezogene Linie), welches bei den anderen Konzentrationen beschreibend war. Dies liegt an der erheblich längeren benötigten Zeit, um aus den schnell geformten Mizellen eine Doppelschicht zu bilden.

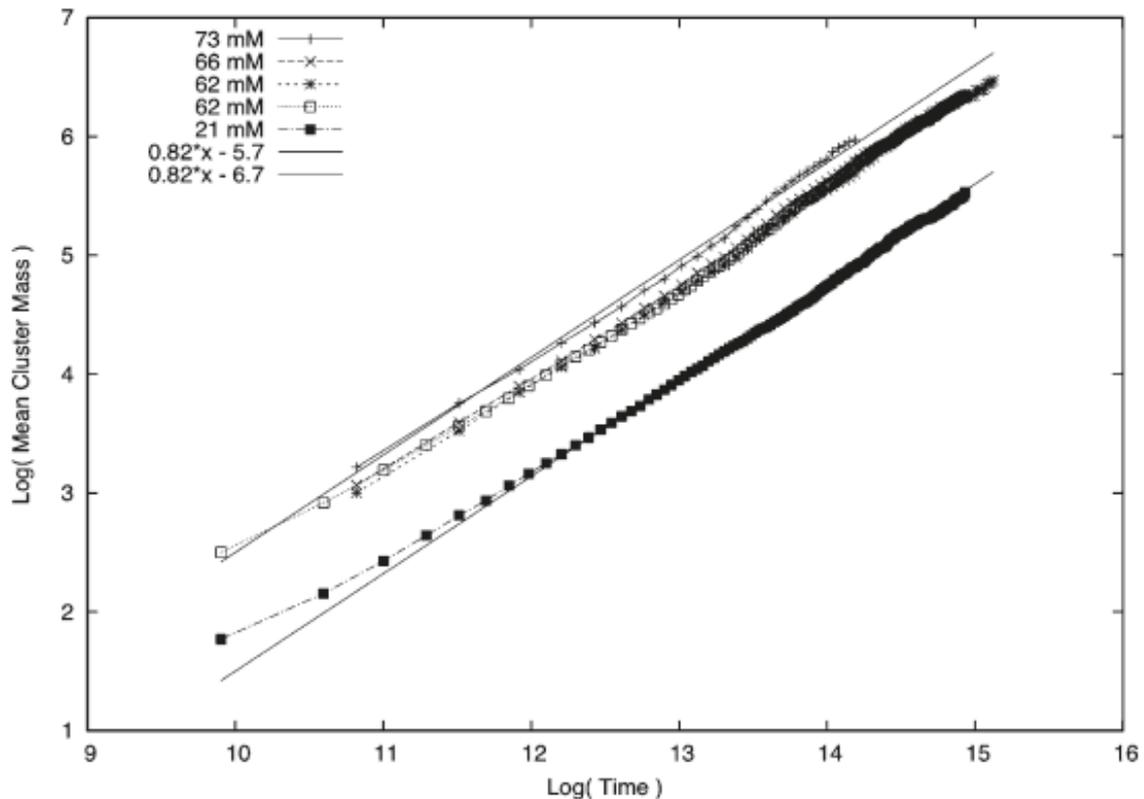


Abb. 2.6 [Shillcock]: Wachstum amphiphiler Cluster als Funktion der Zeit in Volumenboxen von $(110 \text{ nm})^3$ und $(140 \text{ nm})^3$ für unterschiedliche Konzentrationen; gerade Linien entsprechen dem erwarteten Wachstum und machen die Abweichung zur Simulation deutlich

Um einen Eindruck vom Aufwand solcher Berechnung zu bekommen, kann gesagt werden, dass für jede Kurve einer einzelnen Konzentration in Abbildung 2.6 zwischen 4 und 7 Tagen Rechenzeit von 512 Prozessoren benötigt wurden und entspricht pro Kurve 6-10 Jahre einer einzelnen CPU-Rechenleistung.[29]

Nichts desto trotz erlaubt uns diese Art von Simulationen einen theoretischen Einblick in die Kinetik dieses physikalisch kollektiven Phänomens, welche aufgrund der zu kleinen Zeiten in der Praxis bisher nicht gezeigt werden konnte.

Für amphiphile Polymersysteme kann die Berechnung nur als Näherung gesehen werden, denn die Polymere sind deutlich größer und haben daher längere Diffusionszeiten als in dem betrachteten System.

He und Schmid haben für Polymersysteme eine spinodale Entmischung simulieren können.[30] Diese Bedingungen ähneln denen, die während der Cosolvent Methode auftreten. Schmid et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die zunächst entstehenden mizellaren Strukturen

durch weitere Aufnahme von Polymerketten anwachsen. Der Kern der sphärischen Mizelle nimmt dabei an Hydrophilie soweit zu, dass Lösungsmittel aufgenommen wird und sich Vesikel ausbilden. Diese Ergebnisse haben große Ähnlichkeit zum Mechanismus II und stehen im Widerspruch zu anderen Simulationen. Denn es wird angenommen, dass unterschiedliche Simulationen zu einem Mechanismus führen sollten. Durch verschiedene Vereinfachungen, die bei dieser Simulation angenommen werden, könnte das Auftreten des Mechanismus II ebenfalls erklärt werden.

2.3 Polybutadien-Polyethylenoxid

Ein Beispiel amphiphiler Block-Copolymere ist das PB-PEO-Block-Copolymer, das unter anderem in dieser Arbeit Verwendung fand. Es ist aus dem hydrophoben Polybutadien (PB) und dem hydrophilen Polyethylenoxid (PEO) aufgebaut. Da die Polybutadienkette eine Glas temperatur von -40°C hat, ist bei Raumtemperatur eine ausreichende Flexibilität vorhanden. Der Polybutadienteil kann in unterschiedlichen Größen gewählt werden, wodurch es möglich ist, verschieden starke Membranen aufzubauen. Die Membrandicke lässt sich zwischen 9 und 20 nm einstellen und skaliert mit dem Molekulargewicht von Polybutadien M^b (mit $b = 0,5-0,66$).[31] Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Polymer mit 130 Polybutadieneinheiten die Membran so kompakt ist, dass das Innere vom äußeren Lösungsmittel sogar gegen Protonendiffusion abgeschirmt ist.[32] Dies ermöglicht den Einsatz der Vesikel als Nanoreaktoren, weil das Reaktionsvolumen allein durch deren Größe bestimmt werden kann. Je dicker die Membran ist, desto größer ist auch die Kapazität für hydrophobe Beladung.

Durch die ungesättigte Polybutadienkette ergeben sich zusätzlich Modifikationsmöglichkeiten wie zum Beispiel eine Addition an die Doppelbindungen oder eine Vernetzung. Letztere können zum Beispiel durch Gammastrahlung oder auch durch Radikalstarter wie Peroxosulfate initiiert werden.[33-35]

Die hydrophile Polyethylenoxidkette ist ein sehr gut untersuchtes wasserlösliches Polymer, welches tausendfach in Pharmazeutika und Kosmetika zur Anwendung kommt. Seit etwa 30 Jahre ist bekannt, dass die Verweildauer von Liposomen durch eine Beschichtung mit PEO im Blutzyklus verlängert werden kann und man hat dessen Biokompatibilität in vielen Studien untersucht.[36, 37]

2.3.1 Strukturbildung von PB-PEO

Die Eigenschaften des Copolymer Polybutadien-Polyethylenoxid bezüglich ihrer Strukturbildung wurden in Arbeiten von Bates [38], Förster [20, 39] und Maskos [35, 40] untersucht. Die Kettenlänge der einzelnen Blöcke und ihr Verhältnis zueinander tragen wesentlich zu ihrer bevorzugten Struktur im wässrigen Medium bei.

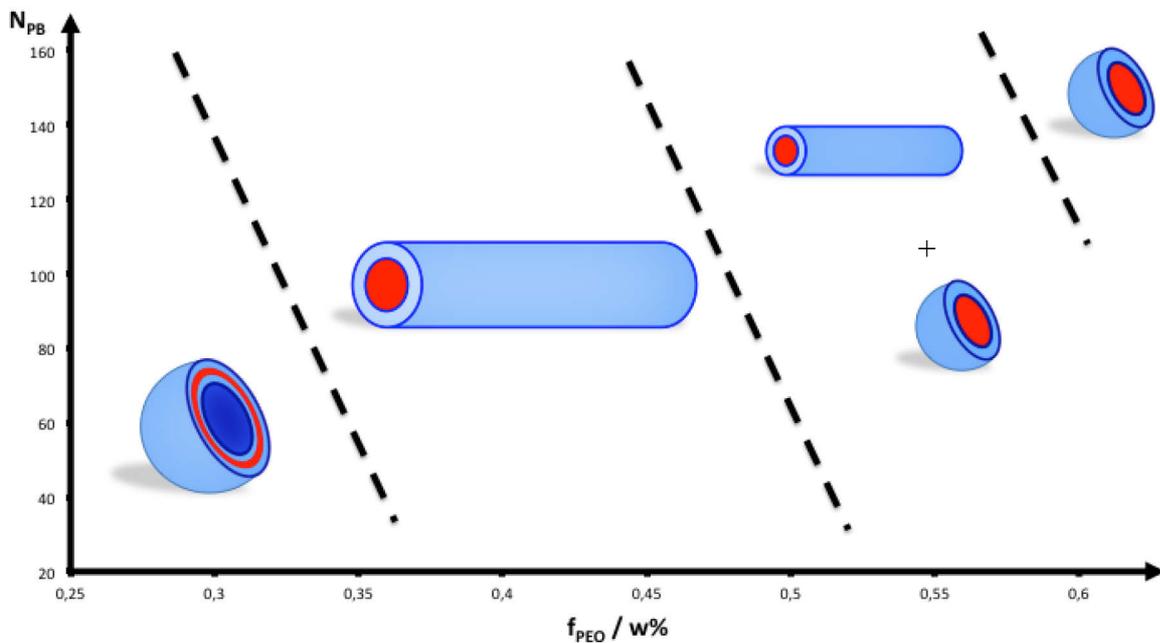


Abb. 2.7 [Maskos]: Bevorzugte Struktur des Polymers PB-PEO mit unterschiedlichen Kettenlängen

Abb. 2.7 zeigt ein vereinfachtes Schema der favorisierten Partikelformen für unterschiedliche Blocklängen des PB-PEO Blockcopolymer. Bei einem Gewichtsverhältnis von 30% PEO zur Polybutadienkette können sich Vesikel ausbilden. Dabei kann die Länge des PB-Anteils von 30-250 Monomereinheiten variiert werden. Ist der Anteil an Polyethylenoxid im Blockcopolymer deutlich größer, entstehen Zylinder oder sphärische Mizellen. Das in dieser Arbeit verwendete $PB_{130}-PEO_{66}$ hat ein mittleres Kettenlängenverhältnis PEO zu PB, welches dazu führt, dass Vesikel als Struktur in Wasser bevorzugt werden.

Neben dem Blocklängenverhältnis spielt auch die Endgruppe eine Rolle. Ersetzt man die OH-Gruppe durch eine Carboxylgruppe, erhält man in Wasser eine partielle Deprotonierung und somit eine geladene Oberfläche. Spezifische Wechselwirkungen der Carboxylgruppe mit der Polyethylenoxidkette führen zu einer Elongation der hydrophilen Kette. Diese konnte durch AFM-Untersuchungen bestätigt werden.[41] Aus dieser Streckung resultiert eine verhältnismäßige Vergrößerung des hydrophoben Blocks bzw. Verkleinerung des hydrophilen Volumens. Der zu den Lipidsystemen analogen Packungsparameter $v/a_0 l_c$ vergrößert sich und somit ergibt sich eine stärkere Tendenz zu vesikelbildenden Strukturen.[40]

2.3.2 Synthese von PB-PEO

Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere PB₁₃₀-b-PEO₆₆ bzw. PB₁₆₀-b-PEO₆₀ wurden durch anionische Polymerisation hergestellt. Abbildung 2.8 zeigt die Strukturen der drei verwendeten Polymere. Die in blau dargestellten Molekülketten entsprechen den wasserlöslichen PEO-Anteilen. Der rote Polybutadien-Bereich ist hydrophob und bildet den wasserunlöslichen Part des amphiphilen Polymers. Zusätzlich ist die korrespondierende thermodynamisch bevorzugte Struktur, nämlich das Vesikel, skizziert.

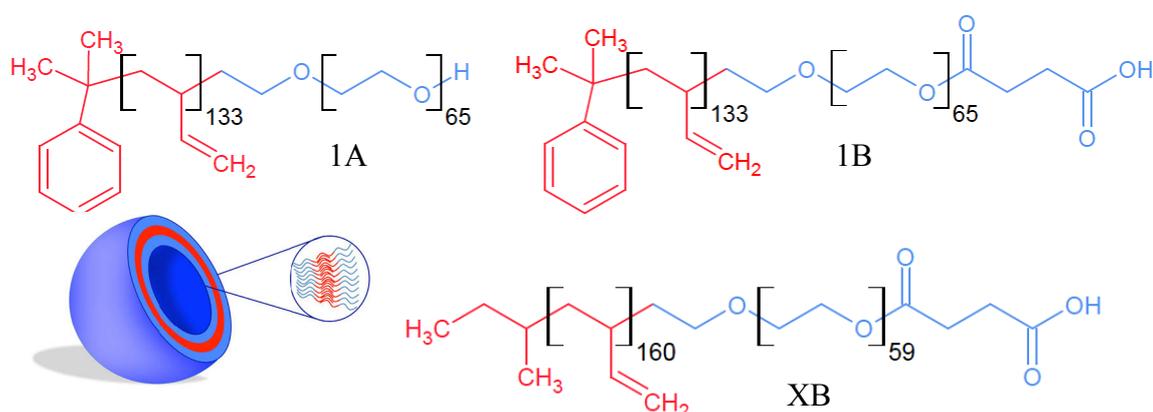


Abb. 2.8: Verwendete Polybutadien-Polyethylenoxid Block-Copolymere (1A, 1B, XB) und deren korrespondierender Struktur in Wasser

Tabelle 1 fasst die wichtigsten Daten der Polymere zusammen: die Molmasse der Polymere (bestimmt durch Maldi-TOF für 1A und 1B bzw. GPC für XB), den hydrophilen Anteil Polyethylenoxid f_{eo} in Gewichtsprozent und die Polydispersität in PDI, also dem Quotienten aus M_w und M_n . Bei beiden Polymeren liegt der Wert von f_{eo} zwischen 20-30% und bildet Vesikel als bevorzugte Struktur aus.

PB₁₃₀-b-PEO₆₆ wurde analog zu Abb. 2.9 synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Polymere wurden mit zwei verschiedenen Endgruppen versehen. Beide Polymere wurden mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert (1 A und 1B).[40, 42]

Tab. 1: Kenndaten der verwendeten PB-PEO Block-Copolymere

Polymer	1A [#]	1B [#]	XB [*]
M_n (g/mol)	11000	11000	11300
f_{eo} (w%)	29	29	23
PDI	1,05	1,05	1,06

[#]: Bestimmt durch MALDI-TOF Analyse

^{*}: Bestimmt durch GPC-Analyse

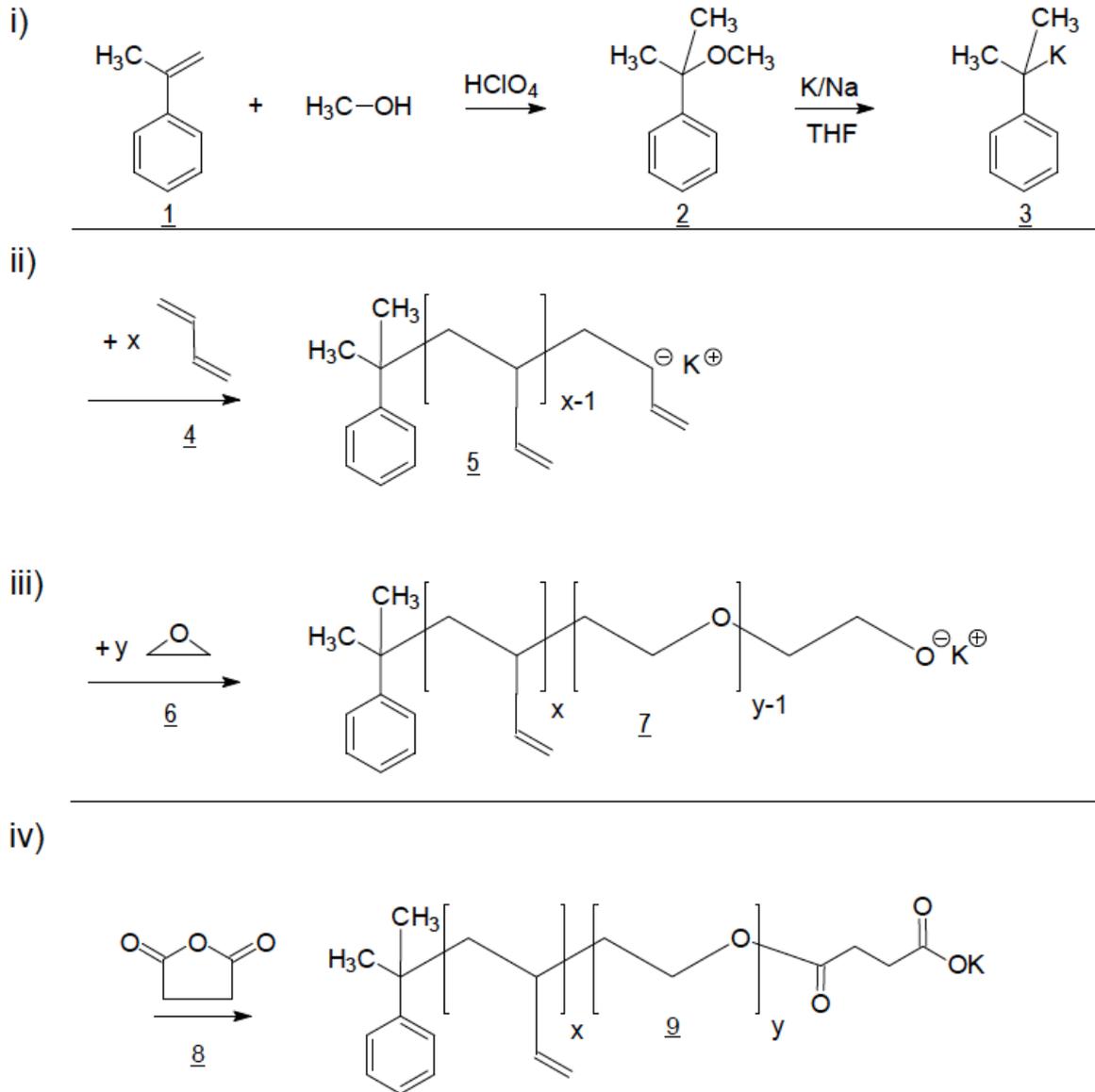


Abb. 2.9 [Maskos]: Syntheschema des PB-PEO-Block-Copolymers mittels Cumylkalium-Initiator

Da von den Polymeren 1A und 1B keine ausreichende Menge zur Verfügung gestanden hat, wurde ein zweites Polymer PB₁₆₀-PEO₆₀ synthetisiert. Aufgrund einfacherer Handhabbarkeit wurde diese Synthese analog Abb. 2.10 durchgeführt.[43] Das Polybutadien wurde durch anionische Polymerisation bei -78 °C hergestellt. Als Initiator wurde s-BuLi verwendet und die Reaktion durch Ethylenoxid abgebrochen. Da eine Polymerisation des Ethylenoxids durch die starke Bindung des Lithiums an die Enolatgruppe nicht möglich ist, wurde das Lithium durch Fällen in Methanol in Form von Lithiummethanolat entfernt. Anschließend wurde das Polybutadien mit endständiger Ethylenoxidgruppe mittels der starken nicht-nukleophilen Phosphazenenbase t-BuP₄ (Schwesinger Base) durch Deprotonierung reaktiviert. Durch Zugabe weiteren Ethylenoxids konnte die Ethylenoxidkette verlängert werden.

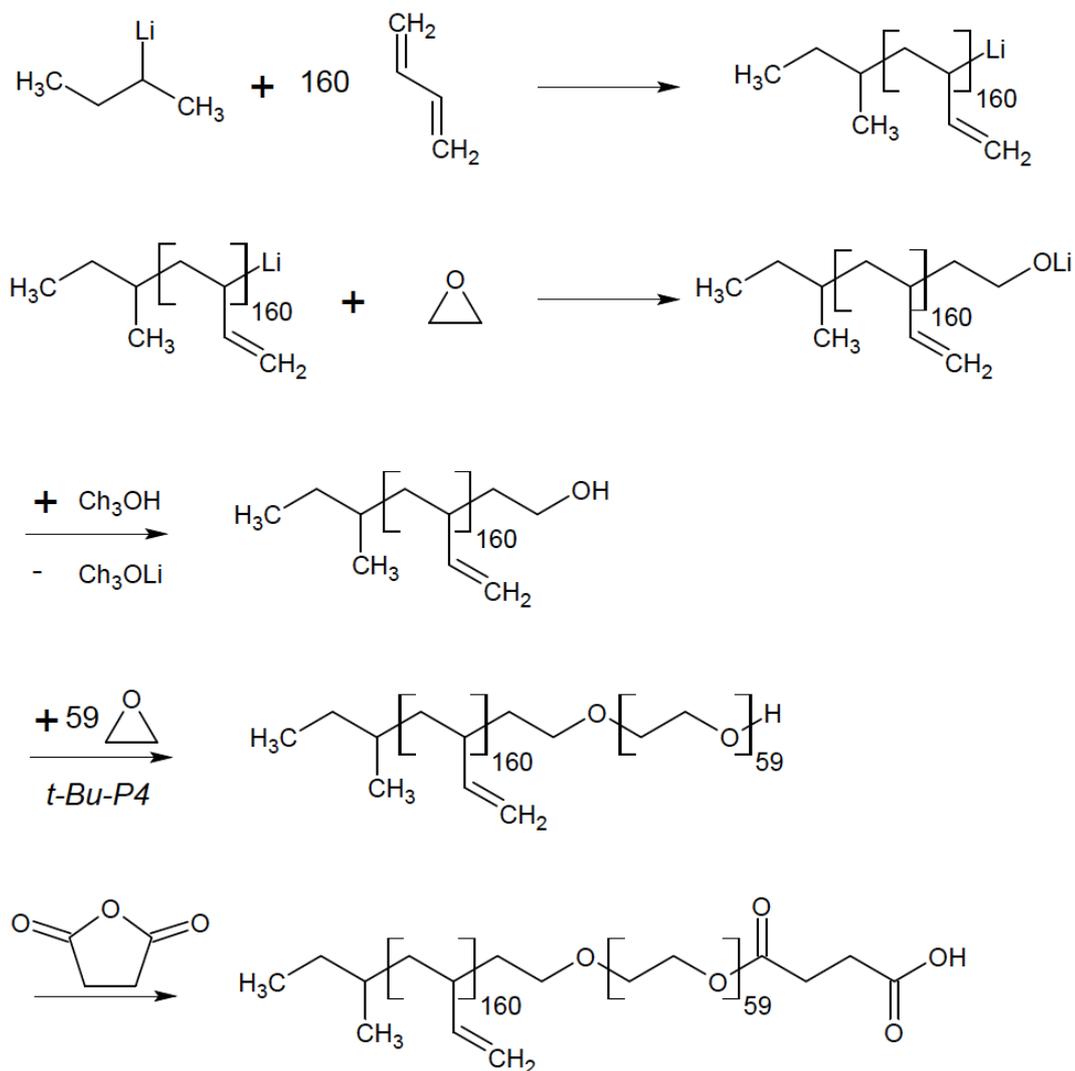


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Synthese Blockcopolymers PB-PEO mit BuLi-Initiator, Abbruch mit Methanol und Reinitierung mit Phosphazenen-Base t-Bu-P4

Durch das sich ergebende Blocklängenverhältnis entstehen bei diesem Polymer ebenfalls Vesikel in wässrigem Medium. Die sich zunächst durch die Synthese ergebende Hydroxy-Endgruppe, wurde weiter durch eine Carboxylgruppe ersetzt. Das ermöglicht eine leichtere Funktionalisierung mit Farbstoffen oder Verarbeitung zu Biokonjugaten.

2.3.3 Modifikation der Copolymerkette

Das Vorhandensein vieler ungesättigter Bindungen ermöglicht eine Vielzahl von Reaktionen. Ähnlich wie im Gummi von Autoreifen lassen sich PB-b-PEO-Polymervesikel nach Selbstorganisation vernetzen. Während bei der Herstellung von Autoreifen Schwefel als Vernetzer zum Einsatz kommt, verwendet man bei Vesikeln zum Beispiel Kaliumperoxosulfat als Initiator. Durch die hohe 1,2-Verknüpfung der Butadienmonomere, die sich durch die anionische Polymerisation bei -78 °C ergibt, ist eine einfachere Vernetzung als bei 1,4-Verknüpfung möglich.

Eine Vernetzung ohne weitere Einbringung von Fremdmolekülen ist durch Gammabestrahlung möglich.[34] ^{60}Co ist eine geeignete Quelle dieser Strahlung für die PB-PEO-Vernetzung. Durch radioaktiven Zerfall entsteht aus ^{60}Co ^{60}Ni unter Aussendung von β - und γ -Strahlung. Trifft diese γ -Strahlung auf Doppelbindungen, werden diese in Radikale gespalten und starten die Vernetzung. Maskos[2006] konnte zeigen, dass keine Strukturänderung während der Vernetzung auftritt.[40] Eine Bestrahlung mit 60 kGy reicht aus, um die zunächst labile Aggregationsform von Vesikeln dauerhaft zu fixieren. Die vesikuläre Struktur bleibt bei Vernetzung sogar in einem guten Lösungsmittel für beide Blöcke erhalten. Das gilt sogar im Falle der kompletten Trocknung. Eine derartige Stabilisierung ermöglicht die sehr leichte Analyse mittels Elektronenmikroskopie ohne zwingend auf Cryo-TEM angewiesen zu sein, da hier immer eine Trocknung durch das Hochvakuum erfolgt.

Eine direkte Modifikation ist auch vor der Selbstorganisation möglich. Dabei kann zum Beispiel durch Kupplung von hydrophoben Molekülen mit einer Thiol-Gruppe mittels Klick-Reaktion der hydrophobe Teil des Polymers vergrößert werden. PB-PEO Polymere, die durch einen zu großen PEO-Teil normalerweise keine Vesikel bilden können (siehe Abs. 2.1), sind dann in der Lage vesikuläre Strukturen in Wasser auszubilden.[44]

Aufgrund der geringen Wechselwirkung des Polyethylenoxids mit anderen Molekülen lässt sich die hydrophile Schale des Vesikels ausschließlich durch direkte Modifikation der Endgruppe erreichen. Koppelt man Farbstoffe wie Fluoreszein an die Carboxylgruppe, lassen sich fluoreszierende Vesikel herstellen. Außerdem können Targeting-Proteine wie EGF an Vesikel gebunden werden, um diese gezielt an bestimmte Zellen binden zu lassen. Die dabei entstehenden Partikel nennt man auch Biopolymerhybride.[45]

2.4 Pluronic®-L121 Triblockcopolymer

Ein weiteres verwendetes Polymer ist das PEO-PPO-PEO Triblockcopolymer (Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid, Pluronic®). Der PEO-Teil fungiert wieder als hydrophiler Teil und der PPO-Anteil entspricht dem hydrophoben Block. Ähnlich wie beim PB-PEO Polymer findet in Wasser eine Selbstorganisation statt. Allein dieses Triblockcopolymer kann theoretisch allein schon eine Doppelschicht ausbilden, da es zwei hydrophile Blöcke an beiden Enden hat. Pluronic® gibt es in unterschiedlichen Summenverhältnissen von PEO_x - PPO_y - PEO_x , das Pluronic® L121 mit der Summenformel PEO_5 - PEO_{68} - PEO_5 bildet dabei in Wasser Vesikel aus.[46-50] Die temperaturabhängige Mizellisierung ist charakteristisch für PEO-PPO-PEO Block-Copolymere. PEO-PPO-PEO liegt bei niedriger Temperatur (4 °C) in verdünnter wässriger Lösung molekular vor, da hier PPO ebenso wie PEO löslich in Wasser ist.[51-54]

Pluronic® L121 hat mit 68 Wiederholungseinheiten PPO im Vergleich zum kurzen PEO von 5 Teilen einen großen hydrophoben Anteil. Der hydrophobe Teil ist im Vergleich zum Polybutadien in Wasser noch sehr permeabel. Pluronic® bieten weiterhin den Vorteil, biokompatibel und nicht toxisch zu sein.[55, 56] Darüberhinaus liegen für eine Vielzahl von Pluronic®-Präparaten eine FDA Zulassung vor.[57] Obwohl PEO-PPO-PEO nicht biologisch abbaubar ist, eignen sich diese Präparate trotzdem für die biomedizinische Anwendung, da sie eine gewisse Löslichkeit in Wasser haben. Sie können sogar mit dem Urin langsam ausgeschieden werden. Dies ist für Molekulargewichte bis maximal 10-15 kg/mol möglich.[58, 59]

Durch die relativ permeable und sehr dünne Membran von etwa 5 nm, sind diese Strukturen allerdings metastabil. Nach erfolgter Selbstorganisation mit eng-verteilten Vesikelgrößen, werden diese mit der Zeit immer polydisperser.[50] Eine Lösung dieses Problems ist die Beladung mit einem hydrophoben Crosslinker wie zum Beispiel PETA (Pentaerythryltetraacrylat), der mittels UV aktiviert wird. Dabei bildet sich ein festes und die Schale durchdringendes Netzwerk, das die Membran stabilisiert.[60] Durch diese Einlagerung von Fremdstoffen wird das System deutlich komplizierter. Folglich wird es schwieriger diese Vesikel für weitere Beladung zu verwenden. Zudem sind die Stabilisatoren in der Regel nicht biokompatibel und machen das Vesikel unbrauchbar für Anwendungen im Bereich des Wirkstofftransports.

2.5 Synthese von Polymersomen

Die Herstellung von Polymersomen kann in zwei verschiedene Routen aufgeteilt werden – mit und ohne organische Lösungsmittel.

Bei der Filmrehydratation wird ein dünner Polymerfilm auf einer Oberfläche direkt in Wasser gelöst. Dabei organisiert sich der Polymerfilm neu und bildet Polymersomen. Bei manchen amphiphilen Polymeren, deren hydrophober Block eine ausreichende Flexibilität zeigt (kleines Molekulargewicht und niedrige Glas temperatur), ist auch ein direktes Auflösen des Bulkmaterials für eine Herstellung von Polymersomen ausreichend. [3, 4, 61, 62]

Die zweite Methode nutzt zunächst ein gutes Lösungsmittel um das Polymer vollständig zu lösen. Dabei sei die Cosolvent-Methode genannt, bei der das gelöste Polymer zum Wasser bzw. umgekehrt Wasser zur Polymerlösung getropft wird. Die zur Verwendung kommende Lösungsmittel (THF, DMSO) sind vollständig mit Wasser mischbar.[3] Auch Emulsionen können erstellt werden, bei dem die wasserunlösliche Phase anschließend abgezogen wird und so Polymersomen entstehen lassen.[63, 64]

Die beiden wichtigsten Methoden, die Filmrehydratation und die Cosolvent-Methode, werden im folgenden Kapitel noch einmal genauer beschrieben.

2.5.1 Synthese mittels Filmrehydratation

Liposomen werden oft unter Verwendung der Filmrehydratation hergestellt und diese kann ebenfalls für Blockcopolymer verwendet werden. Man löst zunächst das Lipid oder Polymer in einem Lösungsmittel wie Chloroform und dampft dieses in einem Gefäß ab. Es bleibt ein sehr dünner Film an der Gefäßwand. Durch Zugabe von Wasser und Energie, beispielsweise Temperaturerhöhung und Rühren oder einfach durch Ultraschall, wird dieser Film wieder in Lösung gebracht. Dabei können sich neben einwandigen Vesikeln auch solche mit mehreren Schalen ausbilden. Außerdem ergeben sich sehr große Polydispersitäten und sehr große Vesikeldurchmesser. Dadurch ist es oft nötig, die Proben mittels Membranextrusion einheitlicher in Bezug auf deren Partikelgröße zu machen. Dazu verwendet man eine Membran mit klar definierten Porengrößen und presst Lösung dort mehrmals hindurch. Alle Vesikel, deren Durchmesser die Porengröße überschreitet, werden durch Scherkräfte verkleinert. Trotz niedriger Polydispersitäten, die mit diesem Verfahren erreicht werden können (8%), stellt es einen weiteren zeitintensiven Zwischenschritt dar. Darüberhinaus adsorbieren Polymere an der Membranwand, was sich negativ auf die Ausbeute auswirkt. [23]

2.5.2 Synthese mittels Cosolvent-Methode

Die sogenannte Cosolvent Methode zur Präparation von Polymersomen wurde von Eisenberg et al. entwickelt. Ein gutes Lösungsmittel für beide Blöcke des Polymers (z.B.: THF für PEO und PB) wird langsam mit einem selektiven Lösungsmittel (Wasser nur für PEO) versetzt. Durch die veränderten Lösungsmiteleigenschaften setzt die Selbstorganisation ein. Energetisch ungünstige Wechselwirkung zwischen hydrophilem Lösungsmittel und hydrophobem PB-Block können durch Ausbildung von Mizellen oder Doppelschichten vermieden werden. Dabei aggregieren die Polymermoleküle und bilden nur hydrophob-hydrophobe Wechselwirkungen aus. Die hydrophilen PEO-Ketten zeigen dann nach außen ins Wasser. Es können verschiedene Strukturen wie zum Beispiel sphärische Mizellen, Scheiben, Stäbchen oder Vesikel entstehen. Im Vergleich zur Filmrehydratation können verschiedene Größen durch unterschiedliche Geschwindigkeiten der Lösungsmittelzugabe erzielt werden. Außerdem können die entstehenden Polymervesikel eine niedrige Polydispersität aufzeigen. Nachteilig ist die Begrenzung auf relativ kleine Volumina, da andernfalls keine gleichmäßige Zugabe des Lösungsmittels möglich ist. Zudem ergibt sich immer eine gewisse Größenverteilung, da an der Eintropfstelle ein relativ großes Konzentrationsgefälle selbst bei sehr guter Durchmischung entsteht. Zusätzlich muss das verbleibende Lösungsmittel nach beendeter Selbstorganisation entfernt werden. Lösungsmittelrückstände führen oft zu Problemen bei späterer Nutzung, zum Beispiel als Wirkstoffträger.

2.6 Mikromischer

2.6.1 Allgemein

Seit mehr als 10 Jahren sind Mikromischer Bestandteil der Forschung und haben ein großes Anwendungsgebiet erobert. Dieses erstreckt sich von Lab-on-chip-Systemen für biotechnologische Anwendungen bis hin zum Ersetzen von Batchsynthesen durch eine kontinuierliche Produktion.

Für mikrofluidische Systeme lassen sich zwei verschiedene Mischverfahren nennen – passives und aktives Mischen.

Aktives Mischen zeichnet sich durch das Einbringen einer externen Energiequelle aus. Als Energiequellen dienen hier zum Beispiel Ultraschall, durch Bläschen induzierte Vibrationen, periodische Variation der Flussraten, magnet-induzierte hydrodynamische Bewegungen, Kanalräder und einige mehr.[65]

Passives Mischen verwendet allein die Flussenergie innerhalb eines Mixers. Dabei kann die Pumpenergie oder das hydrostatische Potential ausgenutzt werden, um den Fluss zu restrukturieren, was ein schnelles Mischen zur Folge hat.[65]

Im Folgenden sind einige Beispiele aufgeführt wie die Pumpenergie beim passiven Mischen eingebracht werden kann (Abb. 2.11):

- Interdigitale multi-laminare Anordnung
- Split-and-Recombine Konzepte (SAR)
- Chaotisches Mischen durch Wirbelbildung
- Düseneinspritzung in den Fluss
- Kollision von Jets

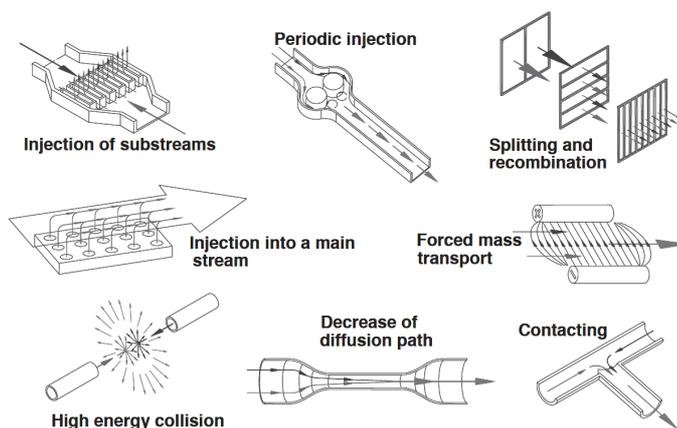


Abb. 2.11 [Hessel]: Beispiele unterschiedlicher passiver und aktiver Mischungsmethoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikromischer basieren auf den Konzepten der interdigitalen Multilamination und dem Split-and-Recombine Prinzip (SAR). Trotz der hohen und schnellen Mischleistung der anderen genannten Konzepte zeigen sie eine vergleichsweise schlechte Reproduzierbarkeit. Wirbelbildungen lassen sich beispielsweise schwer kontrollieren, da sie zum einen nur sehr schwer vorhersagbar und zum anderen zeitlich nicht konstant sind.

Für größtmögliche Reproduzierbarkeit und Kontrolle der Mischgeschwindigkeit wurden daher Konzepte der Multilamination zur Untersuchung der Selbstorganisation von Polymeren herangezogen.

Die Einsatzmöglichkeiten der genutzten Mikromischer bieten sich für spezielle Probleme an, wie sie sich in der Probenpräparationen für chemische Analysen stellen, können aber auch für traditionelle Mischungsaufgaben wie für Reaktionen, Gasabsorptionen, Emulgierung etc. eingesetzt werden. [65, 66]

2.6.2 Synthese in Mikromischern

Reproduzierbarkeit ist ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Synthese. Für potentielle Anwendungen ist es aber unabdingbar, dass sich diese Synthese auch auf größere Ansätze übertragen lässt und sich somit die Kosten reduzieren lassen.

Ein Ansatz, um diese beiden Faktoren miteinander zu vereinen, ist die Nutzung von Mikromischertechnologie.[67] Sie ermöglicht verschiedene Reaktionen in sehr kleinen Volumina unter kontinuierlichen Bedingungen durchzuführen.[65, 68-71]

Besonders bei schnell ablaufenden Reaktionen ist es oft nötig, die beiden Reaktanden sehr schnell und gleichmäßig zu vermischen. Im Batchversuch gibt man verschiedene Substanzen oder Lösungen direkt zusammen. Es ergeben sich sehr hohe lokale Konzentrationen beider Lösungen. Die Durchmischung findet nur an der im Verhältnis recht kleinen Grenzfläche statt.

Im Mikromischer werden zwei Lösungen im Mikrometermaßstab gemischt. Dadurch ergeben sich sehr kleine Reaktionsvolumina mit dementsprechend großen Grenzflächen an denen die gewünschte Durchmischung stattfinden kann. Die Mischzeiten in den nur wenige Mikroliter großen Reaktionsvolumina betragen nur wenige Millisekunden. Auch schwer handhabbare Reaktionen können so kontrolliert werden. Beispielsweise werden Reaktionen mit Peroxiden, Fluoriden oder Chlorierungen bereits großtechnisch in Mikromischern durchgeführt.[72-75]

Eine anionische Polymerisation ist durch Mikromischertechnologie bei Raumtemperatur durchführbar. Die starke Hitzeentwicklung, die bei der anionischen Polymerisation von Styrol auftritt, stellt das größte Problem dar, denn diese führt zu zahlreichen Nebenreaktionen. Deshalb wird die Synthese normalerweise bei -78 °C durchgeführt. Außerdem muss in trockenen Reaktionskolben unter Schutzgas gearbeitet werden. Ziegenbalg et al. konnte erstmals eine Reaktion mittels Mikromischer bei Raumtemperatur erfolgreich durchführen. Er erreichte durch Spülen aller Kanäle eine inerte Umgebung und erzielte durch die gute Hitzeabführung innerhalb der kleinen Kanäle eine sehr enge Größenverteilung von $PDI = 1,05$. [76]

Kationische oder ATR-(engl. für „atom-transfer-radical“) Polymerisationen sind ebenfalls im Mikromischer realisierbar.[77, 78] Darüberhinaus konnte eine freie radikalische Polymerisation im Mikromischer durchgeführt und patentiert werden.[79]

Diese Technik kann eingesetzt werden, um die Selbstorganisation von amphiphilen Block-Copolymeren zu kontrollieren. Einige Forschungsgruppen nutzen Mikromischer, um Mikroemulsionen aus zwei ineinander unlöslichen Flüssigkeiten herzustellen, aus denen man anschließend monodisperse Polymersomen im Mikrometerbereich herstellen kann.[63, 80]

In der vorliegenden Arbeit werden Mikromischer eingesetzt, um ineinander mischbare Flüssigkeiten zu vereinen. Ähnliche Arbeiten wurden für andere Polymere in Form von Lab-on-chip-Systemen, allerdings für deutlich kleinere Ansätze, durchgeführt.[81]

THF und Wasser, zwei uneingeschränkt ineinander mischbare Flüssigkeiten, werden kontrolliert gemischt. THF kann Block-Copolymere wie PB-PEO oder PEO-PPO-PEO molekular lösen. Es eignet sich als ein gutes Lösungsmittel sowohl für den PB- bzw. PPO-Teil (hydrophober Block), als auch für den PEO-Teil (hydrophiler Block). Die Löslichkeit von PPO ist stark abhängig von der gewählten Temperatur des Wassers, aber auch von seiner molekularen Masse. Das hier verwendete PPO ist bei Raumtemperatur schwer löslich (siehe Abs. 2.4).

Mikromischer erlauben die beiden Lösungsmittel so zu vermischen, dass die Mischung innerhalb der gleichen Zeitskala abläuft wie die Selbstorganisation (siehe Kap. 2.2). Da die Selbstorganisation von amphiphilen Polymeren bei bestimmten Lösungsmiteleigenschaften immer langsamer wird und sogar kinetisch eingefroren werden kann, lässt sich durch die Steuerung der Mischzeiten dadurch auch die Selbstorganisation der amphiphilen Block-Copolymere kontrollieren. Die Strukturbildung kann gezielt abgebrochen bzw. kinetisch eingefroren und somit der Mechanismus untersucht werden.

2.6.3 Mikromischer Architekturen

2.4.1.1 SIMM-V2

Bei dem hier genannten Mikromischer handelt es sich um einen Interdigital-mischer, d.h. es werden immer abwechselnd beide Lösungen zusammengebracht. Es entsteht so ein Stromlinienbild, bei dem sich die Lösungsflüsse abwechseln (Abb. 2.12).

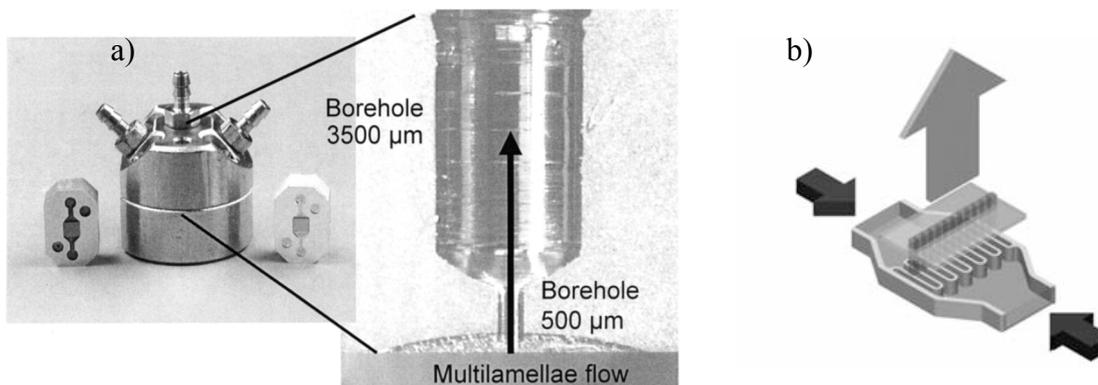


Abb. 2.12 [IMM]: a) Bild eines SIMM der ersten Generation und vergrößerter Querschnitt
b) Prinzip der Multilamination im SIMM durch ein geschlitztes Inlay

Das Herstellungsmaterial kann verändert werden, um für die jeweilige Reaktion die besten Bedingungen wählen zu können. Der verwendete Mischer bestand aus Glaskohlenstoff, da er ebenfalls für die Synthese von Goldnanopartikeln aus Goldsäure benutzt wurde. Edelstahl wird von Goldsäure angegriffen und ist daher nicht geeignet.

Diese Mischerart wird weit verbreitet eingesetzt, z.B. um organische Multiphasenreaktionen durchzuführen oder Emulsionen herzustellen. Der als Inlay bezeichnete obere Abschluss der Mischkammer besitzt einen Schlitz über die gesamte Breite. Er gibt jeweils kleine, gleichmäßig große Teile der Mischkammern frei (Abb. 2.12 rechts). Hierdurch wird ein interdigitales Mischbild erzeugt, wie in Abbildung 2.13 dargestellt. Die 30 Mischkanäle des verwendeten Mixers haben eine Breite von jeweils 45 µm und Länge von 200 µm. Durch eine Verengung des Ausgangs auf 65 µm Breite entsteht eine hydrodynamische Fokussierung der Flusskanäle.

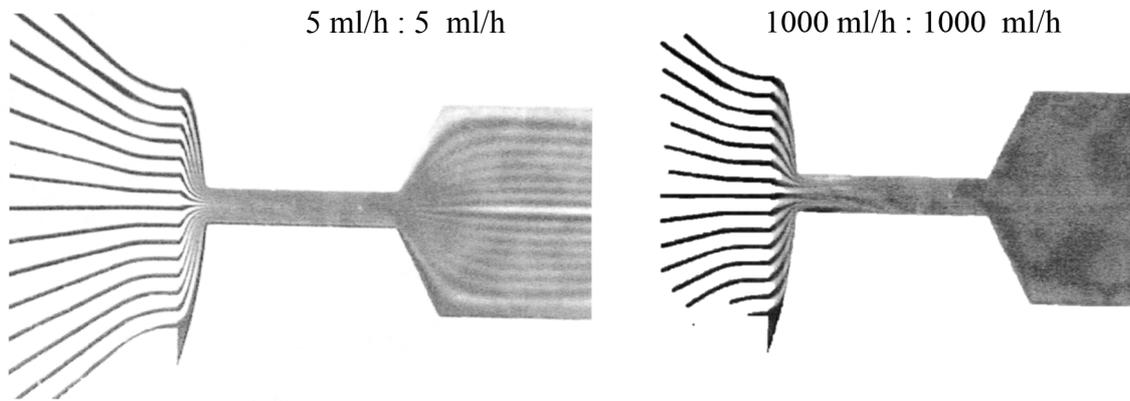


Abb. 2.13 [Hessel]: Mischungsprofil bei unterschiedlichen Flussraten aufgenommen durch Wasserblaufärbung
niedrige Flussraten zeigen gleichmäßige Lamellenbildung,
hohe Flussraten hingegen führen zu turbulenten Mischbedingungen

Abbildung 2.13 zeigt das Mischungsprofil bei unterschiedlichen Flussraten. Bei einer Gesamtflussrate von 1,67 ml/min kann man die laminare Struktur sowohl vor als auch nach der Fokussierung noch sehr gut erkennen. Die Mischung erfolgt hierbei fast ausschließlich durch Diffusion. Bei sehr hohen Flussbedingungen von etwa 33 ml/min entstehen am Eingang des Schlitzes Verwirbelungen und die Lösungen werden nicht mehr nur durch Diffusion gemischt. [82, 83]

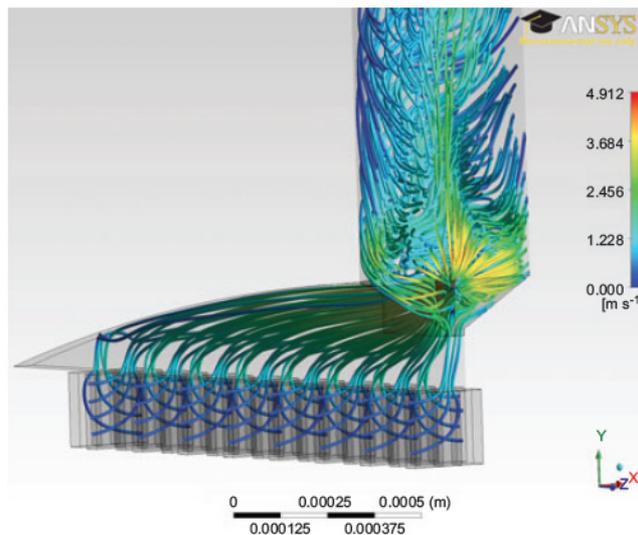


Abb. 2.14 [Ziegenbalg]: Flussbedingungen und Geschwindigkeitsprofil im SIMM
bei symmetrischer Gesamtflussrate von 3,6 ml/min

Abbildung 2.14 zeigt die CFD-Simulation der Mischung von Hexan und THF bei 3,6 ml/min. Hier treten bereits vereinzelte Turbulenzen und starke Geschwindigkeitsunterschiede auf. Die Mischzeiten bei hohen Flussraten können nur abgeschätzt werden, da hohe Geschwindigkeitsunterschiede und Verwirbelungen vermehrt auftreten.

2.4.1.2 Superfocus Mikromischer SFIMM-V2

Der Superfocus Mikromischer SFIMM-V2-30 des IMM (Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH) basiert ebenfalls auf dem Prinzip der interdigitalen Multilamination. Seine lamellenartige Mischstruktur wird gleichmäßig auf einen Ausgang fokussiert (Abb. 2.15). Im Vergleich zum SIMM ist dieser Mischer auf einen höheren Durchsatz ausgelegt. Der Mischer wird in zwei unterschiedlichen Bauarten hergestellt, die sich jeweils an den Bedürfnissen für den Einsatz im Labor bzw. in der Produktion orientieren. Der SFIMM-V2-30 ist auf einen Durchsatz von bis zu 35 L/h und der SFIMM-V2-300 auf bis zu 350 L/h ausgelegt. Seine Geometrie erlaubt ein sehr hohes Fokussierungsverhältnis von bis zu 178. Im SFIMM-V2 werden die Lösungen auf 38 Kanäle aufgeteilt. Alle Kanäle haben eine Breite von jeweils 260 μm und werden auf einen 400 μm breiten Ausgang fokussiert. Dies hat zur Folge, dass die gesamte Mischung innerhalb des Mixers und nicht in der nachfolgenden Verweilschleife abgeschlossen wird.[84]

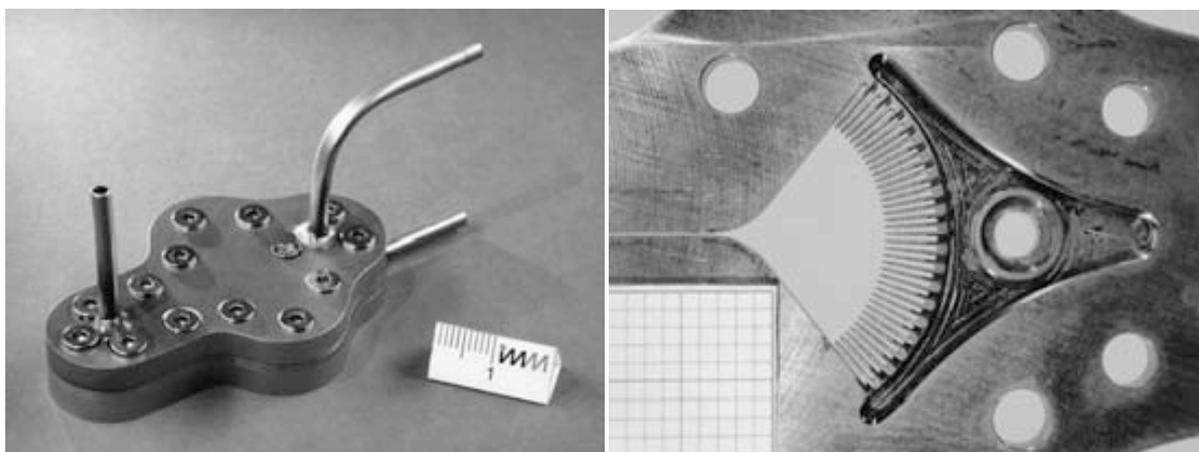


Abb. 2.15 [IMM]: Bild des SFIMM-V2-Mikromischers (links) und dessen lamellenartige Mischkammer (rechts)

Abbildung 2.15 zeigt den SuperFocus Mikromischer in der Edelstahlausführung und die Mischstruktur seines Inlays (rechts). Durch die Anfärbung eines Wasserstroms mittels Wasserblau lässt sich die Mischstruktur sehr deutlich visualisieren. Auch die hydrodynamische Fokussierung durch unterschiedlich schnelle Fluidströme lässt sich anschaulich darstellen (Abbildung 2.16).[82-84]

Die Mischbedingungen am Ende des Mikromischers kann man ebenfalls mittels Wasserblaufärbung visualisieren. Interessanterweise ist das Mischprofil bei hohen Flussgeschwindigkeiten nicht mehr laminar (Abbildung 2.17).

Bei niedrigen Flussbedingungen von 0,2 und 0,33 ml/min Gesamtflussrate sind noch gleichmäßige Lamellen vorhanden, jedoch beginnen die am Rand liegenden Lamellen bereits deutlich zu verschmieren.

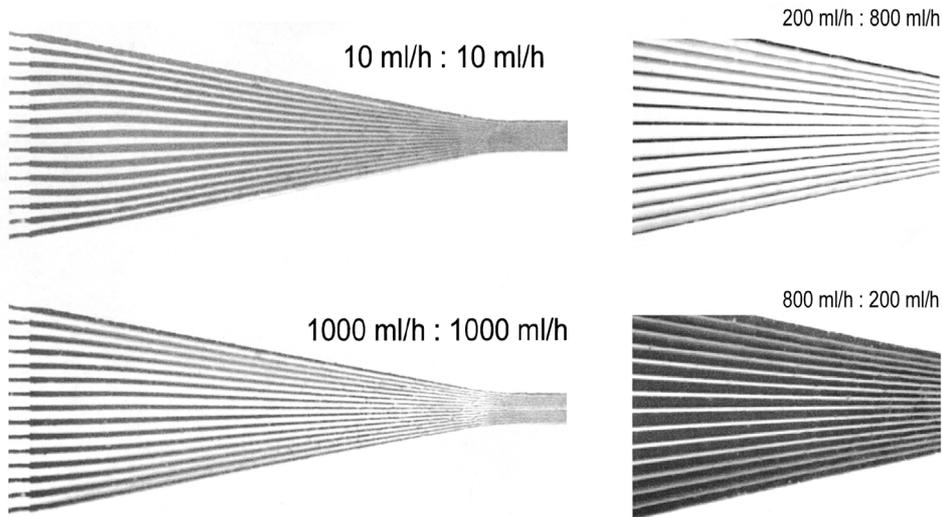


Abb. 2.16 [Hessel]: Mischbild des SuperFocus-Mischprinzips bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten

Auch der SFIMM zeigt bei erhöhter Flussgeschwindigkeit Wirbelbildungen. Bei hohen Flussgeschwindigkeiten verschmieren die Flüsse am Ende der Fokussierungszone vor allem an den Rändern immer stärker. Obwohl der innerste Fluidstrom immer noch intakt erscheint, ist die gesamte Durchmischung ungleichmäßig.

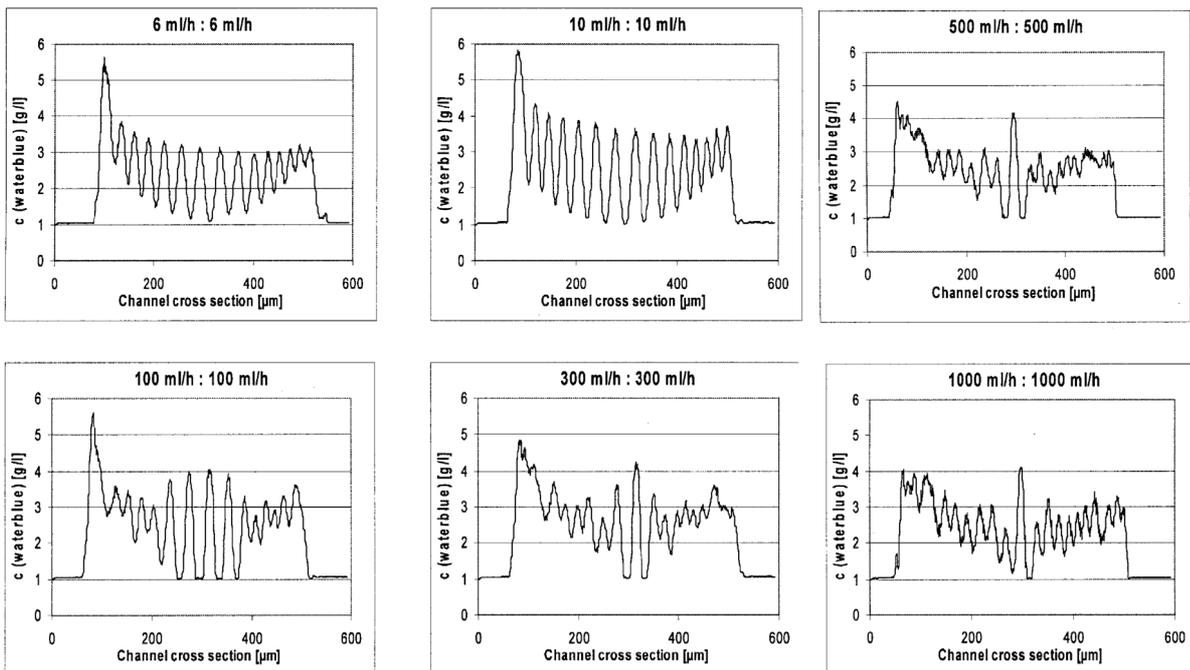


Abb. 2.17 [Hessel]: Mischbild des SuperFocus-Mischers bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten

2.4.1.3 Raupenmischer

Der Raupenmischer (CPMM, engl. für „CaterPillarMicroMixer“) leitet sich von seiner raupenförmigen Mischkammer ab und beruht auf dem sogenannten SAR-Prinzip (split and recombine, Abb. 2.18).[85] Seine Mischerarchitektur vereinigt zwei Einlässe direkt miteinander. Durch Separation, Reorganisation und erneuten Zusammenschluss der Fluidströme, lässt sich ebenfalls ein laminares Flussprofil erstellen.

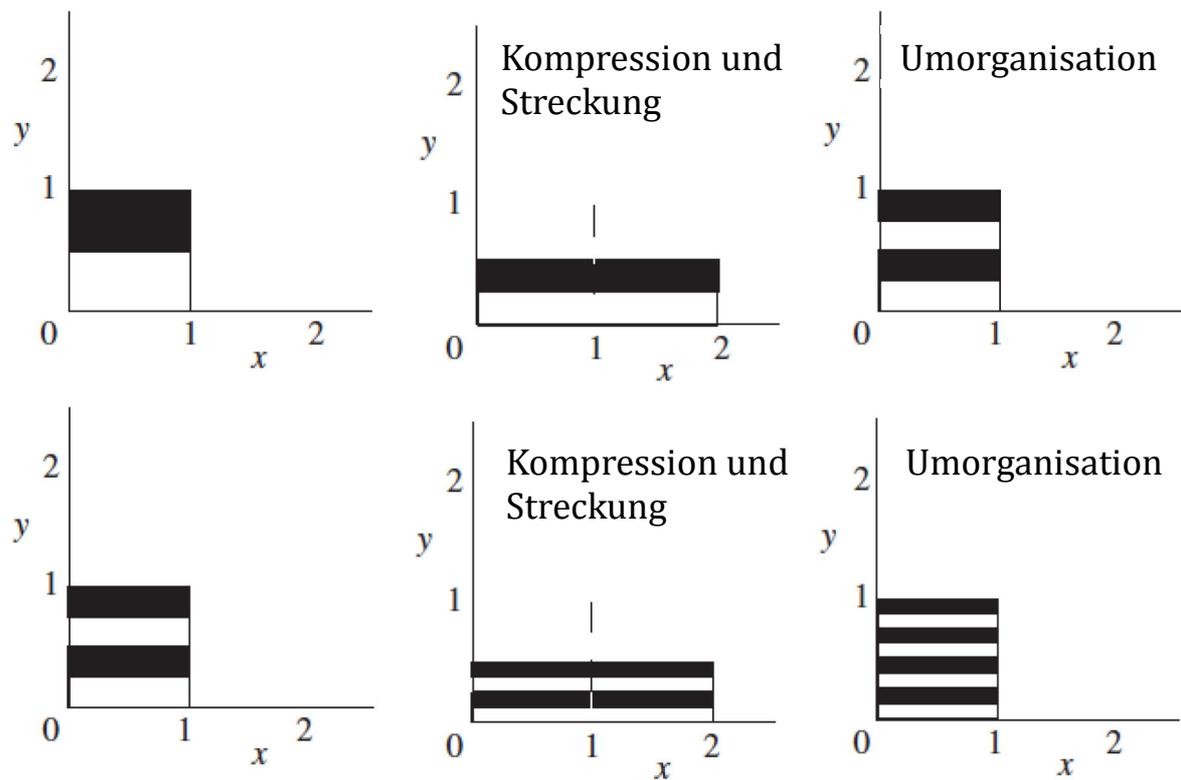


Abb. 2.18: Split-and-recombine Mischprinzip

Die innere Konstruktion des Raupenmischers stellt die praktische Umsetzung des SAR-Prinzips dar (Abb. 2.19).[86]

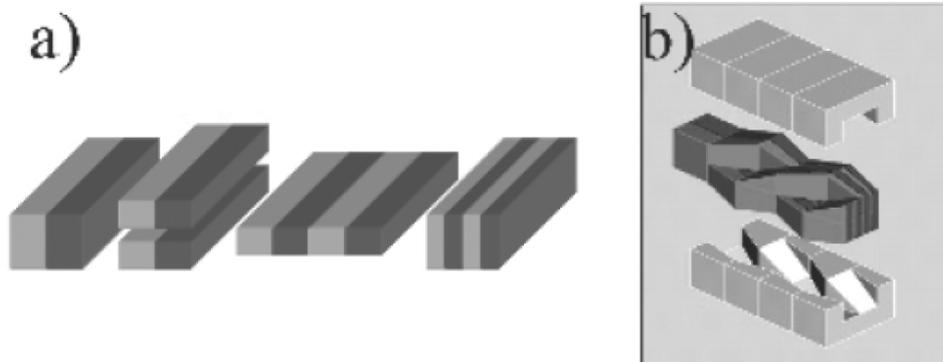


Abb. 2.19 [Schönfeld]: a) Split and Recombine Prinzip im CPMM
b) Namensgebendes raupenförmiges Mischprofil

Abb. 2.20 zeigt eine Hierarchie der Entwicklung des Raupenmischers, angefangen bei einem einfachen Dreiecksmischer. Die Umorganisation der Flüsse wird im CPMM bis zu 12 mal wiederholt, wodurch eine sehr hohe Durchmischung erzielt wird. Der Raupenmischer wird mit unterschiedlichen Strukturgrößen und Mischstufen angefertigt. Die Strukturbreiten liegen je nach Flussrate zwischen 300 und 1200 μm pro Kanal. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Mischer hat eine Strukturbreite von 300 μm und ermöglicht Flussraten bis zu 4 L/h. [87]

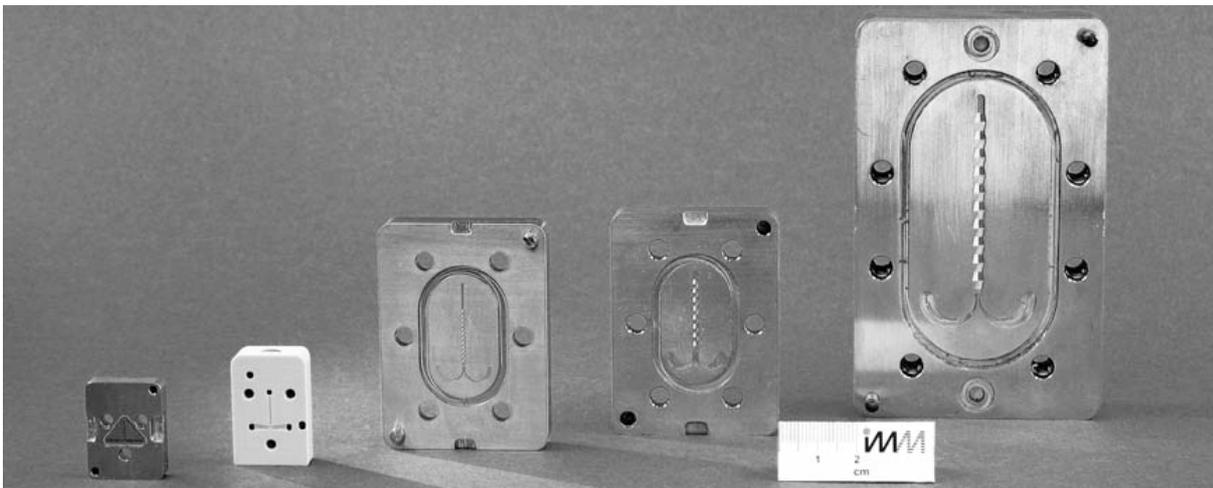


Abb. 2.20 [IMM]: Hierarchie der Weiterentwicklung des Raupenmischers
Angefangen vom Dreiecksmischer über die 300 μm zur 1200 μm Raupe

CFD-Simulationen zeigen jedoch, dass der Raupenmischer das SAR-Prinzip nicht perfekt realisieren kann. Unter den üblichen Flussbedingungen (niedrige Viskositäten der Lösungsmittel Wasser/THF) treten transversale Kräfte auf, die den Fluidstrom kontinuierlich ablenken. Durch die innere Reibung werden die Fluidlamellen gestört und ein ideales Mischungsbild lässt sich nicht mehr herstellen. Abbildung 2.21 zeigt eine Simulation des Mischungsvorgangs im Raupenmischer von Hexan und THF. Dabei entstehen sogenannte Dean-Wirbel, die den Mischungsprozess dominieren.[76]

Unter den realisierbaren Flussbedingungen kann also eher ein optimierter und kontrolliert-chaotischer Mischungsvorgang erwartet werden.

Der CPMM ist ein vielfach verwendeter Mikromischer, der breite Anwendungsmöglichkeiten bietet. Im Vergleich zum SFIMM und SIMM ist er durch seine einfachere Konstruktion leichter handhabbar und ist von Verstopfungen seltener betroffen.

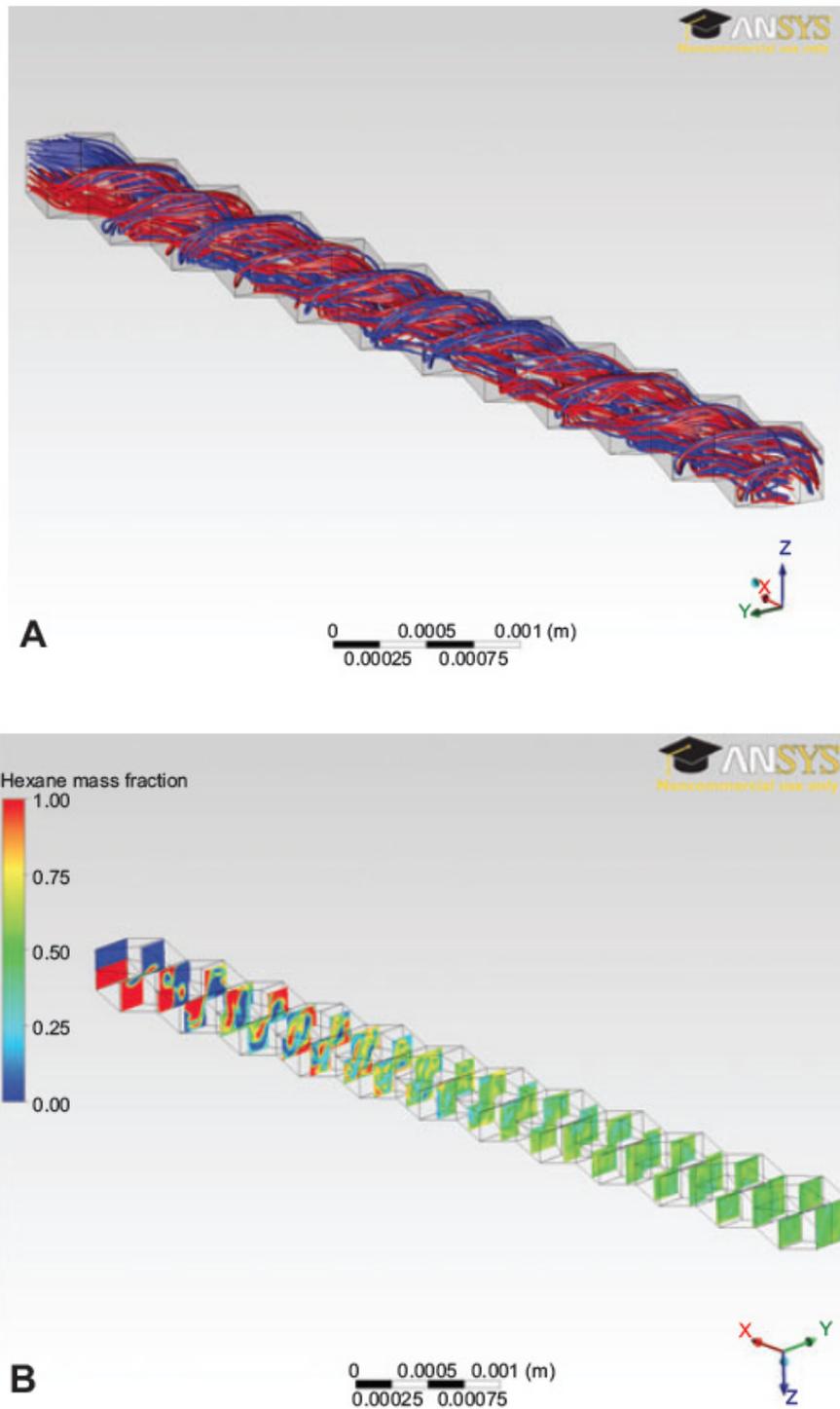


Abb. 2.21 [Ziegenbalg]: A: CFD-Simulation von Fluidströmen Hexan (rot) und THF (blau)
B: Konzentrationsprofil von Hexan innerhalb der 300 μm Raupe

2.6.4 Vergleich der verschiedener Architekturen

Abbildung 2.22 zeigt einen Vergleich von Mischzeiten bei asymmetrischen und symmetrischen Flussbedingungen. Es fällt auf, dass der benutzte 300 μm -Raupenmischer sowohl bei asymmetrischen als auch bei symmetrischen Flussbedingungen ähnliche Ergebnisse liefert. Das Mischprinzip der Multilamination im SIMM wird bei den asymmetrischen Flussbedingungen bestätigt. Durch die hydrodynamische Fokussierung aufgrund der Asymmetrie, werden die Lamellen komprimiert und die Mischzeiten um Größenordnungen verringert.

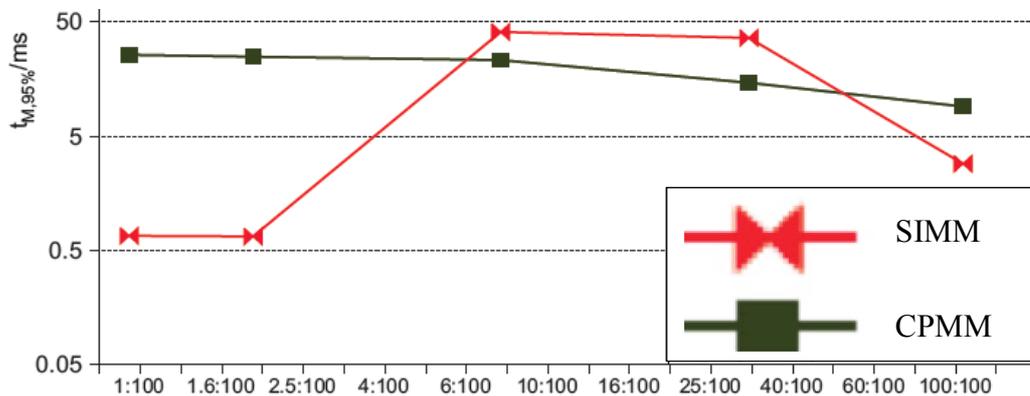


Abb. 2.22 [Ziegenbalg]: Mischzeiten unterschiedlicher Mikromischer von asymmetrischen (links) zu symmetrischen Flussbedingungen (rechts)

In Tabelle 2 sind die Mischzeiten und Reynoldszahlen für einige Mikromischer aufgelistet. Während die Mischzeiten von SIMM und CPMM im ähnlichen Bereich von 1-30 ms liegen, erzeugt der SFIMM noch schnellere Mischungen.[76, 84]

Tab. 2: Mischkennzahlen verschiedener Mikromischer[76]

Flussraten	1,8		0,17	
	R_e	$t_{M,95\%}$	R_e	$t_{M,95\%}$
Y-Mixer	174	4940	88	2919
300 μm Raupe	465	9	230	26
600 μm Raupe	228	79	115	239
SIMM	1293	3	652	1

Flussrate I ist konstant bei 1,8 ml/min. Damit ergeben sich einmal symmetrische (links) und asymmetrische (rechts) Flussbedingungen;
 $t_{M,95\%}$ (in ms) ist die Mischzeit bei der die Lösungen zu 95% homogenisiert ist

2.7 Beladung von Polymersomen

Für spätere Anwendungen von Polymersomen als Hohlstrukturen müssen diese weiter funktionalisiert bzw. beladen werden können. Da die PB-Membran sogar den inneren Kern vor einer pH-Veränderung schützen kann, eignen sich die Hohlstrukturen als Nanoreaktoren.[32] Sie schützen das Innere effektiv und haben abhängig von ihrer Größe ein definiertes Reaktionsvolumen. Eine enge Größenverteilung der Polymervesikel ist daher zwingend erforderlich, um diese Nanoreaktoren gezielt einsetzen zu können. Neben der Einsatzmöglichkeit als Reaktionsgefäß bietet sich auch die Möglichkeit, diese Vesikel als Wirkstoffträger oder Marker für biomedizinische Anwendungen zu nutzen. Sie zeichnen sich zusätzlich durch eine niedrige Toxizität aus.[88]

Neben der direkten Modifikation des Polymers anhand der reaktiven Gruppen (Abschnitt 2.3.3), bieten seine amphiphilen Eigenschaften zwei verschiedene Arten von Beladungen während der Selbstorganisation, nämlich hydrophile und hydrophobe Einlagerungen.

Die wichtigste Eigenschaft der vesikulären Hohlstruktur ist der mit Wasser gefüllte innere Kern.

Müller et al. zeigte die erfolgreiche Einlagerung des Farbstoffs Phloxin-B in die Polymersomen und konnte dabei auch die schützende Wirkung der Polybutadienschale vor dem äußeren Lösungsmittel nachweisen.[32]

Aufgrund der sehr stabilen und dicken Membranwand der PB-PEO Vesikel, können hydrophobe Beladungen ebenfalls leicht realisiert werden. Müller zeigte, dass sowohl eine hydrophobe Beladung mit dem Farbstoff Nilrot als auch Nanopartikel wie Quantum Dots möglich ist.[89] Durch Cryo-TEM Analysen konnte der Einlagerungsort dieser Quantum Dots innerhalb der PB Membran bestimmt werden. Die Membrandwand von Polymersomen ist im Vergleich zu der von Liposomen dicker und erhöht die Kapazität für hydrophobe Moleküle und Partikel stark. In dieser Arbeit werden neben der Beladungsmöglichkeit mittels Mikromischer auch dessen Auswirkungen auf die Selbstorganisation untersucht.

Die eingesetzten Partikel werden im folgenden noch einmal ausführlich behandelt.

2.7.1 Quantum Dots

Durch den Einzug der Nanotechnologie in die Halbleiterchemie konnten sehr stark fluoreszierende Nanopartikel – sogenannte „Quantum Dots“ – entwickelt werden. Quantum Dots aus Cadmiumselenid (CdSe) sind mittlerweile sehr gut untersucht und zeichnen sich durch starke Fluoreszenz in unterschiedlichen Wellenlängen aus. Die Partikel haben etwa einen Durchmesser von 1-10 Nanometer und zeigen ein anderes physikalisches Verhalten als das korrespondierende Bulkmaterial.[90, 91]

Der Halbleiter stellt den Grenzfall zwischen einem Leiter und einem Nichtleiter dar. Die sogenannten Energiebänder, bestehend aus mit Elektronen gefülltem Valenzband VB und leerem Leitungsband LB, überlappen bei einem Leiter. Der Halbleiter zeichnet sich durch eine konstante Bandlücke $E_g(\text{Bulk})$ aus, da die Bänder sich hier nicht überlappen. Anders als bei einem Nichtleiter können bei einem Halbleiter durch geringe Energiezufuhr Elektronen vom Valenzband ins Leitungsband überspringen.

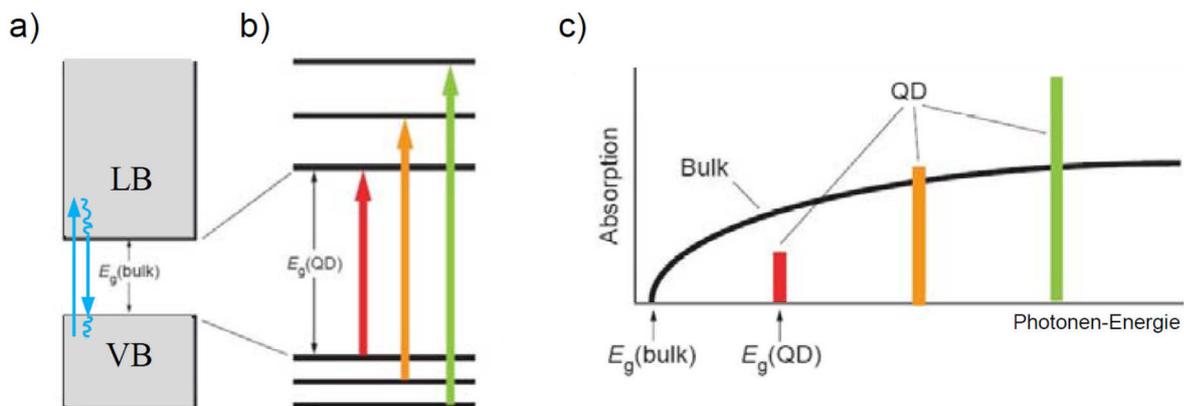


Abb. 2.23 [Klimov]: a) Bandlücke eines Halbleiters; b) Nötige Photonenenergie für Anregungszustände
 c) Absorptionsschema im Bulk und korrespondierende Quantumdots[92]

Energiebänder bilden sich aus, wenn sich diskrete Energiezustände durch Annäherung anderer Atome verschieben. Je größer die Anzahl zusammenhängender Atome im Bulkmaterial, desto geringer wird der Abstand und die diskreten Energiezustände gehen in Bänder über. Nanokristalle im Bereich von 1-10 nm zeigen zwar schon eine Verschiebung der Energiezustände, haben aber noch keine Energiebänder. Je größer das Nanopartikel ist, desto kleiner wird die Energielücke $E_g(\text{QD})$ bis sie dem des Bulkmaterials entspricht. Dies wird als Größenquantisierungseffekt bezeichnet (Abb. 2.23).[92]

Quantum Dots bilden durch Absorption ein Elektron-Loch-Paar. Bei der Rekombination von diesem Paar wird Fluoreszenzstrahlung freigesetzt. Durch die Anpassung der Größe der Nanopartikel können unterschiedliche Wellenlängen des emittierten Lichts realisiert werden.

Zum Beispiel emittieren 10 nm große Partikel rotes Licht, während nur 2 nm große Partikel durch die größere Energielücke blaues, energiereicheres Licht aussenden.

Durch die große Oberfläche im Vergleich zu ihrem Volumen sind solche Partikel chemisch leicht angreifbar. Um sie gegen Photooxidation oder andere Einflüsse zu schützen, werden diese Partikel oft mit zusätzlichen anorganischen Schalen versehen. Hierbei wird oft CdS, ZnS oder beides verwendet (Abb. 2.24). Außerdem erhöhen diese Schalen die Fluoreszenzquantenausbeute. Um vor Aggregation in Lösungsmitteln zu schützen, werden zusätzlich entweder hydrophobe Oberflächenliganden wie Trioctylphosphinoxid (TOPO) oder cis-9-Octadecensäure (Ölsäure) verwendet. Es können aber auch hydrophile Funktionalisierungen mit PEG durchgeführt werden, um diese wasserlöslich zu machen.[93, 94]

Neben der hohen Fluoreszenzausbeute und Stabilität, bieten diese Nanopartikel einen guten Kontrast im Transmissionselektronenmikroskop. Die in dieser Arbeit verwendeten Quantum Dots mit Fluoreszenzwellenlänge bei ca. 600 nm (Kern-Schale-Schale CdSe/CdS/ZnS mit 5,7 nm Durchmesser) wurden von Michaela Wagner (AK Basche, Universität Mainz) analog zur Literatur synthetisiert[91, 95, 96]. Kern-Schale-Schale Quantum Dots mit Fluoreszenzwellenlänge von 530 nm wurden von Can GmbH (Hamburg) bezogen. Beide Nanopartikel sind mit hydrophoben Oberflächenliganden funktionalisiert und können nur innerhalb der hydrophoben Schale eingebaut werden.

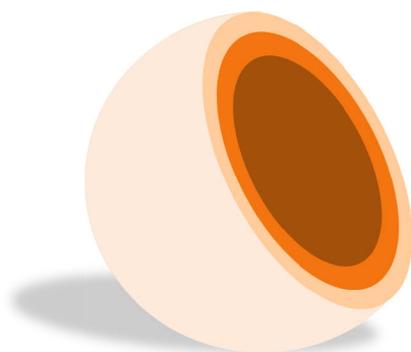


Abb. 2.24: Kern-Schale-Schale Quantum Dot (CdSe-CdS-ZnS)

2.7.2 Super-Paramagnetische Eisenoxidnanopartikel

Eisenoxidnanopartikel sind aus der heutigen Medizintechnik nicht mehr weg zu denken. Durch ihre Biokompatibilität werden sie bereits als MRT-Kontrastmittel eingesetzt.[97] Die etwa 5-20 nm großen Partikel zeigen superparamagnetische Eigenschaften mit hoher Sättigungsmagnetisierung. Durch die relativ einfache und kostengünstige Synthese werden sie auch in der Forschung als stimuli-responsive Materialien für Wirkstofftransport oder Hyperthermie verwendet. [98, 99]

Die meisten Eisenoxidnanopartikel bestehen aus Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) oder Magnetit (Fe_3O_4). Magnetit kristallisiert in einer inversen Spinell Struktur mit kubisch-flächenzentrierter Elementarzelle, dabei liegen die Sauerstoffatome in einer kubisch dichtesten Kugelpackung vor. Die Tetraederlücken werden durch Fe^{III} besetzt, während Oktaederlücken sowohl von Fe^{II} als auch Fe^{III} besetzt werden. Dies führt zur inversen Spinellstruktur $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}]\text{O}_4$, wobei die Atome, die innerhalb der eckigen Klammer angegeben sind, die Oktaederlücken besetzen.

Im Unterschied zu Hämatit ist Maghemit trotz seiner gleichen Zusammensetzung aus Fe_2O_3 stark magnetisch. Das resultiert aus einer Defektstruktur, da es sich zum Beispiel durch Oxidation von Magnetit bildet. Diese Oxidation der Eisen-atome ist mit einer Wanderung von Kationen innerhalb des Kristallgitters verbunden. Die sich daraus ergebende Summenformel lautet $0,75\text{Fe}^{\text{III}}_{3/4}[\text{Fe}^{\text{III}}_{5/3}\text{X}_{1/3}]\text{O}_4$ (X: Leerstelle). Die ungeordnete Struktur unterschiedlicher Oxidationsstufen führt zu einem Ungleichgewicht der Spinorientierung und resultiert in einem ferrimagnetischen Verhalten des Materials. Die ähnliche Struktur erklärt auch, warum sich aus Magnetit Maghemit bildet. Bei der Synthese von Nanopartikeln ergeben sich folglich oft Mischungen aus diesen beiden Varianten des Eisenoxids.

Bezüglich der magnetischen Eigenschaften hat Magnetit ($M_s(300\text{ K}) = 92\text{ emu/g}$) eine höhere Sättigungsmagnetisierung als Maghemit ($M_s(300\text{ K}) = 78\text{ emu/g}$). Durch die relativ einfach ablaufende Oxidation ist es instabil und findet daher seltener Anwendungen.[100]

Die verwendeten Eisenoxidnanopartikel wurden als sogenanntes Ferrofluid gekauft. Es besteht aus Magnetitpartikeln mit einem Durchmesser von 5-10 nm. Diese Partikel wurden durch basische Fällung einer Mischung aus Fe^{II} und Fe^{III} Salzen hergestellt und mittels Ölsäure hydrophob stabilisiert.[101] Es besteht zu etwa 80w% aus Eisenoxid und ist in Mineralöl gelöst. Durch die Hydrophobizität ist nur eine Einlagerung innerhalb der hydrophoben Schale im Polymersom möglich, da sie andernfalls in Wasser ausfallen.

2.7.3 Beladung mittels Mikromischer

In den vorhergegangenen Arbeiten von Müller ist vor allem auf die hydrophile und hydrophobe Beladung eingegangen worden. Dabei erfolgte die Beladung sowohl während der Synthese mittels Cosolvent als auch während der Filmrehydratation. Für die hydrophoben Partikel und Farbstoffe war es schwierig eine effiziente Einkapselung zu ermöglichen. Dies lag an zur Einlagerung gegenläufigen Abläufen, beispielsweise der Ausfällung von Nilrot innerhalb der wässrigen Umgebung. Die Einlagerung von Quantum Dots mittels Cosolvent-Methode scheiterte komplett und wurde deshalb ausschließlich mit der Filmrehydratation durchgeführt. Die hydrophobe Oberflächenfunktionalisierung der Partikel führt zur Ausfällung noch bevor die Selbstorganisation einsetzt. Genau hier bietet der Einsatz von Mikromischern einen Ausweg.

Die Mikromischertechnologie ermöglicht während der kontinuierlichen Synthese eine Beladung der Vesikel. Im Mikromischer werden die Lösungen gleichmäßig und schnell gemischt. Die für die Cosolvent-Methode benötigte Zeit wird dabei sehr stark verkürzt. Eine Fällung kann eventuell verhindert werden, indem die Zeitspanne zwischen Fällung und Einsetzen der Selbstorganisation verkürzt wird.

3 Charakterisierungsmethoden

3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit dem Ziel immer kleinere Strukturen (z.B. von Nanopartikeln) beobachten zu können, musste das Auflösungsvermögen im Vergleich zu konventionellen Mikroskopen deutlich verbessert werden.

Beim Transmissionselektronenmikroskop werden beschleunigte Elektronen anstelle sichtbaren Lichts verwendet. Die Strahlung von elementaren Teilchen wie z.B. Elektronen besitzt eine erheblich kürzere Wellenlänge ($\lambda \sim 10^{-3}$ nm) als Licht ($\lambda \sim 380-750$ nm). Daher erreicht man mit dem Transmissions-elektronenmikroskop im Vergleich zum Lichtmikroskop ($\delta_{\min} = 200$ nm) eine wesentlich bessere Auflösung ($\delta_{\min} = 0,1-0,2$ nm).

Das Auflösungsvermögen konnte soweit verbessert werden, dass Probenuntersuchungen im atomaren Bereich möglich sind. Beim Transmissionselektronenmikroskop durchstrahlen die Elektronen das Probenmaterial, das zu diesem Zweck entsprechend dünn sein muss. Es ist ein Arbeiten im Hochvakuum im Bereich von 10^{-2} - 10^{-8} Pa notwendig, da andernfalls die Elektronen von Gasmolekülen gestreut würden. Wie auch mit einem Lichtmikroskop, können mit einem Transmissionselektronenmikroskop Aufnahmen im Hell- und Dunkelfeld angefertigt werden. Darüber hinaus bietet TEM auch noch die Möglichkeit zur Aufnahme von Beugungsbildern.

Als Strahlenemitter kommen im TEM vor allem thermische und Feld-emissionsquellen zum Einsatz.

Der Strahlengang eines TEM gleicht dem eines Lichtmikroskops (Abb. 3.1). [102] Allerdings bestehen die Linsen hier nicht aus lichtbrechendem Glas, sondern aus elektromagnetischen Spulen die die Elektronen ablenken. Die Abbildung erfolgt durch einen Leuchtschirm, der die Elektronen in sichtbares Licht umwandelt

bzw. durch eine CCD-Kamera, die eine leichte Datenverarbeitung ermöglicht.[102]

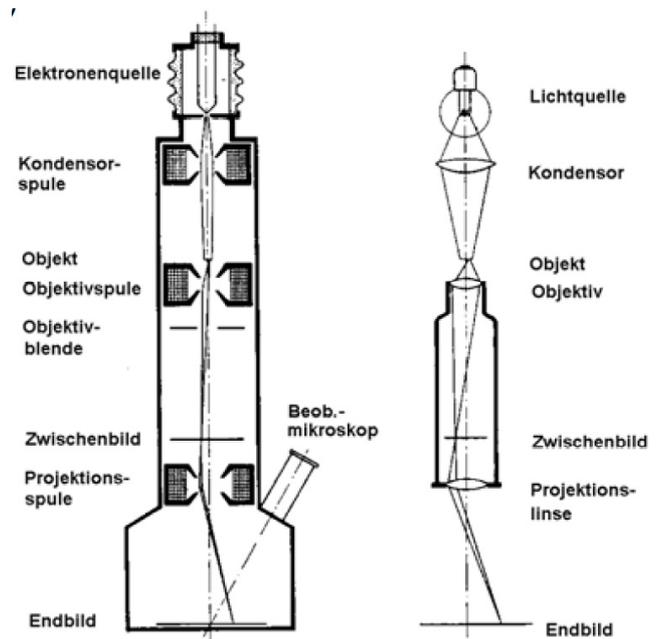


Abb. 3.1 [Vogel]: Strahlengang eines TEM (l) analog zum Lichtmikroskop (r)

Die Probenpräparation erfolgt durch Eindampfen einer gelösten Probe auf einem graphitbeschichteten Kupfernetz (Grid) bzw. durch Anfertigung extrem dünner Schnitte fester Proben. Dünne Schichten werden vom Elektronenstrahl durchleuchtet und streuen ihn aufgrund ihrer Dicke bzw. ihrer Ordnungszahl der beinhalteten Atome (Massen-Dicken-Kontrast). Auf dem Leuchtschirm bzw. CCD-Sensor entsteht dadurch eine Intensitätsverteilung, die der Probenstruktur entspricht und abgebildet werden kann.

Das Eindampfen ist für die Verwendung im Hochvakuum zwingend notwendig, daher müssen die untersuchten Proben im trockenen Zustand stabil sein. Die Struktur von Polymersomen muss fixiert werden, wie dies bei der Vernetzung der PB-PEO-Vesikel möglich ist (siehe Abs. 2.3.3). Bei den meisten Polymersomen ist eine derartige Fixierung nicht möglich. Es muss auf Cryo-Tem zurückgegriffen werden, um sie und unvernetzte PB-PEO-Vesikel im natürlichen Medium abbilden zu können.

3.1.1 Cryo-Transmissionselektronenmikroskop (Cryo-TEM)

Die Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie ist eine Methode zur Messung von Materialien, die in ihrem natürlichem Medium Wasser abgebildet werden sollen. Die wasserlösliche Probe wird hierbei auf ein dünnes Kupfernetz aufgetragen und durch Abtupfen vom übrigen Wasser befreit, so dass nur noch ein sehr dünner Wasserfilm auf dem Netz zurückbleibt. Anschließend wird die Probe in flüssigem Propan schockgefroren. Bei diesem Gefriervorgang bleibt dem Wasser nicht genügend Zeit um auszukristallisieren und die Probe wird in glasartigem Wasser konserviert. Das glasartige Wasser bietet nur einen sehr geringen Kontrast und eignet sich daher besonders gut als Matrix für die Elektronenmikroskopie. Die Probe darf auf keinen Fall zwischenzeitlich auftauen, da sonst das Wasser zu kristallisieren beginnt und die Probe unwiderruflich trübt und somit eine Analyse unmöglich macht.[103]

3.2 Lichtstreuung

Die Lichtstreuung bietet eine zerstörungsfreie Analyse von gelösten Proben und liefert sowohl statische als auch dynamische Informationen. Sie hat sich zu einer sehr wichtigen Methode zur Charakterisierung von Polymeren entwickelt.[104] Für dieses Verfahren werden Laser eingesetzt, deren Licht von einer Probe gestreut und anschließend analysiert wird. Das elektrische Feld des Laserlichts regt die Elektronenhüllen der Probe zu Schwingungen an. Durch die Schwingung entsteht ein Herz 'scher Dipol und sendet durch elastische Streuung Licht mit der gleichen Wellenlänge in alle Raumrichtungen aus. Diese gestreute Strahlung wird mittels eines Detektors, wie in Abb. 3.2 dargestellt, winkelabhängig analysiert.

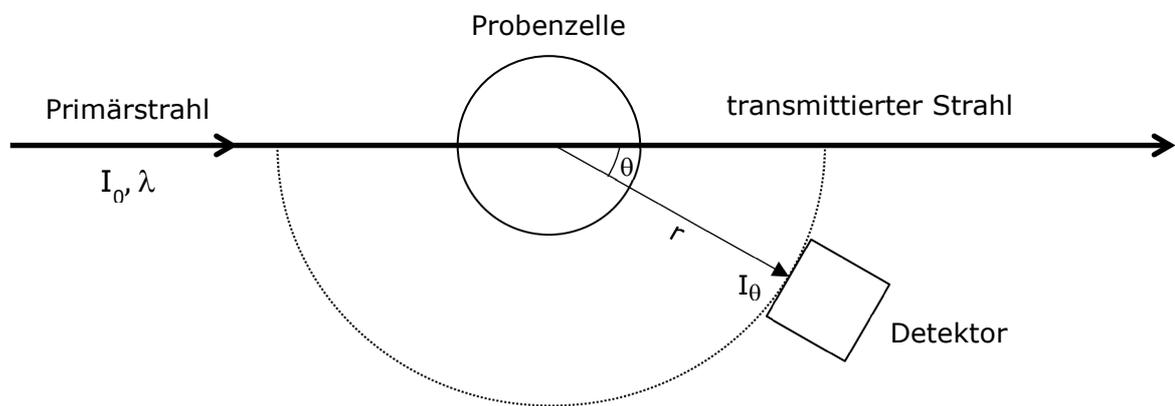


Abb. 3.2: Aufbau einer Lichtstreuungsanlage

Die gestreute Strahlung kann auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet werden. Wird das zeitliche Mittel der gestreuten Strahlung betrachtet, liefert dies die statischen Lichtstreuungseigenschaften wie Gewichtsmittel der Molmasse, den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks A_2 oder das z-Mittel des Trägheitsradius.

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden die zeitlichen Fluktuationen des gestreuten Lichts betrachtet, welche uns dann die dynamischen Eigenschaften wie das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten liefert, das wiederum die Berechnung des hydrodynamischen Radius erlaubt.

3.2.1 Statische Lichtstreuung (SLS)

Das Phänomen der Lichtstreuung wurde zuerst von Lord Rayleigh ausführlich erforscht. Er erstellte die erste Formel die den von Tyndall beobachteten Effekt, dass kürzere Wellenlängen stärker streuen als längere Wellenlängen, in einer Formel dar:

$$R(\theta) = \frac{I r^2}{I_0} = \frac{16\pi^4}{\lambda_0^4} \sum_{k=1}^{\infty} N_k \alpha_k^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad (3.1)$$

$R(\theta)$:	Rayleighverhältnis als Funktion des Streuwinkels θ
I :	Intensität des gestreuten Lichts
I_0 :	Intensität des Primärstrahls
r :	Abstand des Detektors von der Probe
λ_0 :	Wellenlänge des eingehenden Strahls
N_k :	Anzahl der Streuzentren
α_k :	Polarisierbarkeit des Streuzentrums k
θ :	Winkel zwischen Primärstrahl und gestreutem Strahl

Die gemessene Streuintensität wird meist nur in relativen Einheiten gemessen. Daher wird zunächst die absolute Streuintensität der reinen Lösungsmittel mittels spezieller experimenteller Aufbauten bestimmt. Diese Flüssigkeiten werden dann zur Kalibrierung benutzt, um andere absolute Streuintensitäten zu bestimmen. Für das Rayleighverhältnis ergibt sich nun:

$$R(\theta) = \frac{I_{\text{Lösung}} - I_{\text{Lösungsmittel}}}{I_{\text{Standard}}} \cdot R R_{\text{standard}} \quad (3.2)$$

Damit können alle speziellen Parameter, die vom experimentellen Aufbau herrühren, wie Streuvolumen, Abstand vom Detektor r , Primärstrahlintensität eliminiert werden.

Smoluchowski, Einstein und Debye entwickelten die Fluktuationstheorie. Nach dieser Theorie beruht die Streuung des Lichts auf Schwankungen der Polarisierbarkeit α , hervorgerufen durch Dichte- und Konzentrations-schwankungen in Folge der thermischen Bewegung im Streumedium.

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^2 N_L} \left\{ \rho \cdot n_0^2 \left(\frac{dn}{d\rho} \right)^2 RT\beta + \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{-d\Delta\mu}{dc} \right) \right\} \quad (3.3)$$

N_L :	Loschmidtkonstante
ρ, ρ_0 :	Dichte der Lösung und des Lösungsmittels
n, n_0 :	Brechungsindex der Lösung und des Lösungsmittels
R :	Universelle Gaskonstante
T :	Absolute Temperatur in Kelvin K
β :	Isotherme Kompressibilität
M_0 :	Molare Masse des Lösungsmittels
c :	Konzentration des gelösten Materials
$\left(\frac{-d\Delta\mu}{dc} \right)$:	Differenz der chemischen Potentiale der Lösung und des Lösungsmittels
$\left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)$:	Brechungsindexveränderung bedingt durch Konzentrationsschwankungen
$\left(\frac{dn}{d\rho} \right)$:	Brechungsindexveränderung bedingt durch Dichtefluktuation

Da die Streuintensität der Lösung in Relation zu der des reinen Lösemittels gemessen wird, sind Dichteschwankungen und Temperatureffekte für verdünnte Polymerlösungen vernachlässigbar. Nur die Konzentrationsschwankungen sind zu berücksichtigen.

$$R(\theta) = R(\theta)_{\text{Lösung}} - R(\theta)_{\text{Lösemittel}} = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \frac{RT M_0 c}{\rho_0 \left(\frac{-d\Delta\mu}{dc}\right)} \quad (3.4)$$

Die Änderung der chemischen Potentiale mit der Konzentration kann auch als Änderung des Osmotischen Drucks beschrieben werden:

$$-\left(\frac{d\Delta\mu}{dc}\right) = \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{d\Pi}{dc}\right) \quad (3.5)$$

Mit der Reihenentwicklung des Osmotischen Drucks

$$\left(\frac{d\Pi}{dc}\right) = RT \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c + 3A_3 c^2 + \dots\right) \quad (3.6)$$

A_2, A_3 : Virialkoeffizienten des Osmotischen Druckes

ergibt sich nun die Lichtstreuungsgleichung für kleine Teilchen ($d \leq \lambda / 20$):

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c + 3A_3 c^2 + \dots\right) \quad (3.7)$$

$$\text{mit } K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \text{ der optischen Konstante} \quad (3.8)$$

M: Molare Masse des gelösten Stoffes

Für größere Teilchen gilt diese Gleichung nicht mehr, da intrapartikuläre Interferenzen auftreten. Diese schwächen mit zunehmendem Streuvektor die Intensität des gestreuten Strahls ab. Der Partikelformfaktor $P(\vec{q})$ beschreibt diesen Verlauf der Intensität mit dem Streuvektor q .

$$P(\vec{q}) = \frac{1}{N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle \exp(i\vec{q}\vec{r}) \rangle \quad (3.9)$$

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.10)$$

Unter Berücksichtigung von Formel (3.9) ergibt sich nun mit einigen Vereinfachungen die bekannte Zimmgleichung (3.11), deren Auswertung das Gewichtsmittel der Molmasse M_w , den z-gemittelten quadratischen Trägheitsradius und den 2. Virialkoeffizienten des Osmotischen Drucks erlaubt.

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z + \dots \right) + 2A_2c + \dots \quad (3.11)$$

$$\text{mit } M_w = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} \quad (3.12)$$

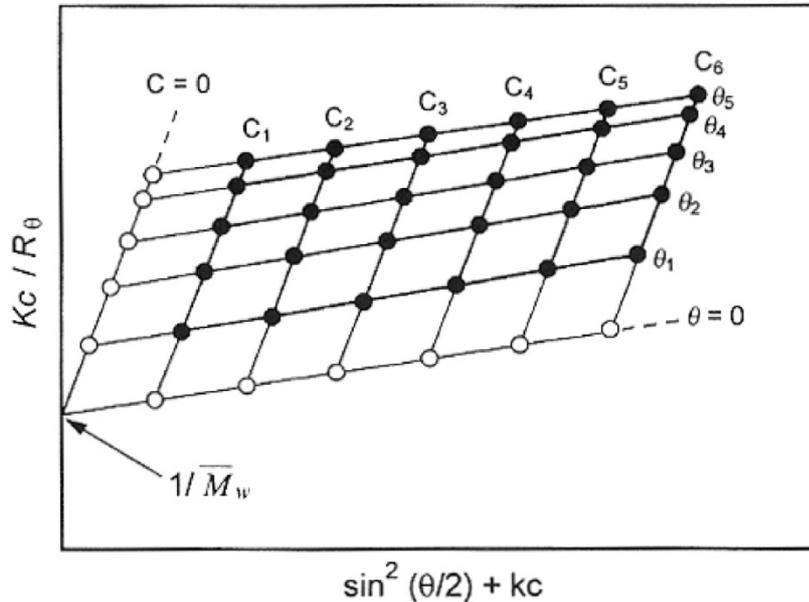


Abb. 3.3 [Tieke]: Auswertung mit Hilfe des Zimmplots

Mit Hilfe des Zimmplots (Abb. 3.3) kann man experimentell die gewichtsgemittelte Molmasse, den zweiten Virialkoeffizienten A_2 und den z-gemittelten Trägheitsradius bestimmen. [105]

3.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit Aufkommen des Computerzeitalters wurde die gesamte Elektronik immer weiter verbessert. Somit wurde es möglich Zeitabstände im Nanosekundenbereich aufzulösen. Dies ist die Grundlage der dynamischen Lichtstreuung.

Hierbei wird nicht wie bei der statischen Lichtstreuung ein zeitliches Mittel der Streuintensität betrachtet, sondern die Intensitätsfluktuation.

Durch die Diffusion gelöster Partikel in der Probe werden die Fluktuationen der Streuintensität ausgelöst. Dabei bewegen sich größere Partikel bei gleicher Temperatur bedingt durch die Brown'sche Molekularbewegung langsamer als kleine Teilchen. Daher ist die Veränderung der Intensität bei kleinen Teilchen schneller als bei den Proben mit größeren Teilchen.

Um nun den Diffusionskoeffizienten der Teilchen zu bestimmen, werden die detektierten Photonen mit sich selbst korreliert. Dazu benutzt man die Autokorrelationsfunktion, die dem Produkt aus Streuintensität zum Zeitpunkt t und dem Zeitpunkt $t+n \cdot \tau$ entspricht.

$$g_2(\tau) = \langle I(t)I(t + n \cdot \tau) \rangle \quad (3.13)$$

τ stellt dabei das kleinste mögliche Zeitintervall dar. Dies wird für sehr viele n und unterschiedliche Startzeiten wiederholt und anschließend über alle Werte gemittelt. Als maximalen Wert für $g_2(\tau)$ erhält man nun das Quadrat der Streuintensität $\langle I^2 \rangle$ zum Startpunkt t . Mit zunehmender Korrelationszeit fällt diese Funktion auf den Wert $\langle I \rangle^2$ ab (Abb. 3.4). Bei kleinen Teilchen fluktuiert das Signal deutlich schneller. Somit fällt die Korrelationsfunktion schneller ab als bei größeren Teilchen, die eine längere Korrelationszeit aufweisen.[106]

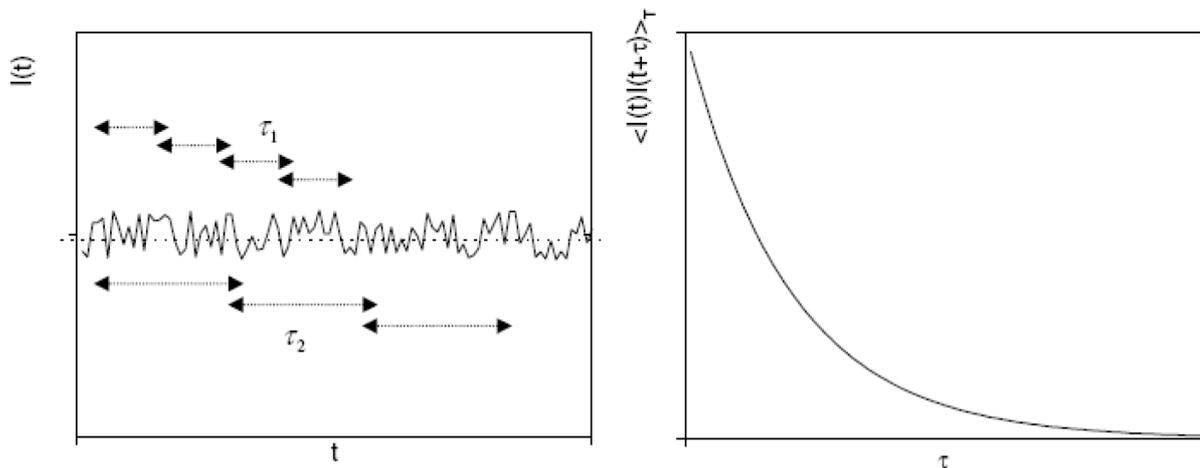


Abb. 3.4 [Schärtl]: Fluktuation der Streuintensität (links) mit korrespondierender Autokorrelationsfunktion $g_2(t)$ (rechts)

Die Siegert-Relation

$$g_1(\tau) = B \cdot \exp(-q^2 D \tau) = \sqrt{\frac{g_2(\tau) - A}{A}} \quad (3.14)$$

liefert aus der Autokorrelationsfunktion $g_2(\tau)$ und der experimentell ermittelten Basislinie $A = \langle I \rangle^2$ die Amplitudenkorrelationsfunktion $g_1(\tau)$. Die Funktion folgt einem einfach exponentiellen Abfall. Dabei steht B für das Signal-Rausch-Verhältnis und kann durch den optischen Aufbau des Experiments beeinflusst werden. Die Konstante D ist der translatorische Diffusionskoeffizient, q ist der Streuvektor und hängt von der gewählten Wellenlänge des Laserlichts und dem Winkel ab. Für monodisperse und monomodale Partikel ergibt sich bei logarithmischer Auftragung eine Gerade mit der Steigung $-q^2 D$.

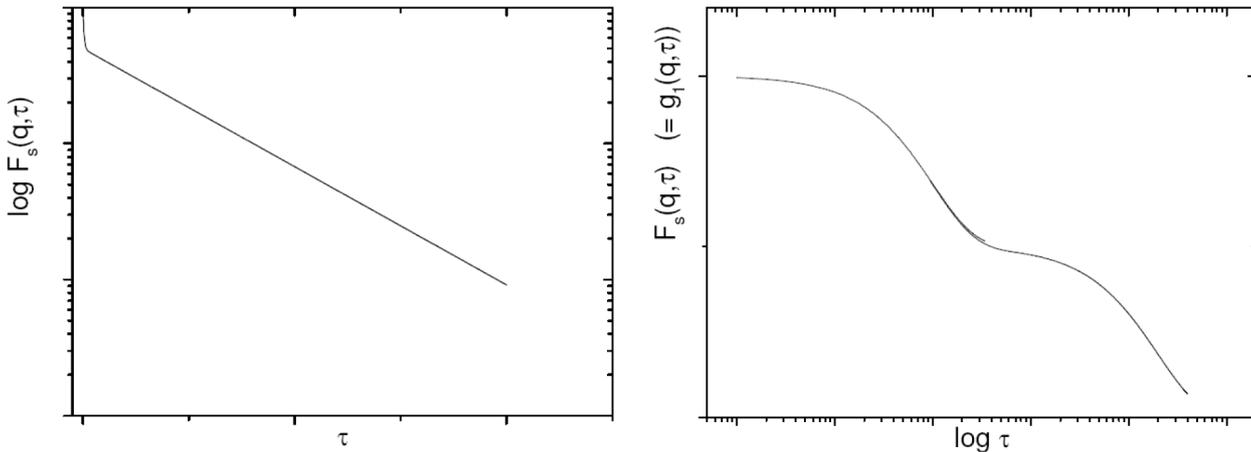


Abb. 3.5 [Schärtl]: Bimodale Korrelationsfunktion mit unterschiedlichen logarithmischen Auftragungen

Bei monodispersen aber polymodalen Proben ergeben sich unterschiedliche Diffusionskoeffizienten, welche zu einer bimodalen Funktion wie in Abb. 3.5 führen. Dazu muss jedoch der Unterschied der Diffusionskoeffizienten mindestens Faktor 3 betragen. Unterhalb dieses Faktors gehen beide Funktionen ineinander über, wodurch eine differenzierte Betrachtung nicht mehr möglich ist.

Für polydisperse Partikel ergibt sich die Korrelationsfunktion aus der Summe aller Exponentialfunktionen der einzelnen Komponenten i:

$$g_1(\tau) = B \frac{\sum m_i M_i \exp(-q^2 D_i \tau)}{\sum m_i M_i} \quad (3.15)$$

Bei einer logarithmischen Auftragung erhält man nun bei sehr kleinen Winkeln den apparenten Diffusionskoeffizienten. Dieser ist eine Wichtung aller Partikelfunktionen.

$$\left[\frac{d(\ln g_1(\tau))}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = -q^2 \frac{\sum m_i M_i D_i}{\sum m_i M_i} \equiv -q^2 D_{app} \quad (3.16)$$

Hierbei werden sowohl die Korrelationsfunktionen der kleinen, aber auch der großen Teilchen berücksichtigt.

$$g_1(q, \tau) = \sum n_i M_i^2 P_i(q) \cdot \exp(D_i q^2 \tau) \quad (3.17)$$

Eine Möglichkeit zur Auswertung dieser Funktion ist die Annäherung mit einer Kumulantenreihe, welche allerdings nur für kleine Abweichungen von <20% gilt.

$$\ln g_1(q, \tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{\kappa_2}{2!} \tau^2 - \frac{\kappa_3}{3!} \tau^3 + \dots \quad (3.18)$$

$$\text{Der erste Kumulant } \kappa_1 = \overline{D_s} q^2 \quad (3.19)$$

liefert den gemittelten Diffusionskoeffizienten D_s und damit einen Mittelwert des hydrodynamischen Radius der Partikel. Der zweite Kumulant ist

$$\kappa_2 = \left(\overline{D_s^2} - \overline{D_s}^2 \right) q^4 \quad (3.20)$$

und liefert bei rein translatorischen Bewegungen ein Maß für die Polydispersität der Probe an.[107]

$$\sigma_D = \frac{\sqrt{D_s^2 - \overline{D_s}^2}}{\overline{D_s}} = \sqrt{\frac{\kappa_2}{\kappa_1^2}} = \sqrt{\mu_2} \quad (3.21)$$

μ_2 -Werte unter 0,04 zeigen also eine Abweichung von weniger als 20% an. Es handelt sich hier um eine starke Vereinfachung, denn die Polydispersität hängt auch von der Verteilungsfunktion der Partikelgrößen wie zum Beispiel einer Gaußverteilung ab.

Wie bereits gezeigt, ist der ermittelte Selbstdiffusionskoeffizient durch die Wichtung mit dem Partikelformfaktor q -abhängig. Das bedeutet, dass kleinere Teilchen bei größerem Winkel mehr gewichtet werden, da sich durch intrapartikuläre Interferenzen bei größeren Winkeln für große Teilchen ein kleinerer Formfaktor ergibt (Abb. 3.6).[106]

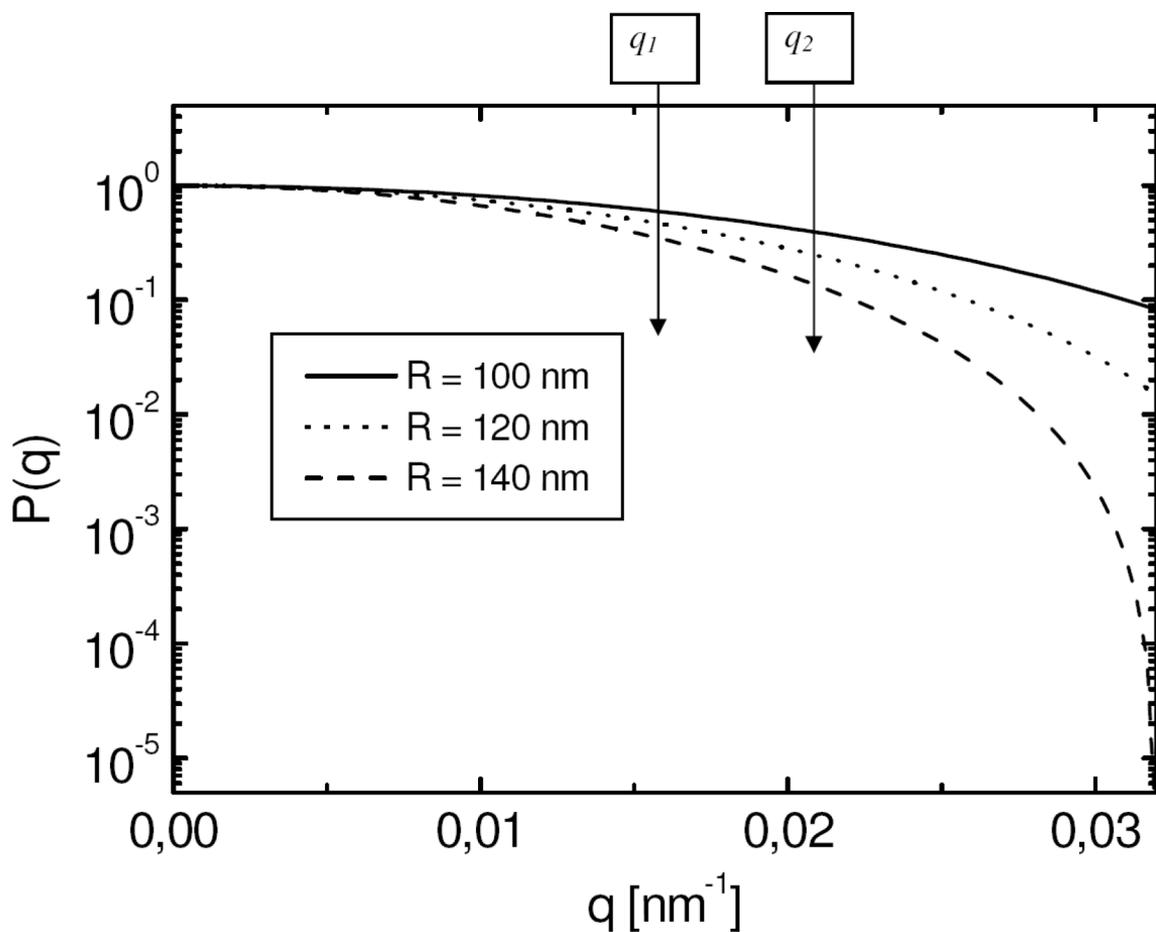


Abb. 3.6 [Schärtl]: Verlauf der Formfaktoren bei einer polydispersen Probe

Gleichung 3.23 zeigt uns nun den vereinfachten apparenten Diffusionskoeffizienten $D_{app}(q)$. Unter Vernachlässigung der Konzentrationsabhängigkeit von A_2 lässt sich durch Extrapolation gegen $q=0$ der z -gemittelte Diffusionskoeffizient $\langle D \rangle_z$ erhalten (Abb. 3.7).

$$D_{app}(q) = D_{s,z} (1 + K \langle R_g^2 \rangle_z q^2) \quad (3.22)$$

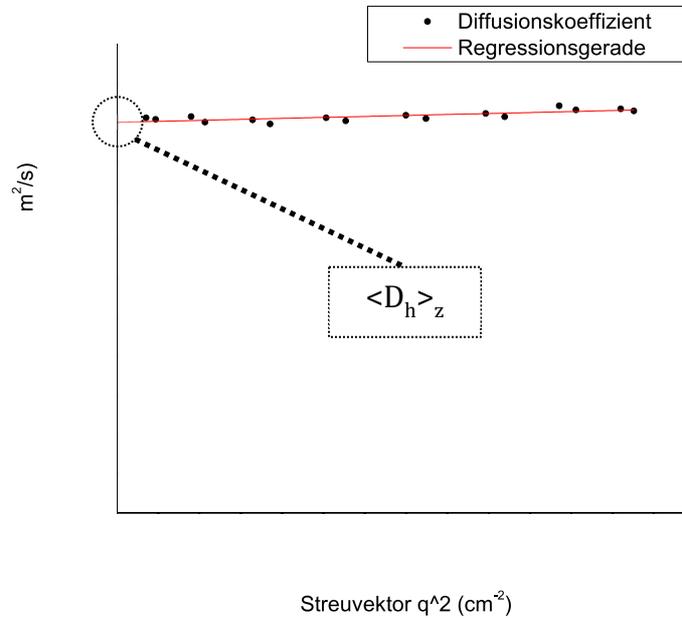


Abb. 3.7: Ermittlung des z-gemittelten Diffusionskoeffizienten durch Extrapolation gegen $q=0$

Die Berechnung des hydrodynamischen Radius erfolgt anschließend über die Stokes-Einstein-Beziehung:

$$R_h \equiv \left(\frac{1}{R_h} \right)_z^{-1} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} \quad (3.23)$$

T steht hier für die Temperatur, η_0 für die Lösemittelviskosität und k für die Boltzmannkonstante.

3.2.3 Das ρ -Verhältnis

Das ρ -Verhältnis ist wie folgt durch den Trägheitsradius R_g und den kugeläquivalenten hydrodynamischen Radius R_h definiert[108]:

$$\rho = \frac{\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}}{\left(\frac{1}{R_h} \right)_z^{-1}} \quad (3.24)$$

Durch den Vergleich des experimentell aus statischer und dynamischer Lichtstreuung bestimmten ρ -Wertes mit dem theoretisch berechneten Wert, ist es möglich Aussagen über die Geometrie der untersuchten Makromoleküle zu treffen. Das theoretisch berechnete ρ -Verhältnis harter Kugeln liegt bei 0,775 und für Hohlkugeln bei 1.[107]

3.3 Sekundärmethoden

3.3.1 UV-VIS-Spektroskopie

In der Spektroskopie im Allgemeinen beschäftigt man sich mit der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Die UV-VIS-Spektroskopie beschränkt sich auf elektromagnetische Wellen im ultravioletten (UV) bzw. sichtbaren (engl. VISible) Wellenlängenbereich. Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Molekül, kann es zur Absorption, also Aufnahme der Energie, kommen. Dabei werden Valenzelektronen innerhalb des Moleküls angeregt und auf höhere Energieniveaus angehoben. Durch Messung der Absorption bei unterschiedlichen Wellenlängen kann man Rückschlüsse auf die Probe ziehen. Informationen über Anwesenheit bestimmter Moleküle oder Bindungsverhältnisse sind zugänglich. Durch Kalibrierung der Absorption lassen sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz auch Konzentrationen bestimmen.

Der Messaufbau besteht im allgemeinen aus einer Referenz- und einer Probenküvette. Licht wird über einen Monochromator mit Wellenlängen zwischen 200 nm bis 800 nm abwechselnd durch beide Küvetten geleitet. Das transmittierte Licht wird durch einen Detektor erfasst. Aus der Differenz der beiden Signale ergibt sich die Absorption der Probe. Durch Auftragung der Absorption gegen die Wellenlänge ergibt sich das UV-VIS-Spektrum.

3.3.2 IR-Spektroskopie

Die sogenannte Infrarot(IR)-Spektroskopie bezieht sich auf den Wellenlängenbereich, der nicht mehr für das menschliche Auge sichtbar ist. Der Wellenlängenbereich erstreckt sich über 1 bis 1000 μm bzw. im korrespondierenden Frequenzbereich von $3 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$ bis $3 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$.

Die Energie, die nötig ist um Molekülrotationen und -schwingungen zu erzeugen, entspricht der Strahlungsenergie dieses Frequenzbereichs. Die IR-Spektroskopie geht es also um die Anregung von Molekülrotationen und -schwingungen durch elektromagnetische Strahlung.

Die Absorption von Strahlung dieses Frequenzbereichs ermöglicht somit die Zuordnung zu bestimmten Strukturelementen eines Moleküls. Die IR-Spektroskopie kommt vor allem in der chemischen Analytik zum Einsatz und ermöglicht die Konstitutionsaufklärung organischer und anorganischer Materialien.

3.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht die Untersuchung fluoreszierender Moleküle oder Partikel. Moleküle, die durch elektromagnetische Strahlung angeregt werden (Absorption in Abb. 3.8), können diese aufgenommene Energie durch verschiedene Wege abbauen. Durch die ablaufenden Schwingungsrelaxationen (SR) erreicht das Molekül seinen niedrigsten Schwingungszustand des angeregten Zustandes. Durch Innere Konversion (IC) kann der elektronisch angeregte Zustand S_1 in den niedrigsten elektronischen Zustand übergehen, das Molekül gibt seine aufgenommene Energie also nur durch Abgabe von Wärme ab. Bestimmte Moleküle können aber auch aus elektronischen Zuständen ohne innere Konversion den niedrigeren Zustand erreichen indem sie Strahlung abgeben. Dieses Verhalten nennt man Fluoreszenz. Normalerweise ist die abgegebene Energie immer niedriger als die eingestrahlte Energie (Stokessche Regel). Neben der Resonanzfluoreszenz, die die gleiche Wellenlänge emittiert die zuvor absorbiert wurde, kann

auch in seltenen Fällen Strahlung mit größerer Energie emittiert werden. Diese Energie kann zum Beispiel aus thermischer Energie stammen [109]. Die möglichen Übergänge der Energiezustände können mit dem Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Abb. 3.8).[110]

In Abb. 3.8 sind 2 verschiedene Messaufbauten dargestellt. Hinter einer Lichtquelle, die polychromatisches Licht zwischen 200-800 nm aussendet, wird ein Monochromator geschaltet. Mit dem monochromatischen Licht wird die Probe durchstrahlt. Das von der Probe abgestrahlte emittierte Licht wird im Winkel von 90° detektiert. Auftretendes Streulicht wird durch einen Filter abgefangen und ermöglicht die Detektion des Fluoreszenzspektrums.

Abhängig von der Natur der Probe, kann es vorkommen, dass die Fluoreszenz der Probe durch Reabsorption stark geschwächt wird.

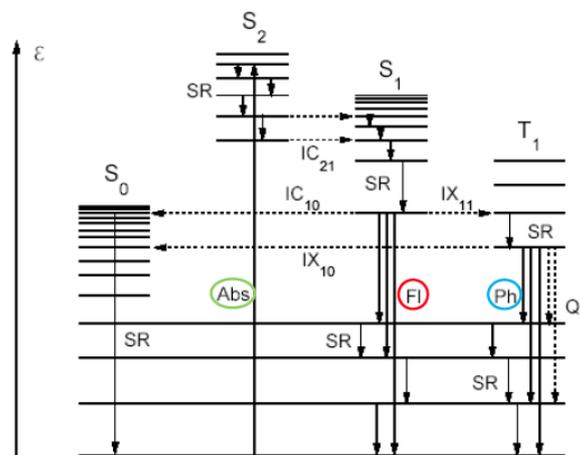
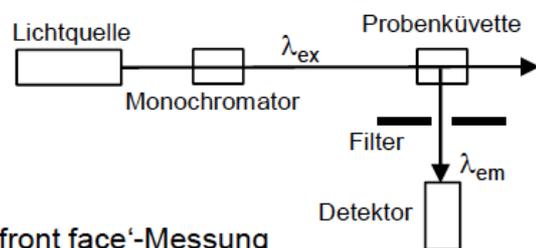


Abb. 3.8 [Petzke]: Jablonski-Diagramm mit den unterschiedlichen Formen von Absorption und Relaxation

90°-Messung



'front face'-Messung

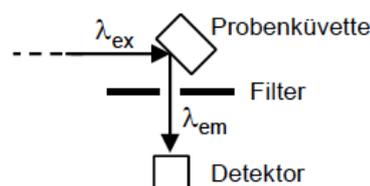


Abb. 3.9: Aufbau zwei verschiedener Fluoreszenzspektrometer

Mit Hilfe der Front-Face Messung lässt sich diese Reabsorption verringern, da die emittierte Strahlung nur noch einen sehr kurzen Weg durch die Probe zurücklegen muss.

Fluoreszenzmessungen werden durch ein Emissionsspektrum und ein Anregungsspektrum bestimmt. Bei konstanter Anregungswellenlänge λ_{ex} wird die Emission über verschiedene Wellenlängen gemessen und liefert das Emissionsspektrum. Das Anregungsspektrum ergibt sich aus Intensitätsmessungen einer konstanten Emissionswellenlänge λ_{em} bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Die Peakmaxima entsprechen oft denen, die in Absorptionmessungen ermittelt werden können. [110]

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Polymere Nanopartikel durch Selbstorganisation

Abhängig von der Zusammensetzung amphiphiler Blockcopolymere bilden sich in Wasser Nanopartikel mit unterschiedlichen Morphologien aus. Ein entscheidender Faktor ist wie bereits in Kap. 2 beschrieben, das Größenverhältnis des hydrophoben zum hydrophilen Block. Aus diesem ergibt sich die mögliche Krümmung der ausgebildeten Doppelschicht. Da sich jedes Polymer in Hinsicht auf die Dichte, Knäuelung, Quellung, Oberflächenladung etc. unterscheidet, muss jedes Blockcopolymer getrennt betrachtet werden.

Nach Discher et al. kann die Wanddicke der Vesikel bzw. die Mizellengröße von PB-PEO-Polymeren anhand der Größe des hydrophoben Blocks bestimmt werden. TEM und Cryo-TEM Aufnahmen erlauben die direkte Bestimmung der Wanddicke. Für PB₁₃₀-PEO₆₆-OH/COOH ergibt sich im Cryo-TEM eine reine hydrophobe Wanddicke von 15-16 nm, da die Polyethylenoxidentketten durch Quellen im Wasser keinen ausreichenden Kontrast bieten. Die hydrophile Schicht wurde bereits durch frühere Arbeiten auf 4 nm bestimmt (Mueller 2009). Im TEM nach vorheriger Strukturfixierung mittels Gammastrahlung lässt sich ebenfalls eine Wandstärke bestimmen. Allerdings liegt die PEO Schicht kollabiert auf der hydrophoben PB Schicht, da sich kein stabilisierendes Wasser mehr um die Partikel befindet. Durch die Vernetzung schrumpft die PB-Wand wieder etwas zusammen, wodurch die Ergebnisse durchaus vergleichbar sind.

Discher et al. konnte zeigen, dass die Membrandicke d proportional zum Molekulargewicht des Polybutadien-Blocks M_h^b mit $b = 0,5 - 0,66$ ist.[111] Für niedrige Molekulargewichte des hydrophoben Blocks ist $b = 0,66$, da hier das Polymer etwas gestreckter vorliegt. Für höhere Molekulargewichte liegt das Polymer als Knäuel vor und somit ist $b = 0,5$. Auch für die Polymere, die in dieser Arbeit verwendet wurden, kann diese Proportionalität bestätigt werden. Tabelle 3 fasst die Molekulargewichte und die Membrandicken unterschiedlicher PB-PEO Polymere zusammen. Für das Polymer PB₁₃₀-PEO₆₆ ergibt sich eine Membrandicke von 15,2 nm und für PB₁₆₀-PEO₅₀ 16 nm. Abbildung 4.1 zeigt TEM-Bilder von vernetzten Polymersomen dieser beiden Polymere. Durch die Bestimmung der Membrandicke aus TEM-Aufnahmen kann diese Berechnung bestätigt werden. Es ergeben sich Membrandicken von 15 nm für das PB₁₃₀-PEO₆₆-Copolymer und etwa 16 nm für PB₁₆₀-PEO₆₀.

Tab. 3: Molekulargewichte und Membrandicken von PB-PEO-Polymeren

Polymer	M_n (kg/mol)	f_{PEO}	M_h (kg/mol)	d (nm)
PB ₄₆ -PEO ₂₆	3,6	0,32	2,5	9,6*
PB ₅₅ -PEO ₅₀	5,2	0,43	3,0	10,9*
PB ₁₂₅ -PEO ₈₀	10,3	0,34	6,8	14,8*
PB ₂₅₀ -PEO ₁₅₀	20,1	0,33	13,5	20,9*
Verwendete Block Copolymere				
PB ₁₃₀ -PEO ₆₆	10,1 ^[40]	0,29	7,2	15,2*
PB ₁₆₀ -PEO ₆₀	11,3	0,23	8,7	16,8*

Hydrophiler Anteil $f_{PEO} = m(PEO)/m(PB-PEO)$; Molekulargewicht des hydrophoben PB-Blocks $M_h = M_n(1 - f_{PEO})$;
 (*) berechnet nach $d \sim (M_h)^b$ mit $b=0,5$ für PB₁₂₅₋₂₅₀ bzw. $0,66$ für PB₄₆₋₅₅^[111]

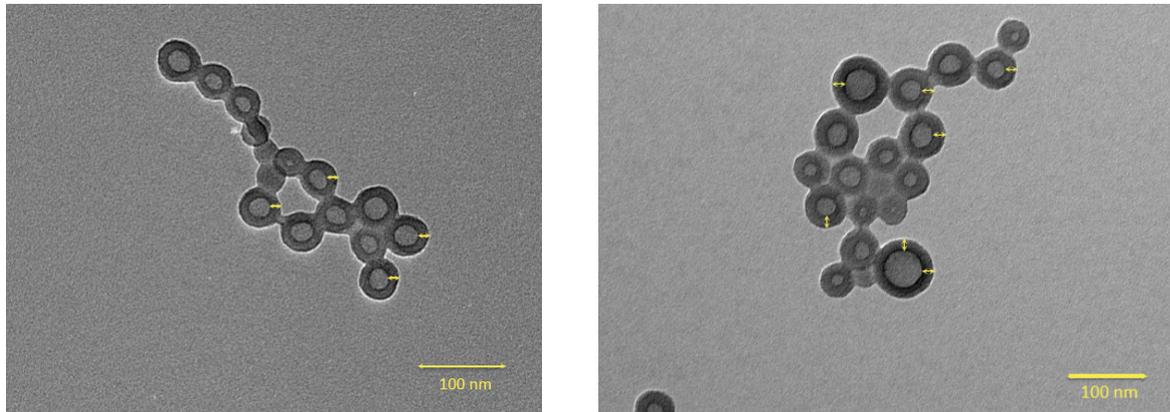


Abb. 4.1: Bestimmung der Membrandicke der Polymere PB₁₃₀-PEO₆₆ (links) und PB₁₆₀-PEO₆₀ (rechts)

4.1.1 Polymervesikel durch Filmrehydration

Polymervesikel aus Polybutadien-Polyethylenoxid und Pluronic® L121 können sowohl durch Filmrehydration als auch durch die Colösemittel-Verfahren erhalten werden. Die in der Filmrehydration erzeugten Nanopartikel benötigen allerdings eine aufwändige Weiterverarbeitung mittels Extrusion bevor sie eine einheitliche Größe haben. In der Arbeit von Müller konnte gezeigt werden, dass etwa 30fache Extrusion zu einheitlichen Partikeln führt, durch Adsorption an der Membran aber auch Polymer verloren geht. Diese Art von Synthese steht in der vorliegenden Arbeit nicht im Vordergrund, da sie nur für Anwendungen geeignet ist, bei der man große Vesikel benötigt und deren Größenpolydispersität zweitrangig ist.[89]

4.1.2 Cosolventverfahren im Batch

Neben der Filmrehydratation lassen sich Polymerpartikel aus Polybutadien-Polyethylenoxid mittels Colösemittelzugabe synthetisieren. Müller[2006] zeigte, dass in THF gelöstes PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH durch langsame Zugabe von Wasser Polymersomen bildet. Unterschiedliche Geschwindigkeiten der Lösungsmittelzugabe führen zu unterschiedlich großen Polymerpartikeln (Cosolvent-Methode). Während sehr schnelle Zugabe des selektiven Lösungsmittels H₂O zu kleinen Partikeln führt, entstehen bei langsamer Zugabe große Polymervesikel. Durch die langsamere Veränderung der Lösungsmiteleigenschaften bleibt dem Polymer mehr Zeit für die Selbstorganisation und ermöglicht größere Strukturen. In Tabelle 4 sind die Radien der Polymerpartikel dargestellt, welche durch Zugabe von 5 ml Wasser in eine 10 mg/ml konzentrierte Polymerlösung hergestellt wurden. Die Radien der entstandenen Polymerpartikel wurden mittels Lichtstreuung bestimmt. Nach γ -Bestrahlung erlaubte die TEM-Charakterisierung die dominierende Morphologie der Partikel zu analysieren.

Wie schon in Arbeiten von Müller [89] bestätigt, bilden sich mittels Cosolvent-Methode beim Polymer PB₁₃₀-PEO₆₆ mit OH bzw. COOH-Endgruppe vorwiegend Polymervesikel mit 30 bzw. 34 nm Radius aus. PB₁₆₀-PEO₉₀/COOH wurde, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, auf die zweite Syntheseart mittels Phosphazenenbase erstellt. Das Polymer besitzt einen großen PEO Rest und bildet mittels Cosolvent-Methode in Wasser nur Mizellen aus. Dies ist aus den TEM Bildern und der dynamischen Lichtstreuung ersichtlich. Eine zweite Synthese mit kürzerem PEO-Rest wurde erfolgreich durchgeführt und lieferte das Polymer PB₁₆₀-PEO₆₀ und PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH, welche mittels Cosolvent-Methode in Wasser Vesikel ausbilden.

Tab. 4: DLS-Ergebnisse der Partikelsynthese im Batch

Polymer	$\langle R_h \rangle$ nm	μ_2	TEM Morphologie
PB ₁₃₀ -PEO ₆₆	30	0,05	v
PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ -COOH	34	0,05	v
PB ₁₆₀ -PEO ₉₀	15	0,15	s
PB ₁₆₀ -PEO ₉₀ -COOH	15	0,15	s
PB ₁₆₀ -PEO ₆₀	39	0,1	v
PB ₁₆₀ -PEO ₆₀ -COOH	60	0,1	v

Ausgangslösung: 5 mg Polymer in 2,1ml THF; Wasserzugabe: 5ml mit 9,9ml/h
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie nach Vernetzung: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

4.2 Vesikelbildung in Mikromischern

Das in dieser Dissertation behandelte Prinzip der Vesikelbildung im Mikromischer basiert auf der Cosolvent-Methode. Dem guten Lösungsmittel THF wird das selektive Lösungsmittel Wasser mittels Mikromischer zugesetzt. Das Lösungsmittel wird zunehmend selektiv für den hydrophilen Block und löst schließlich bei unzureichender Löslichkeit des hydrophoben Blocks die Selbstorganisation aus. Abbildung 4.2 zeigt ein vereinfachtes Schema der Selbstorganisation von Blockcopolymeren mittels Cosolvent-Methode.

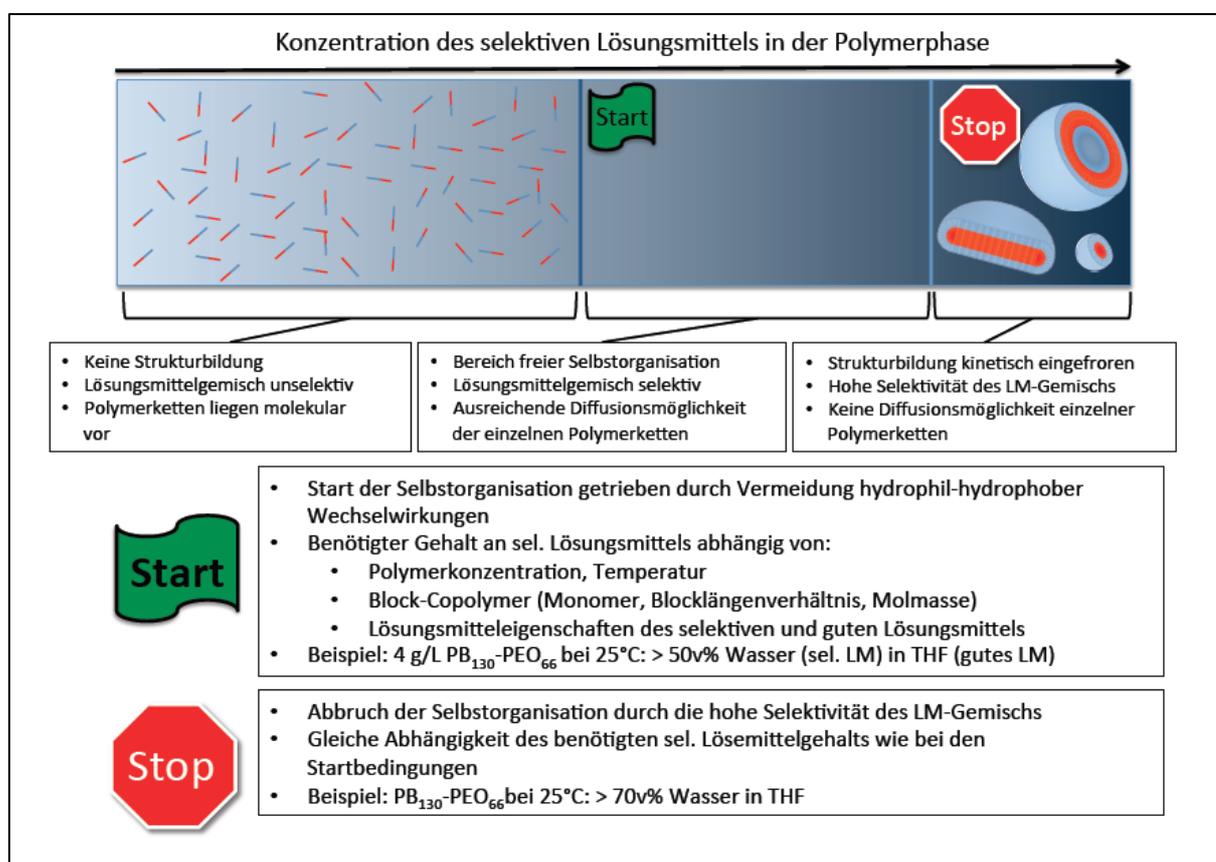


Abb. 4.2: Vereinfachtes Schema der Selbstorganisation von Blockcopolymeren mittels Cosolvent-Methode

Durch Zugabe eines selektiven Lösungsmittels, beispielsweise Wasser, wird die Selbstorganisation ausgelöst (START, siehe auch Abb. 4.3). Die zunächst molekular gelösten amphiphilen Moleküle beginnen sich selbst zu organisieren. Ab welchem prozentualen Gehalt des selektiven Lösungsmittels die Selbstorganisation einsetzt, ist von vielen Faktoren abhängig. Nicht nur die Konzentration, wie sie bei der cmc von Tensiden entscheidend ist, spielt hier eine große Rolle. Auch Temperatur, Molmasse bzw. die Monomereinheiten tragen zu den Bedingungen der Selbstorganisation bei. Zuletzt sind auch die Lösungsmittel an sich maßgeblich für die Selbstorganisation verantwortlich.

Im Unterschied zu vielen Tensiden, die auch in reinem selektivem Lösungsmittel Wasser noch Strukturen bilden können, kann die Selbstorganisation von bestimmten Block-Copolymeren ab einem gewissen Anteil an selektivem Lösungsmittel kinetisch eingefroren werden. Diese Polymere haben einen so großen hydrophoben Teil, dass die Löslichkeit der einzelnen Kette im selektivem Lösungsmittel dann verschwindend gering ist. Ein Beispiel für ein solches Polymer ist das in dieser Arbeit verwendete PB₁₃₀-PEO₆₆. Dessen großer hydrophober Teil aus Polybutadien verhindert ab einem Gehalt von 70% Wasser die Selbstorganisation des Polymers (Abb. 4.2: STOP).

Innerhalb eines bestimmten Lösungsmittelgemisches aus THF und Wasser hat das Polymer ausreichend Möglichkeiten zur freien Selbstorganisation.

Abbildung 4.3 zeigt den zeitlichen Ablauf der Selbstorganisation eines amphiphilen Polymers im Bereich freier Selbstorganisation zwischen START und STOP.

Der „Mechanismus 1“ der Bildung von Polymersomen ist hier dargestellt, da er sowohl für dieses Polymer als auch für Lipide und Tenside bevorzugt wird (siehe Abschnitt 2.2).

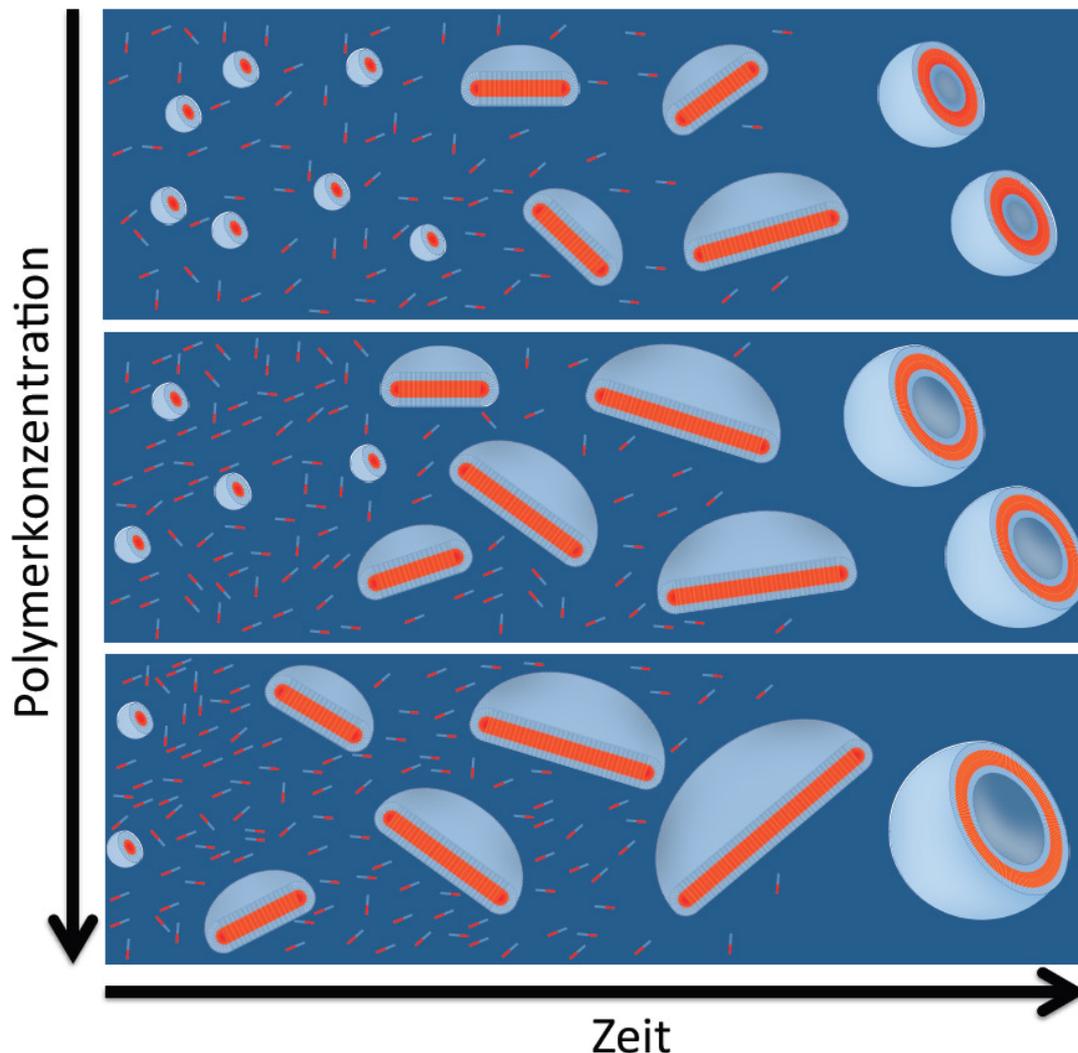


Abb. 4.3: Selbstorganisation eines vesikelbildenden amphiphilen Block-Copolymers im Bereich der freien Selbstorganisation in der Cosolvent Methode bei unterschiedlichen Konzentrationen und Zeiten

Am Anfang sind zunächst noch alle Polymerketten molekular gelöst und bilden zunächst sphärische Mizellen aus. Durch Aufnahme von weiteren Polymerketten kann bereits die bevorzugte lamellare Struktur durch eine Scheibe gebildet werden. Je höher die Konzentration an Polymer, desto schneller verläuft sowohl die Mizellenbildung als auch das Anwachsen zu Scheiben. Durch ihre ungünstigen Ränder sind diese Partikel aber instabil. Bei ausreichender Größe, die durch das Volumen und die nötige Biegeenergie („bending energy“) gegeben ist, kann sich diese Scheibe zu einem Vesikel umlagern. Höhere Konzentrationen führen dabei nicht nur zu einer Erhöhung der Gesamtpartikelzahl, sondern es werden auch größere Vesikel gebildet (siehe Abs. 2.2).

Diese Zeitabhängigkeit der Vesikelbildung und die Möglichkeit zur kinetischen Einfrierung der Selbstorganisation mittels der Cosolvent Methode, kann Einblicke in den Mechanismus der Selbstorganisation liefern. Durch die ungleichmäßige Durchmischung im Batch ist eine Verwendung von Mikromischern zwingend vorteilhaft.

In Abschnitt 2.6 sind bereits die Mischungseigenschaften der verwendeten Mikromischer besprochen worden. Asymmetrische Flussbedingungen liefern dabei sehr kurze Mischzeiten, während symmetrische Flussraten zu deutlich längeren Mischzeiten führen.

Die Mischgeschwindigkeit ist bei den meisten Mikromischern abhängig von der Flussgeschwindigkeit. Sogar Mikromischer, denen das interdigitale Mischprinzip zugrunde liegt, erzielen nur bei sehr niedrigen Flussraten von wenigen Millilitern pro Stunde eine rein diffusive Mischung.

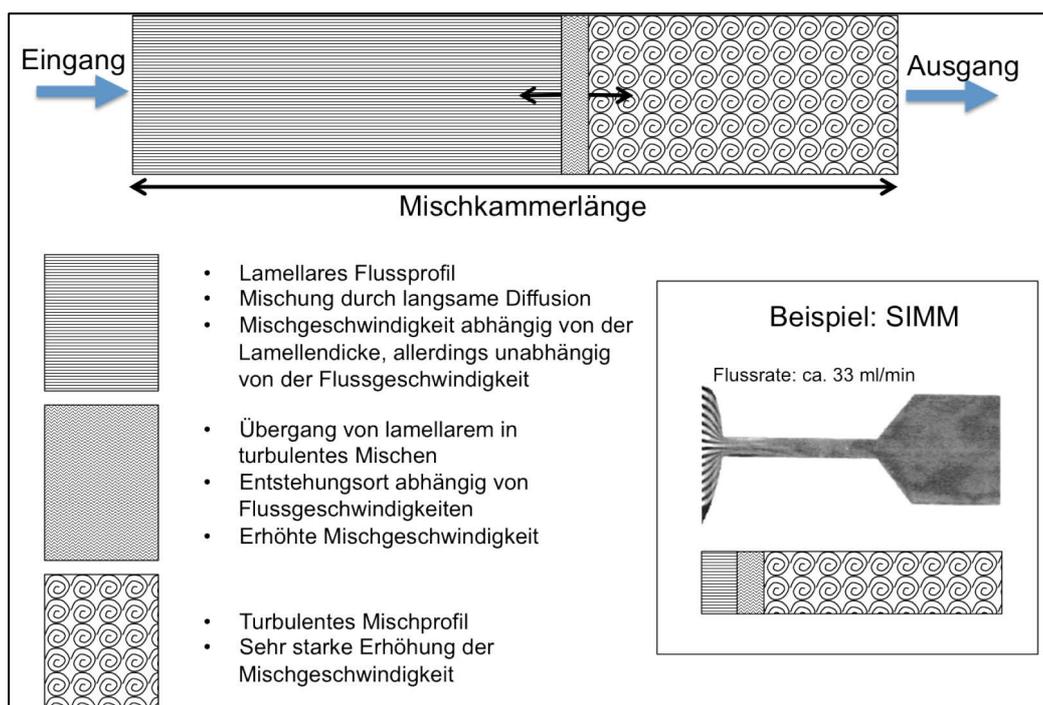


Abb. 4.4: Vereinfachtes Flussprofil der verwendeten Mikromischer

Abbildung 4.4 zeigt ein vereinfachtes Flussprofil innerhalb einer Mischkammer der Mikromischer. Bei den zunächst ausgebildeten laminaren Flussprofilen hängt die Geschwindigkeit der Durchmischung nur von der Lamellendicke ab und ist vergleichsweise langsam. Im turbulenten Strömungsbereich erhöht sich die Mischgeschwindigkeit um Größenordnungen.

Nur bei niedrigen Flussgeschwindigkeiten wird eine von der Flussrate unabhängige Mischzeit erhalten. Dies ist auf die Turbulenzen zurückzuführen, die erst bei zunehmender Flussgeschwindigkeit auftreten. Die Mischzeiten verkürzen sich dann aufgrund von zwei Faktoren. Die Turbulenzen entstehen nicht nur früher, sondern der Zeitraum, in dem sich die Lösungen im laminaren Bereich aufhalten, wird durch die höhere Flussgeschwindigkeit verkürzt.

Diese Flussratenabhängigkeit kann bei der Selbstorganisation amphiphiler Block-copolymere mittels Cosolvent daher analog zu Abbildung 4.5 genutzt werden.

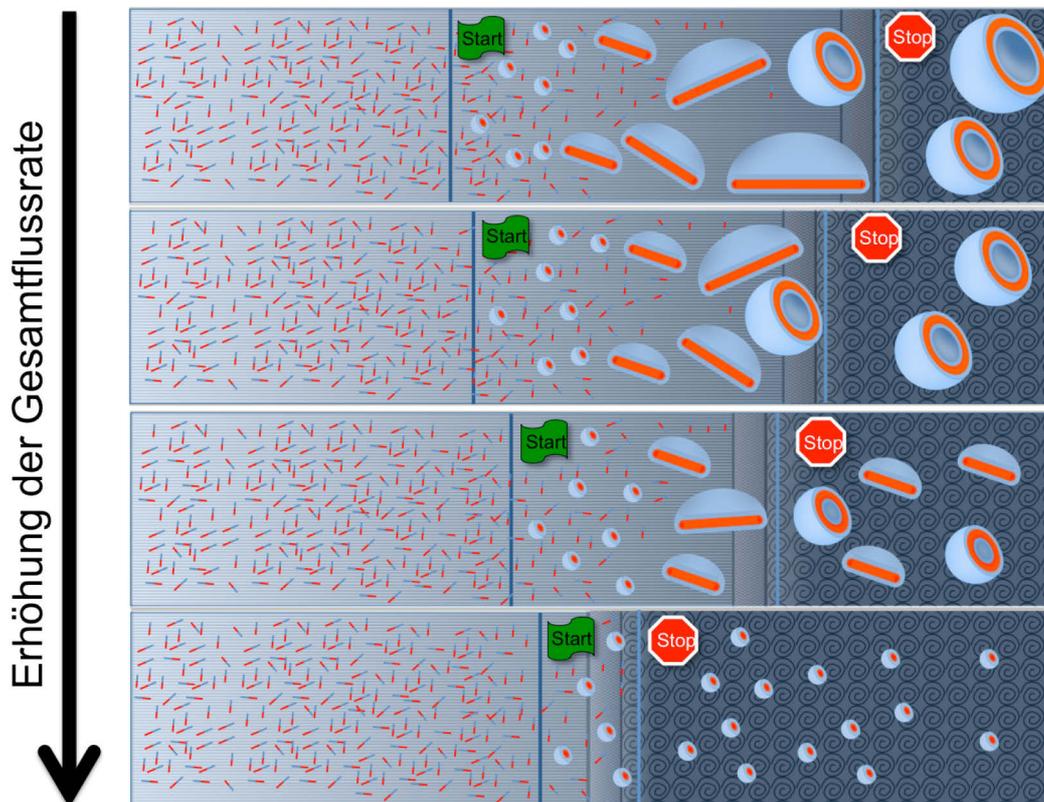


Abb. 4.5: Vereinfachte schematische Flussratenabhängigkeit der erhaltenen Strukturen im Mikromischer unter gleichen Lösungsmittelbedingungen

Je höher die Flussrate desto weniger Zeit bleibt der Selbstorganisation. Der Startpunkt zur Selbstorganisation wird durch langsamere Flussgeschwindigkeiten bereits weiter am Anfang der Mischkammer erreicht. Zum anderen entstehen viele Turbulenzen erst näher am Ausgang

der Mischkammer. Allein durch die Flussratenveränderung könnte man also die Selbstorganisation gezielt steuern.

Um der Selbstorganisation möglichst viel Zeit geben zu können, sollte der Startpunkt der Selbstorganisation nahe am Eingang der Mischkammer sein. Dies lässt sich durch eine Vormischung mit dem selektiven Lösungsmittel erzielen. Diese darf die Selbstorganisation an sich noch nicht auslösen, aber sollte an der Grenze des tolerierbaren selektiven Lösungsmittelgehalts liegen. Abbildung 4.6 zeigt die mögliche Einflussnahme auf die gebildeten Strukturen bei gleichen Flussraten und Konzentrationen allerdings unterschiedlichen Lösungsmittel-vormischungen. Die Erhöhung des Wassergehalts führt dann zu einem früheren Beginn der Selbstorganisation. Trotzdem müsste der Abbruch für alle Vormischungen fast zeitgleich erfolgen, da dieser im turbulenten Profibereich des Mischers erfolgt.

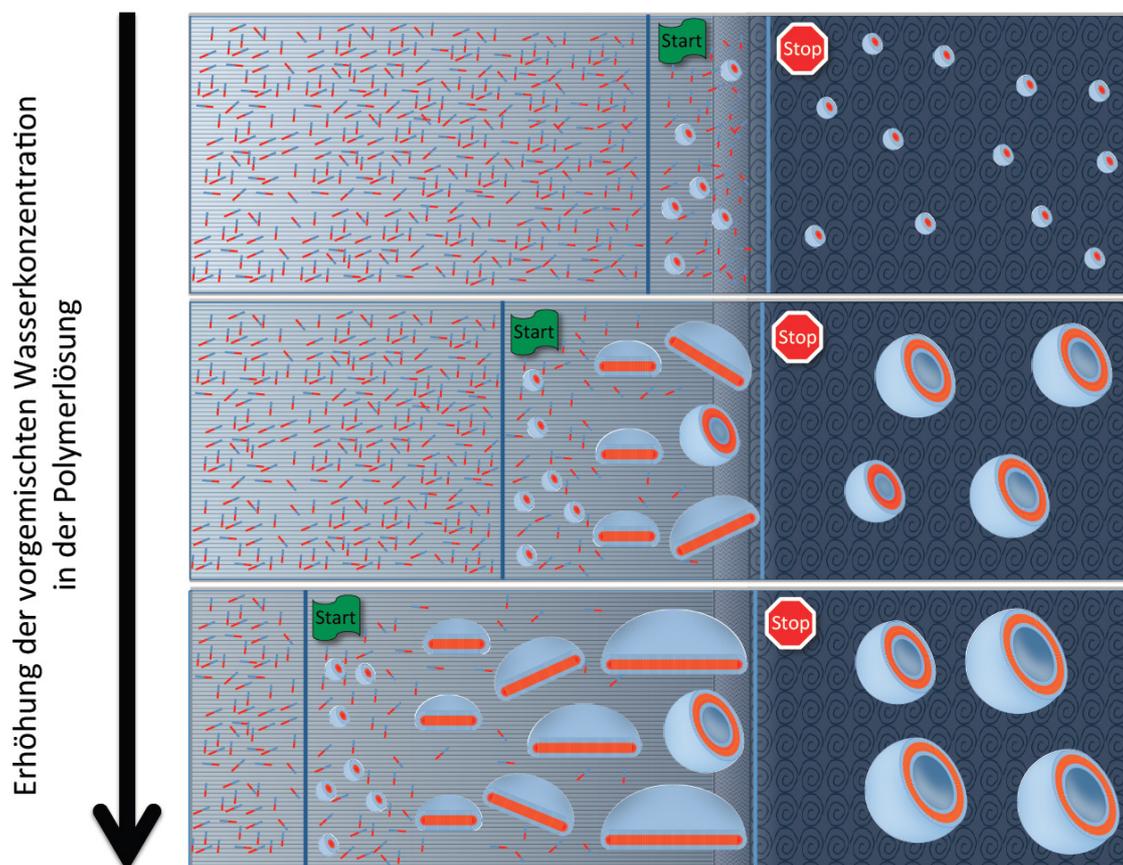


Abb. 4.6: Prinzip der Selbstorganisation bei unterschiedlichen Vormischungen und unter gleichen Flussbedingungen

4.3 PB-PEO Polymersomen

4.3.1 Selbstorganisation von PB₁₃₀-PEO₆₆ im Mikromischer

Die Strukturbildung von amphiphilen Blockcopolymeren in selektiven Lösungsmitteln ist von vielen Faktoren abhängig. Für das System PB₁₃₀-PEO₆₆ in Wasser zeigte sich, dass die Probenpräparation einen starken Einfluss auf die gebildeten Strukturen hat (vgl. Abs. 2.3.1, 2.5).

Die Verwendung der Mikromischertechnologie ermöglicht die Verfeinerung der sogenannten Cosolvent-Methode und liefert kontinuierliche, reproduzierbare Bedingungen. Eine Kontrolle über die gebildeten Strukturen ist eine wichtige Voraussetzung für spätere Anwendungen.

Der Mikromischer erlaubt es zwei Fluidströme unter immer gleichen Bedingungen zu mischen. Hier soll nur THF als gutes und Wasser als selektives Lösungsmittel behandelt werden. Diese Bedingungen lassen sich durch Änderung der Flussraten, Flussratenverhältnisse, Temperatur, Polymerkonzentrationen oder des Druckes gezielt verändern und kontrollieren. Der kontinuierliche Mischprozess mit Flussraten bis zu 200 L/h ermöglicht zudem ein Up-Scaling des Prozesses.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Mischung im SFIMM von 20 g/L PB₁₃₀-PEO₆₆ gelöst in THF mit Wasser bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten. Die Morphologie wurde nach Vernetzung mittels γ -Strahlung im TEM ermittelt (Abbildung 4.7). Unter allen Flussbedingungen ist die einzige beobachtete Morphologie die der Mizelle. Auch die Bestimmung der mittleren hydro-dynamischen Radien lässt nur geringe Veränderungen bezüglich der Größe erkennen.

Diese Beobachtung kann durch die extrem kurze Mischzeit erklärt werden, die im SFIMM erreicht wird. Durch das asymmetrische Flussprofil wird die THF-Lamelle zusätzlich hydrodynamisch fokussiert und Mischzeiten deutlich unterhalb von Millisekunden erzielt (vgl. Abschnitt 2.6.3). Die Selbstorganisation von Vesikeln braucht dagegen deutlich mehr Zeit. Trotzdem kann von einer kontrollierten Selbstorganisation gesprochen werden, da zum einen keine Fällung auftrat und zum anderen fast ausschließlich Mizellen entstanden. Die Lösungsmittelbedingungen wurden so schnell geändert, dass eine weitere Diffusion von Molekülketten bzw. die Fusion von Mizellen nicht mehr möglich war.

Tab. 5: Analyse der Partikelsynthese im Superfocus-Mikromischer

Probe	Fluss H ₂ O ml/min	Fluss THF ml/min	DLS-Radius nm	μ_2	TEM Morphologie
SF1	15,6	0,78	14,8	0,13	s
SF2	15,6	0,52	18,3	0,2	s
SF3	12	0,6	17,7	0,22	s
SF4	12	0,3	21,9	0,22	s
SF5	8,4	0,42	17,6	0,17	s
SF6	8,4	0,2	18,8	0,18	s
SF7	4,8	0,24	21,0	0,16	s
SF8	4,8	0,12	22,0	0,17	s

Ausgangslösung: 20 g/L Polymer in THF
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
Morphologie nach Vernetzung: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Da Geschwindigkeit der Selbstorganisation auch von der lokalen Konzentration abhängt (Kap. 4.2), sollte eine Vesikelbildung bei höherer Konzentration erreicht werden. *Tabelle 6* fasst die Ergebnisse für 40 g/L zusammen. Ähnlich wie bei 20 g/L Startkonzentration erzielt man aber auch unter diesen Bedingungen keine Vesikelbildung. Sowohl DLS- als auch TEM-Ergebnisse (Abbildung 4.7 rechts) zeigen, dass fast ausschließlich Mizellen hergestellt wurden.

Tab. 6: Analyse der Partikelsynthese im Superfocus-Mikromischer

Probe	Fluss H ₂ O ml/min	Fluss THF ml/min	DLS-Radius nm	μ_2	TEM Morphologie
SF9	15,6	0,78	16,3	0,1	s
SF10	15,6	0,4	17,3	0,07	s
SF11	12	0,6	17,9	0,12	s
SF12	12	0,3	20,3	0,14	s
SF13	8,4	0,42	21,9	0,15	s
SF14	8,4	0,2	20,3	0,11	s
SF15	4,8	0,24	17,7	0,09	s
SF16	4,8	0,12	22,0	0,14	s

Ausgangslösung: 40 g/L Polymer in THF
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
Morphologie nach Vernetzung: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Der Grund hierfür liegt in den asymmetrischen Flussbedingungen. Diese sind nötig, damit einerseits der THF-Gehalt kleiner als 25% ist und andererseits die finale Polymerkonzentration nicht zu hoch liegt. Bei zu hoher Konzentration kommt es zur Ausfällung.

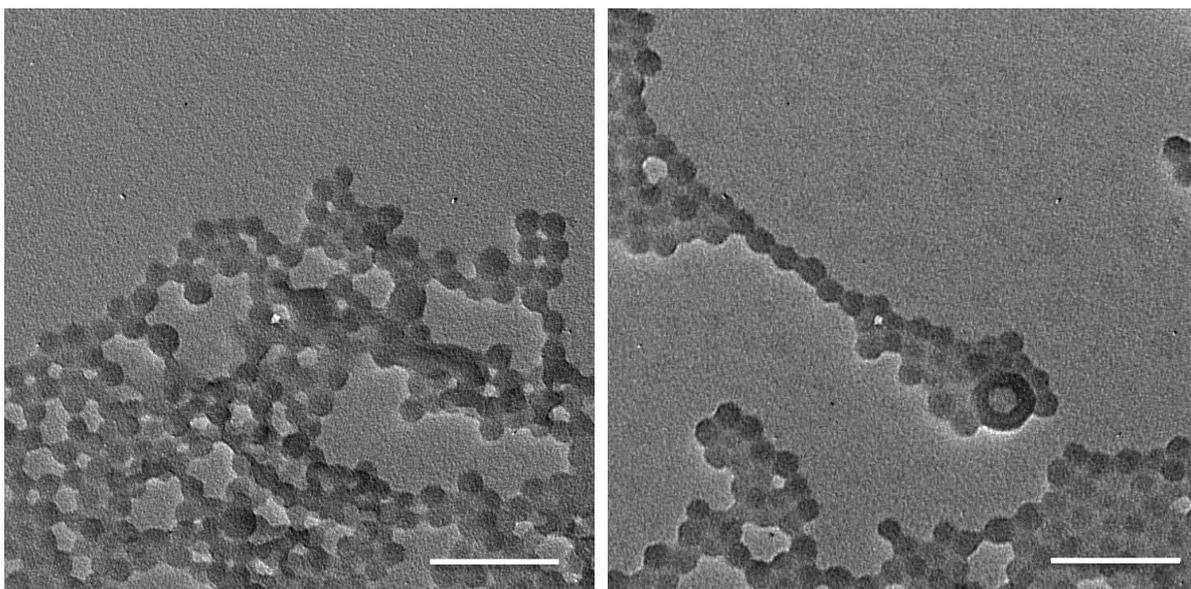


Abb. 4.7: TEM-Bilder der vernetzten Proben SF7 links (aus 20 g/L) und SF11 rechts (aus 40 g/L)
Scalebar entspricht 100 nm

Es verwundert daher nicht, dass auch bei noch höheren Anfangskonzentrationen keine kontrollierte Vesikelbildung zu beobachten ist (80 und 100 g/L *siehe Anhang*). Die Zeitspanne innerhalb der die Lösungseigenschaften Selbstorganisation von Vesikeln ermöglichen, ist im SFIMM bei asymmetrischen Flussbedingungen offenbar viel zu kurz.

Bei höheren Konzentrationen des Polymers in THF entstehen zwar auch vereinzelt Vesikel, bedingt durch die hohe Asymmetrie ist aber keine Kontrolle über die Selbstorganisation möglich. Die theoretisch schnellere Bildungs-geschwindigkeit von Vesikeln wird dann durch die schnelleren Mischzeit, bedingt durch die höhere hydrodynamische Fokussierung der Flüsse, konterkariert.

Die Entstehung von Vesikeln trotz hoher Mischgeschwindigkeit ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die hohe Polymerkonzentration zu undefinierten Viskositätseffekten bzw. Polymerabscheidungen führt. Dies ließ sich durch das Glasfenster im SFIMM ab einer Konzentration von 40 g/L beobachten. Eine Kontrolle über die Selbstorganisation mittels Mikromischer, wie sie in Kapitel 4.2 besprochen wurde, ist unter diesen Umständen nicht möglich.

Der SFIMM-Mischer bietet zwar ein sehr gutes laminares Mischprofil, andererseits ergeben sich durch die großen Oberflächen und vielen Lamellen auch etliche Störfaktoren. Durch die große Glasoberfläche und dessen unterschiedlich schnelle Benetzung durch THF und Wasser ist keine gleichmäßige Durchmischung möglich und erhöht die Polydispersität der entstandenen Partikel. Kleine Bläschen blockieren zusätzlich einige der Mischkammereingänge und verursachen bereits Wirbelbildungen am Eingang der Mischkammer. Darüberhinaus setzt sich bei höheren Konzentrationen Polymer auf der Glasoberfläche ab.

Der SFIMM wurde daher nur genutzt, wenn sehr schnelle Mischvorgänge benötigt wurden. Ansonsten wurde entweder auf den SIMM, der mit weniger starker hydrodynamischer Fokussierung auskommt, oder den Raupenmischer zurückgegriffen.

4.3.1.1 Raupenmischer (CPMM)

Anders als der SFIMM kommt der Raupenmischer ohne hydrodynamische Fokussierung aus (Ein- und Ausgänge haben die gleiche Dimension). Durch das Split-and-recombine Prinzip sollen die zwei Fluidströme annähernd laminar gemischt werden. In der Praxis kann dieses Verhalten nicht bestätigt werden, es kann eher von einem kontrolliert chaotischen Mischvorgang gesprochen werden (vgl. Abs. 2.6.3).

Tabelle 7 zeigt die Mischungsergebnisse von 42 g/L PB₁₃₀-PEO₆₆-OH in THF mit Wasser bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten und Flussverhältnissen. Auch hier ist keine überwiegende Vesikelbildung zu beobachten. In diesem Mischer ist die Zeitspanne, in der das System ausreichend Zeit für freie Selbstorganisation hat, ebenfalls zu kurz.

Tab. 7: Analyse der Partikelsynthese im CPMM aus PB₁₃₀-PEO₆₆-OH

Probe	Fluss H ₂ O ml/min	Fluss THF ml/min	DLS-Radius nm	μ ₂	TEM Morphologie
CPA1	10	0,24	16	0,15	s,v
CPA2	2,1	0,05	20	0,19	s,v
CPA3	10	0,16	19	0,18	s,v
CPA4	10	0,12	19	0,2	s,v
CPA5	4,2	0,12	19	0,18	s,v
CPA6	7,35	0,05	22	0,2	s,v
CPA7	6,3	0,05	20	0,17	s,v

Ausgangslösung: 42 g/L Polymer in THF
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung;
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe;
 Dominierende Morphologie ist unterstrichen

Interessanterweise konnte in einer vorangehenden Arbeit von Mueller bei ähnlichen Flussbedingungen für das PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH-Polymer etwas andere Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 8). In den meisten Fällen entstehen allerdings, ähnlich wie bei dem Polymer mit OH-Endgruppe, nur Mizellen. Trotzdem entstehen im Vergleich deutlich mehr Vesikel mit PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH. Die Erklärung dieses Verhaltens muss also in der Carboxyendgruppe gesucht werden. Die spezifische Wechselwirkung der COOH-Gruppe führt zu einer Streckung der hydrophilen Polyethylenoxiddkette. Dadurch verkleinert sich das hydrophile Volumen. Dies führt zu einer größeren Tendenz zur Lamellenbildung.[18, 40]

Tab. 8: Analyse der Partikelsynthese im CPMM aus $PB_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-COOH}^{[112]}$

Probe	Fluss H ₂ O ml/min	Fluss THF ml/min	DLS-Radius nm	μ_2	TEM Morphologie
CPB1	10	0,24	35	0,13	s,c,v
CPB2	2,1	0,05	41	0,13	s,v
CPB3	10	0,16	51	0,13	s,v
CPB4	10	0,12	56	0,19	s,v
CPB5	10	0,1	65	0,17	s,v
CPB6	6,3	0,05	71	0,18	s,w,d,v
CPB7	7,35	0,05	92	0,16	s,w,v

Ausgangslösung: 42 g/L Polymer in THF

 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^1$ aus dynamischer Lichtstreuung

Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe, w=Würmer

Dominierende Morphologie ist unterstrichen

Die Ausbildung der Mizelle ist daher weniger favorisiert als im Falle des $PB_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-OH}$ Polymers.

Trotzdem ist die Fähigkeit zur Lamellenbildung für das Polymer mit OH-Endgruppe ebenso gegeben. Die Entstehung der $PB_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-COOH}$ -Vesikel unter diesen Umständen kann nur teilweise erklärt werden. Der Selbstorganisation muss mehr Zeit zur Verfügung gestanden haben. Andernfalls wäre die Bildung von Vesikeln und wurmartigen Mizellen nicht erklärbar. Da im CP-Mikromischer vor allem zu Beginn des Mischprozesses noch ein laminares Flussprofil vorliegt, ist hier das Mischen noch vergleichsweise langsam. Erst am hinteren Ende der Mischkammer überwiegt das chaotische Mischprofil und beschleunigt die Vermischung extrem. Es ist daher sehr entscheidend, wann die Selbstorganisation einsetzt um die maximale Kontrolle mittels Mikromischer zu erreichen.

Für $PB_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-OH}$ scheint der Zeitraum zur freien Selbstorganisation kürzer zu sein, während die Zeitspanne für die Selbstorganisation bei $PB_{130}\text{-PEO}_{66}\text{-COOH}$ etwas länger ausfällt. Im Falle des Polymers mit OH-Endgruppe scheint der Startpunkt der Selbstorganisation, wie er in Kapitel 4.2 beschrieben wurde, erst bei höherem Wassergehalts zu sein.

Für die bessere Kontrolle der Selbstorganisation und die Synthese größerer Strukturen, muss der Beginn der Selbstorganisation möglichst früh in der Mischkammer einsetzen. Andernfalls startet die Selbstorganisation erst dann, wenn bereits turbulente Strömungen in den Mischkammern auftreten und eine Kontrolle nicht mehr möglich ist.

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben wurde, kann der Startpunkt der Selbstorganisation durch das Vormischen einer gewissen Wassermenge verändert werden. Die Selbstorganisation setzt dann deutlich früher in der Mischkammer ein. Es wurde darauf geachtet, dass sich bei diesem Wassergehalt noch keine Strukturen ausgebildet haben. Diese Strukturen hätten sich durch Trübung der Lösung bzw. in der dynamischen Lichtstreuung bemerkbar gemacht.

4.3.2 PB₁₃₀-PEO₆₆-OH Vesikel durch Vormischung im Mikromischer

Da die im Kap. 4.2.1 besprochenen Bedingungen – hohe Konzentration von Polymer in reinem Lösungsmittel – keine kontrollierte Selbstorganisation zuließen, sollte dies mit anderen Startbedingungen erreicht werden.

Dazu wurden die Flussratenverhältnisse von Polymer in THF und Wasser 1:1 gewählt, um Turbulenzen und die Komprimierung der THF-Lamellen möglichst gering zu halten.[113] Damit dies möglich ist, muss man sicherstellen, dass die Selbstorganisation nach dem vollständigen Mischen beider Fluidströme auch abgeschlossen ist. Durch einfache Zugabe von 50v% Wasser in die THF-Stammlösung wurde eine neue Startlösung erstellt. Bei dieser Wasserkonzentration entstehen noch keine Vesikel bzw. generell keine festen selbstorganisierten Strukturen, was von Kelly et al. mittels Cryo-TEM und SANS herausgefunden wurde.[114] Diese Vormischung ermöglicht es, dass nach dem Mischen mit dem Wasserstrom die finale THF-Konzentration unterhalb von 30v% liegt. Somit wird die weitere Selbstorganisation verhindert.[115]

Neben der niedrigeren Asymmetrie ergibt sich noch ein weiterer entscheidender Vorteil der Vormischung. Der Punkt, an dem die Selbstorganisation in der Kammer des jeweiligen Mikromischers einsetzt, ist deutlich näher zum Eingang des Mischers vorgezogen. Am Eingang aller Mischer herrschen optimale laminare Flussbedingungen. Hier beruht das Mischen noch auf reiner Diffusion. Setzt die Selbstorganisation in diesem Bereich an, ist bestmögliche Kontrolle gegeben.

Tabelle 9, 10 und 11 zeigen unter verschiedenen Mischbedingungen resultierende Partikelgrößen aus den drei Mischern CPMM, SIMM und SFIMM.

Hier lassen sich auch die verkürzten Mischzeiten bei schnelleren Flussraten von allen drei Mischserien erkennen (vgl. Kap. 2.6.3, 2.6.4). Je niedriger die Flussrate ist, desto höher ist auch der entstehende Partikelradius.

Auch die resultierenden μ_2 Werte sind sehr gering und lassen auf eine kontrollierte Selbstorganisation schließen. Durch Vernetzung und anschließende Elektronenmikroskopie konnte die Morphologie der Partikel bestimmt werden. Es zeigt sich, dass bei sehr hohen Flussraten auch sphärische Mizellen entstehen.

Tab. 9: DLS-Ergebnisse PB_{130} - PEO_{66} -OH Partikelsynthese im SFIMM

Probe	Flussrate ml/min	$\langle R_h \rangle$ nm	μ_2	TEM Morphologie
SFA1	9,6	25	<0,05	-
SFA2	3,6	28	<0,05	s, v
SFA3	1,2	34	<0,05	s, v
SFA4	0,6	39	0,08	s, v
SFA5	0,4	42	0,1	v
SFA6	0,2	49	<0,05	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 4 g/L Polymer in THF/H₂O (50/50 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Tab. 10: DLS-Ergebnisse PB_{130} - PEO_{66} -OH Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	$\langle R_h \rangle$ nm	μ_2	TEM Morphologie
RP4	9,6	28	<0,05	s, v
RP7	3,6	33	0,07	v
RP10	1,2	39	<0,05	v
RP13	0,6	42	<0,05	v
RP15	0,2	47	0,09	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 4 g/L Polymer in THF/H₂O (50/50 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Tab. 11: DLS-Ergebnisse PB_{130} - PEO_{66} -OH Partikelsynthese im SIMM

Probe	Flussrate ml/min	$\langle R_h \rangle$ nm	μ_2	TEM Morphologie
SIA1	9,6	29	0,07	v
SIA2	3,6	32	<0,05	v
SIA3	1,2	36	<0,05	v
SIA4	0,6	38	0,09	v
SIA5	0,4	39	<0,1	v
SIA6	0,2	46	<0,1	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 4 g/L Polymer in THF/H₂O (50/50 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Auch unter symmetrischen Bedingungen lässt sich das Polymer kinetisch in der Form der Mizelle einfangen. Damit wird der Mechanismus der Vesikelbildung bestätigt, der das Vorhandensein von Mizellen bei hohen Flussraten erklärt. Durch sehr schnelles Mischen bleibt der Selbstorganisation nur so viel Zeit, dass sich Mizellen bilden können.

Der Mechanismus der Vesikelbildung aus Mizellen als erste gebildete Struktur kann also durch den Einsatz von Mikromischern allgemein bestätigt werden.

In Bezug auf die Mischzeiten lassen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Mikromischern erkennen. Die Mischzeiten bei gleichen Flussraten steigen vom Superfocusmischer über den Raupenmischer bis zum Schlitzinterdigitalmischer an. (siehe Theorie 2.6).

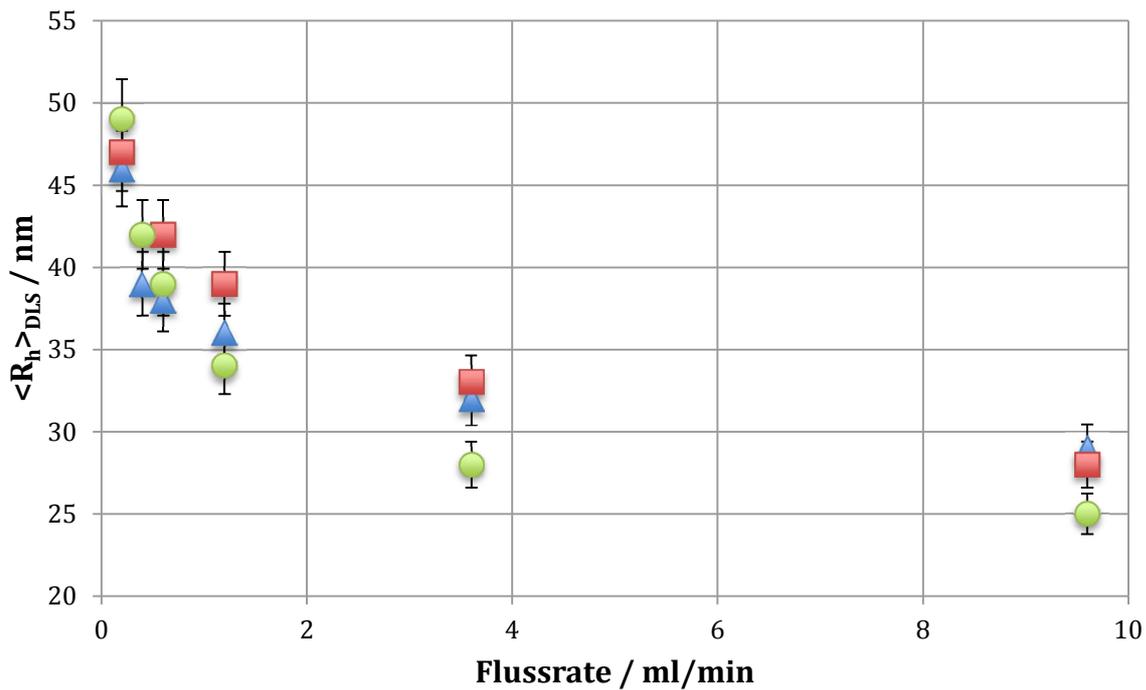


Abb. 4.8: Resultierende Partikelgrößen in Abhängigkeit zur Flussrate
CPMM (Quadrate); SFIMM (Kreise); SIMM (Dreiecke)

Im Schlitzinterdigitalmischer entstehen erst bei drei mal so hoher Flussrate sphärische Mizellen. Durch die vielfach höhere Kompression beim Superfocus-Mischer entstehen Mizellen auch bei viel langsameren Flussbedingungen. Abbildung 4.8 zeigt die Zusammenfassung aller Ergebnisse der Lichtstreuungsdaten zu den Proben der drei Mischer. Man kann sehr gut erkennen, dass die Selbstorganisation anhand der Flussgeschwindigkeiten (siehe Kapitel 4.2, Abbildung 4.5) kontrolliert werden kann. Polymervesikel lassen sich mit einheitlicher Größe kontrolliert und kontinuierlich herstellen. Diese Polymervesikel sind über Monate stabil und zeigen keine Veränderung in der DLS.

4.3.3 PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH im Mikromischer

Da bereits die erfolgreiche kontinuierliche Synthese mit dem vesikelbildenden Polymer PB₁₃₀-PEO₆₆-OH gezeigt werden konnte, wurde dies für das Polymer mit COOH-Endgruppe wiederholt. Wie aus Tabelle 12 ersichtlich ist, verhält sich dieses Polymer unter gleichen Mischbedingungen sehr ähnlich.

Tab. 12: DLS-Ergebnisse PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	$\langle R_h \rangle$ nm	μ_2	TEM Morphologie
RPB1	4,8	34	<0,05	s,v
RPB2	1,8	40	<0,05	s,v
RPB3	0,6	48	<0,1	v
RPB4	0,4	55	<0,1	v
RPB5	0,2	66	<0,05	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2 g/L Polymer in THF/H₂O (50/50 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Je höher die Flussrate ist umso kleiner ist der resultierende hydrodynamische Radius der Partikel. Auch die μ_2 -Werte sind klein und sprechen für eine niedrige Polydispersität. Bei hohen Flussraten entstehen neben Vesikeln auch noch sphärische Mizellen, da hier die Mischzeit sehr kurz ist. Bei niedrigen Flussraten entstehen, wie schon beim Polymer mit OH-Endgruppe, nur Vesikel.

Durch die Carboxyendgruppe bildet dieses Polymer größere Vesikel aus, da der hydrophobe Teil sich scheinbar vergrößert und die Bildung einer Lamelle erleichtert wird (vgl. Kap. 2.1).

Die Untersuchungen wurden auf den Raupenmischer beschränkt, da keine ausreichende Menge des Polymers für Untersuchungen in verschiedenen Mixern zur Verfügung stand.

Abbildung 4.9 zeigt eine Zusammenfassung der DLS-Ergebnisse des PB₁₃₀-EO₆₆-COOH Polymers im CPMM. Im Vergleich zum Polymer mit OH-Endgruppe entstehen etwas größere Partikel. Die Kurven sehen trotzdem sehr ähnlich aus und bestätigen die Kontrollierbarkeit der Selbstorganisation in Mikromischern.

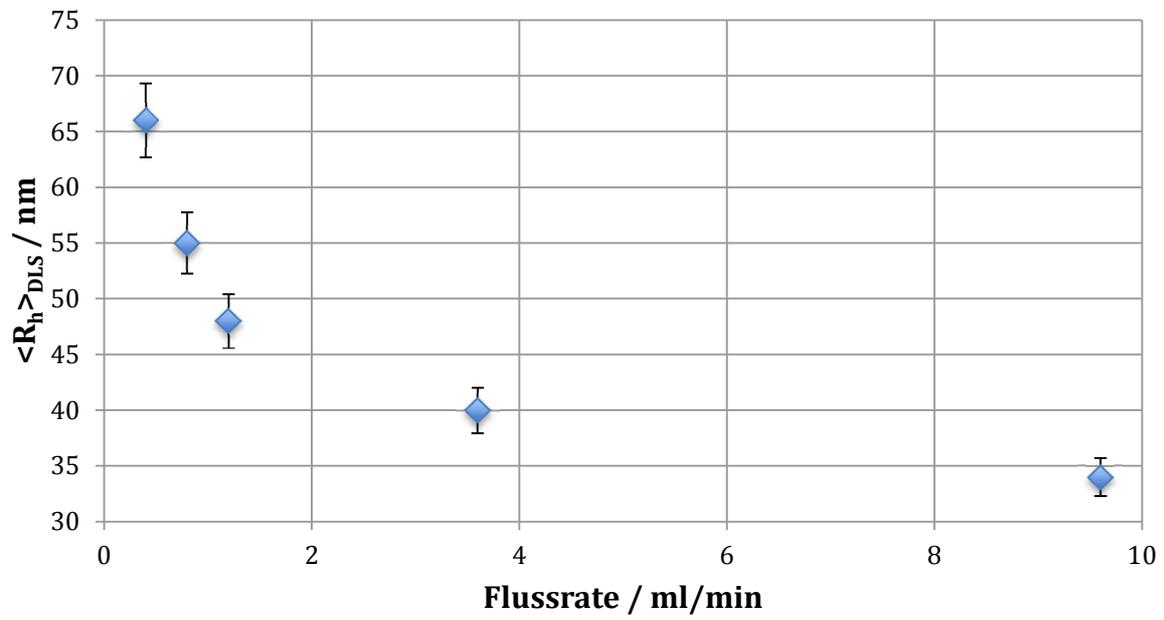


Abb. 4.9: Resultierende Partikelgrößen in Abhängigkeit der Flussrate
Flussbed.: Wasser/THF 1:1;
Ausgangslösung: 2 g/L Polymer in THF/H₂O (50/50 v%/v%)

4.3.4 PB₁₆₀-EO₆₀-COOH im Mikromischer

Es wurde ein neues Polymer synthetisiert, um die Reproduzierbarkeit weiter zu überprüfen. Das neue Polymer wurde ebenfalls über anionische Polymerisation hergestellt. Der Syntheseweg unterscheidet sich leicht von dem des PB₁₃₀-PEO₆₆, da ein anderer Initiator verwendet wurde (vgl. Theorie 2.4.1). Die GPC-Analyse ergab ein Molgewicht von insgesamt 11300 g/mol, davon fallen 8800g/mol auf Butadieneinheiten und 2500 g/mol auf Ethylenoxidanteile. Es ergibt sich somit eine Polymerzusammensetzung von etwa 160 Butadien und 60 Ethylenoxid Einheiten. Da sich im Batch eine Vesikelbildung zeigte (vgl. Abschnitt 4.1.2), sollte anschließend die Synthese im Mikromischer durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst ein ähnlicher Versuch zur Selbstorganisation im Mikromischer durchgeführt, wie bereits für PB₁₃₀-PEO₆₆ beschrieben.

Tab. 13 zeigt die DLS-Ergebnisse der im Mikromischer synthetisierten Proben bei 2 g/L Startkonzentration in der THF-Lösung. Um symmetrische Flussbedingungen nutzen zu können, wurde ebenfalls Wasser in die THF-Phase vorgemischt. Ab 40v% Wassergehalt zeigte sich eine leichte Trübung. Dies hat mit der größeren Polybutadienkette im Zusammenspiel mit der kürzeren hydrophilen Polyethylenoxiddkette zu tun. Die Selbstorganisation ist bei diesem Wassergehalt zwar nicht eingefroren, aber die Polymermoleküle bilden schon sichtbare Vorstrukturen aus. Daher wurde eine niedrigere Wasserkonzentration gewählt.

Oberhalb von 65v% Wasser konnte keine Trübung mehr beobachtet werden. Die Löslichkeit von reinem Polybutadien liegt bei ca. 73v% THF.[114] Die Proben wurden zunächst bei 73v% und 70v% THF-Gehalt in der THF- Polymerphase hergestellt, da keine ausreichenden Erfahrungen vorlagen.

Tab. 13: DLS-Ergebnisse PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	$\langle R_h \rangle$ nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-73-1	3,6	29	0,08	V
XB-73-2	1,8	36	0,07	V
XB-73-3	0,6	48	0,06	V
XB-73-4	0,2	51	0,1	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Tab. 14: DLS-Ergebnisse PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	R _n nm	μ ₂	TEM Morphologie
XB-70-1	3,6	37	0,06	V
XB-70-2	1,8	43	0,09	V
XB-70-3	0,6	49	0,07	V
XB-70-4	0,2	54	0,1	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2 g/L Polymer in THF/H₂O (70/30 v%/v%)
 $\langle R_n \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Sowohl Vormischungen mit 73v% als auch mit 70v% THF-Gehalt (Tab. 13 und 14) liefern gute und reproduzierbare Vesikelsynthesen. Sie erlauben ein symmetrisches Mischungsverhältnis. Die THF-Konzentration liegt nach dem Mischvorgang unterhalb von 34w% THF in Wasser und verlangsamt die Selbst-organisation, sodass keine weitere Strukturänderung mehr beobachtet werden kann.

Ähnlich zum PB₁₃₀-PEO₆₆ bildet das PB₁₆₀-PEO₆₀ im Mikromischer Vesikel mit enger Größenverteilung aus. Durch die kontrollierbare Mischgeschwindigkeit lassen sich unterschiedliche Größen der geformten Vesikel erzielen. Abbildung 4.10 begründet noch einmal, dass der Zeitpunkt, zu dem die Selbstorganisation in der Mischkammer einsetzt, einen Einfluss auf die entstehenden Partikelradien hat. Dabei setzt die Selbstorganisation bei 3v% geringerer THF-Konzentration in der Polymerlösung deutlich früher im laminaren Bereich der Mischkammer ein und bildet daher größere Partikel aus. In Abbildung 4.6 wurde auf die große Einflussmöglichkeit der Vormischungen eingegangen und kann hier bestätigt werden. Bereits eine kleine Veränderung von 3v% in der Vormischung verändert den Radius sichtbar. Daraus ergibt sich aber auch das Problem, dass schon kleine Fehlerschwankungen hier zu veränderten Ergebnissen führen können. Allein durch das Verdampfen des leicht flüchtigen THFs können diese Veränderungen eintreten und die Ergebnisse stark beeinflussen.

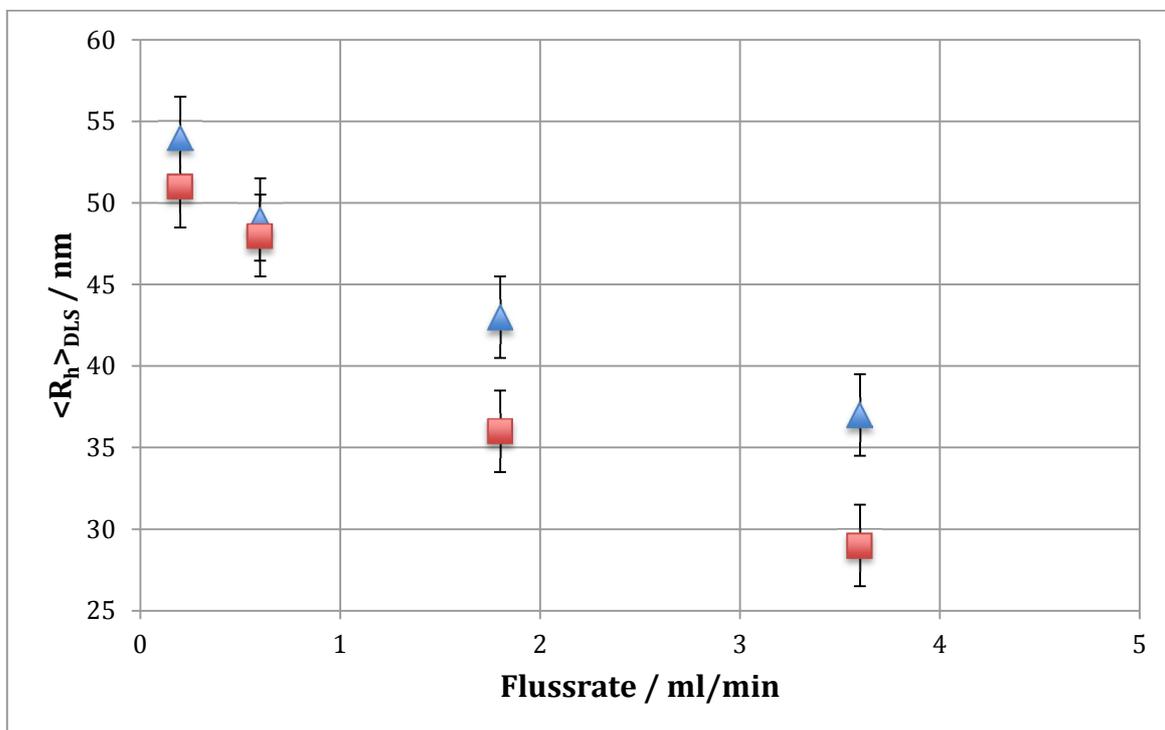


Abb. 4.10: Resultierende Partikelgrößen in Abhängigkeit zur Flussrate für die Vormischungen
73v%/27v% THF/Wasser in 2g/L Polymerlösung (Quadrate)
70v%/30v% THF/Wasser in 2g/L Polymerlösung (Dreiecke)

4.3.5 Konzentrationsabhängigkeit

4.3.5.1 PB_{130} -PEO₆₆-OH

Mit Hilfe der mikrokanalbasierten Technologie kann durch Änderung der Flussparameter Einfluss auf die Größe der geformten Partikel genommen werden. Durch hohe Flussraten ließen sich sphärische Mizellen bei PB_{130} -PEO₆₆ in Wasser herstellen. Die Synthese im Mikromischer bietet folglich eine kinetische Kontrolle der Reaktion.

Der Mechanismus der Selbstorganisation bis hin zum Vesikel ist noch nicht vollständig verstanden (wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben). Die zwei am häufigsten diskutierten Ansätze setzen beide voraus, dass zunächst Mizellen während der Selbstorganisation gebildet werden. Dies kann aus den Mischergebnissen im Mikromischer ebenfalls gefolgert werden, denn sowohl bei asymmetrischen Flüssen, als auch bei sehr schnellen symmetrischen Flussraten entstehen Mizellen im Mikromischer[113].

Bei Mechanismus 2 der Vesikelbildung entstehen aus den vorhandenen Polymermizellen größere instabile Mizellen, die durch interne „Reorganisation“ zu Vesikeln werden. Anisotrope Zwischenzustände werden dabei übersprungen. Eine Konsequenz dieses Mechanismus ist, dass eine hohe innere hydrophile Beladung kaum umsetzbar ist. He und Schmid konnten eine spinodale Entmischung simulieren, welche dem Mechanismus 2 ähnelt.[30]

Mechanismus 1, der von anderen Computersimulationen bevorzugt wird, sagt voraus, dass die Mizellen langsam zu anisotropen Stäbchen oder Scheiben wachsen und anschließend bei ausreichender Größe eine Hohlkugel bilden.

Damit dies möglich ist, muss die Scheibe eine bestimmte Größe haben, damit eine komplette Biegung zur Schließung zum Polymersom erfolgen kann.

Aber selbst wenn es diese scheibenförmige Übergangsformen gibt, sind sie durch ihre Anisotropie instabil und bilden sehr schnell durch Zusammenschluss Vesikel aus. Generell ist die Vesikelbildung sehr schnell und konnte für Lipide simuliert werden. Deren Bildung liegt im Nano- bis Mikrosekundenbereich. Blockcopolymere sind deutlich größer und brauchen mehr Zeit für ihre Bildung durch die sehr viel langsamere Diffusion (Millisekunden-Bereich).[28]

Auch die Mischzeiten in einem Mikromischer liegen im Millisekundenbereich und erlauben theoretisch kinetische Einfrierung von Übergangszuständen zwischen Mizelle und Vesikel.

Durch Verringerung der Ausgangskonzentration in der THF-Phase könnte man die Zeit deutlich erhöhen, die für die Selbstorganisation des Polymers nötig ist um Vesikel zu bilden.

Die Konzentration des Polymers wurde daher auf 2 g/L halbiert und erneut im Superfocus gemischt. Dadurch wird der Abstand zwischen den einzelnen gelösten Polymerketten im statistischen Mittel vergrößert.

Tab. 15: DLS-Ergebnisse PB_{130} - PEO_{66} -OH Partikelsynthese im SFIMM

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
RT133	1,2	22,9	0,02	s
RT136	0,6	24,6	0,07	s
RT137	0,4	25,0	0,07	s,d,v
RT138	0,2	27,7	0,04	s,d,v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2 g/L Polymer in THF/H₂O (50/50 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Tabelle 15 zeigt die Abhängigkeit von Gesamtflussgeschwindigkeit, der Partikelgröße und der korrespondierenden Morphologie, die mit der Elektronenmikroskopie ermittelt wurde. Bei hohen Mischgeschwindigkeiten erzielt man sehr kleine Partikel, die nur aus Mizellen bestehen. Senkt man die Geschwindigkeit der Flüsse ab, bleibt mehr Zeit zur Selbstorganisation bis keine Größenänderung mehr stattfindet.

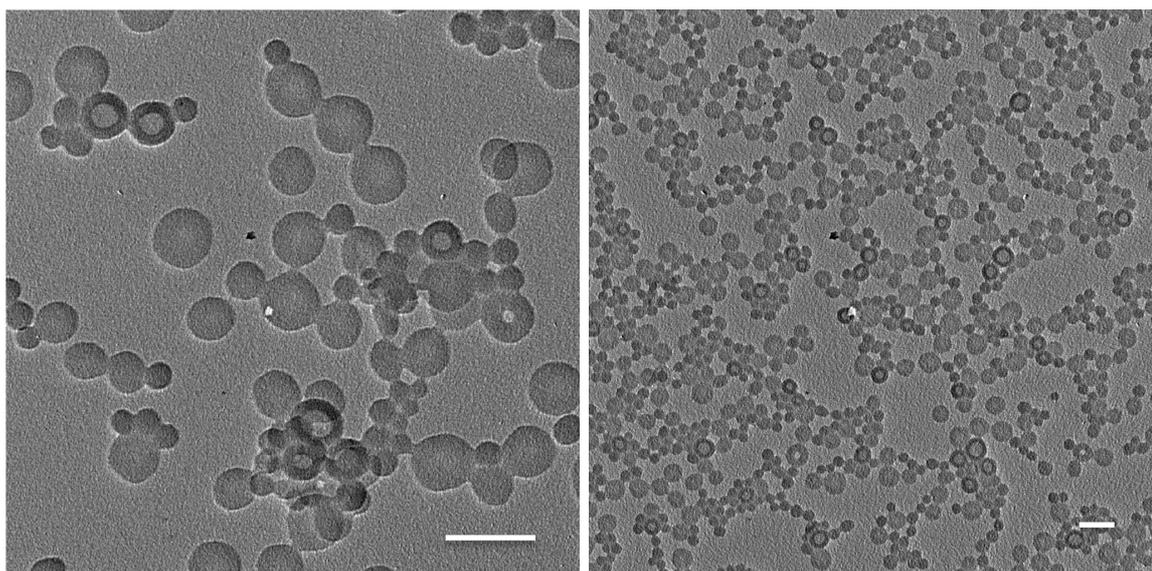


Abb. 4.11: Elektronenmikroskopieaufnahme der vernetzten Proben RT137(links) und RT138(rechts)
 Scalebar = 100 nm

Abbildung 4.11 zeigt die getrockneten Proben RT137 und RT138. Es fällt auf, dass neben Mizellen und Vesikeln, auch größere sphärische Partikel entstanden sind, die trotz ihrer Größe von bis zu 60 nm keine Ringstruktur aufzeigen. Es könnte sich dabei entweder um sehr große sphärische Mizellen oder scheibenartige Nanopartikel handeln.

Da beim Trocken-TEM alle Partikel flach aufliegen, kann hier keine direkter Rückschluss auf deren anisotrope Form gezogen werden. Im Cryo-TEM liegen alle Partikel ungeordnet im Wasser vor. Die Form der Nanopartikel kann durch eine Verkippungsserie beobachtet werden, da keine Trocknungsartefakte vorhanden sind.

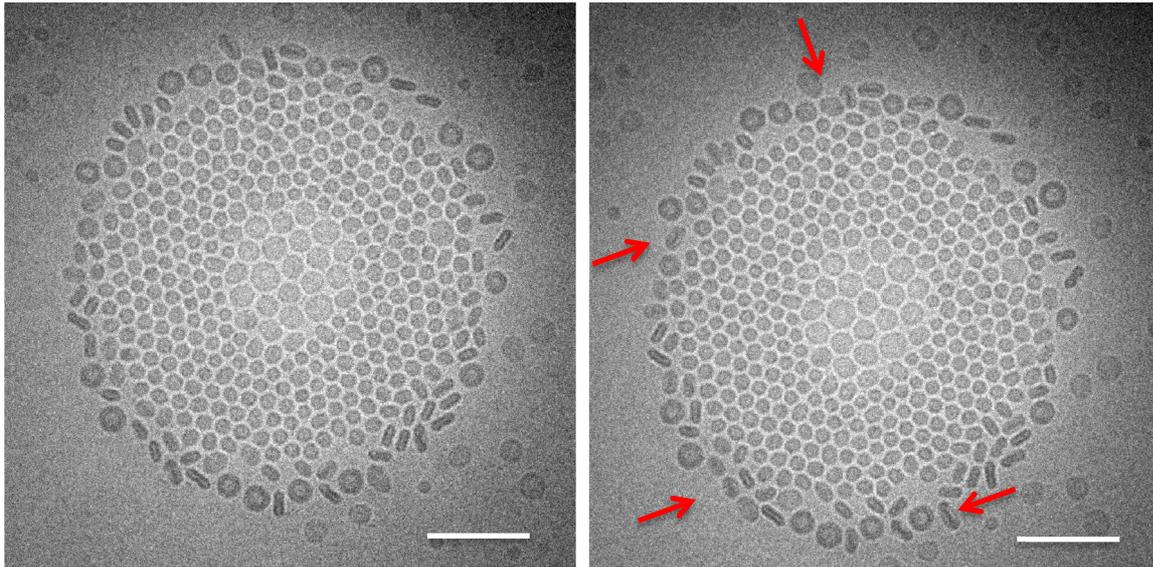


Abb. 4.12: Cryo-TEM-Aufnahme der unnetzten Probe RT138 in Wasser (links)
Morphologieveränderung (Rote Pfeile) durch Kippen des Halter um 15° (rechts)
Scalebar = 200nm

In Abb. 4.12 kann man eine Cryo-TEM Aufnahme der Probe RT138 sehen. Neben Vesikeln und Mizellen sind dort ebenfalls stäbchenförmige Partikel zu sehen, die im trockenen TEM nicht zu erkennen waren. Es konnte durch einfaches Kippen des Probenhalters gezeigt werden, dass es sich hier tatsächlich nicht um Stäbchen handelt. Auf diese Weise war eine Morphologieverwandlung zu beobachten. Die scheinbar stäbchenförmigen Partikel gaben sich nun als anisotrope Scheiben zu erkennen. Da nur ein Winkel von 15° einstellbar war, verändert sich die Partikelansicht nicht vollständig. Zusätzlich ist es nur möglich entlang einer Achse zu kippen. Daher können nicht alle stäbchenförmige Partikel als Scheiben erkannt werden. Nur bei den Partikeln, welche senkrecht zur Kippachse liegen, kann eine Morphologieveränderung beobachtet werden.

TEM-Aufnahmen der vernetzten Proben zeigen, dass Scheiben in diesen Proben nicht vereinzelt vorliegen, sondern etwa in ähnlich großer Anzahl wie die Vesikel. Da diese Scheiben nicht bei Proben beobachtet werden können, die aus höheren Stammlösungen hergestellt wurden, scheint es, als seien diese Scheiben Zwischenprodukte, die aufgrund niedriger lokaler Konzentration nicht schnell genug wachsen konnten. Das Vorhandensein dieser Partikel muss durch den Mechanismus der Vesikelbildung erklärt werden. Dieser geht

davon aus, dass sich während der Selbstorganisation zunächst Mizellen bilden. Durch weitere Aufnahme von Polymerketten oder Kollision mit anderen Mizellen wachsen sie zu Scheiben heran. Schließlich stülpt sich die flexible Scheibe um und bildet das Vesikel. Dieser Vorgang ist irreversibel. Bedingt durch die thermodynamisch ungünstigen Ränder der Scheibe schließt sich diese, wenn sie eine bestimmte Größe erreicht hat, unwiderruflich zusammen. Es bilden sich thermodynamisch sehr stabile sphärische doppelte Doppelschichten aus. In diesem Fall konnten sich diese Scheiben trotz ihrer energetisch ungünstigen Ränder nicht zu stabileren sphärischen Vesikeln zusammenschließen, denn die nötige Anzahl an Polymerketten für ein vollständiges stabiles Vesikel war noch nicht erreicht.

Um die kritischen Größe einer Scheibe beschreiben zu können muss zunächst der Übergangszustand beschrieben werden. Hierbei schließt sich eine Scheibe zu einem Vesikel zusammen. Das Polymervolumen sollte dabei gleich bleiben und sich nur umorientieren. Gleichung 4.1 und 4.2 beschreiben die Polymervolumina eines Vesikels V_V bzw. einer Scheibe V_D . Dabei besteht die Wanddicke d der Doppelschicht aus hydrophobem und hydrophilem Anteil und wurde als 18 nm angenommen. Diese Wanddicke ergibt sich aus den kleinsten Vesikeln, welche im getrockneten Zustand nach Vernetzung im TEM zu erkennen waren, und hatten einen Durchmesser von 36 nm. Ausgehend von diesen Gleichungen bei Berücksichtigung der Massenerhaltung kann aus einem Vesikeldurchmesser D_V dessen theoretischen Scheibendurchmesser D_D (Gleichung 4.3) bzw. aus einem Scheibendurchmesser dessen Vesikeldurchmesser (Gleichung 4.4) berechnet werden.

$$V_D = \frac{1}{4}\pi D_D^2 d \quad (4.1) \quad V_V = \frac{1}{6}\pi D_V^3 - \frac{1}{6}\pi (D_V - 2d)^3 \quad (4.2)$$

$$D_D = 2\sqrt{D_V^2 - 2D_V d + \frac{4}{3}d^2} \quad (4.3) \quad D_V = d + \sqrt{\frac{D_D^2}{4} - \frac{d^2}{3}} \quad (4.4)$$

Tabelle 16 zeigt einige Scheiben- und Vesikel-Durchmesser und deren korrespondierende Struktur, welche aus Gleichung 4.3 und 4.4 berechnet wurden.

Tab. 16: Korrespondierender Durchmesser Vesikel \leftrightarrow Scheibe

$D_V \rightarrow D_D$	
D_V / nm	D_D / nm
36,0	41,6
38,0	45,1
40,0	48,7
42,0	52,3
44,0	56,0
46,0	59,7
48,0	63,5
50,0	67,3
52,0	71,1
54,0	74,9
56,0	78,8
58,0	82,7
60,0	86,5
62,0	90,4

Berechneter Durchmesser Scheibe \leftrightarrow Vesikel anhand der Formeln 4.3 und 4.4
mit $d=18\text{nm}$

Die Mikromischertechnologie ermöglichte das kinetische Einfangen einer großen Anzahl an Scheiben. Anhand einer numerischen Auswertung der TEM-Bilder der vernetzten Proben RT136-137 konnten die mittleren Durchmesser der Scheiben bzw. Vesikel bestimmt werden. Dabei sind die wichtigsten Größen die minimale Vesikelgröße bzw. die maximale Scheibengröße, denn diese Größen zeigen den Übergang von Scheibe zu Vesikel an. Abbildung 4.13a) zeigt eine Statistik von 950 Scheiben ab einer Größe von 35 nm, welche im TEM als Struktur ohne Doppelschicht erkennbar waren. Die mit 25% am häufigsten vorkommende Scheibengröße hat einen Durchmesser von 55-65 nm. Scheiben mit einer Größe von 75-80 kommen nur noch in geringer Zahl vor, während Scheiben von über 80 nm nicht mehr beobachtet werden können. Abbildung 4.13b) zeigt die Statistik der Vesikeldurchmesser an. Diese Statistik wurde aus den gleichen TEM-Bildern erstellt, wie schon Abb. 4.13a). Vesikel mit $D < 45$ nm kommen sehr selten vor. Die etwas größeren Vesikel kommen hingegen deutlich häufiger vor und haben ihr Maximum bei 50-55 nm. Um einen möglichen Übergangszustand zu bestimmen, muss der Vesikeldurchmesser in einen Scheibendurchmesser umgerechnet werden. Abb. 4.13c) zeigt die gemeinsame Statistik von Scheibendurchmessern (Rot) und Vesikeldurchmessern (Blau). Dabei wurden die

Vesikeldurchmesser mittels Gleichung 4.3 umgerechnet. Beim jeweiligen Maximum der einzelnen Statistiken liegen nur wenige Partikel der korrespondierenden Struktur vor und bestätigen die Möglichkeit der Bildung von Vesikeln aus scheibenartigen Mizellen. Die kritische Übergangsgröße scheint somit für PB₁₃₀-PEO₆₆ bei etwa 65 nm zu sein, denn bei dieser nimmt die Anzahl von Scheiben deutlich ab während die Anzahl der Vesikel steigt.

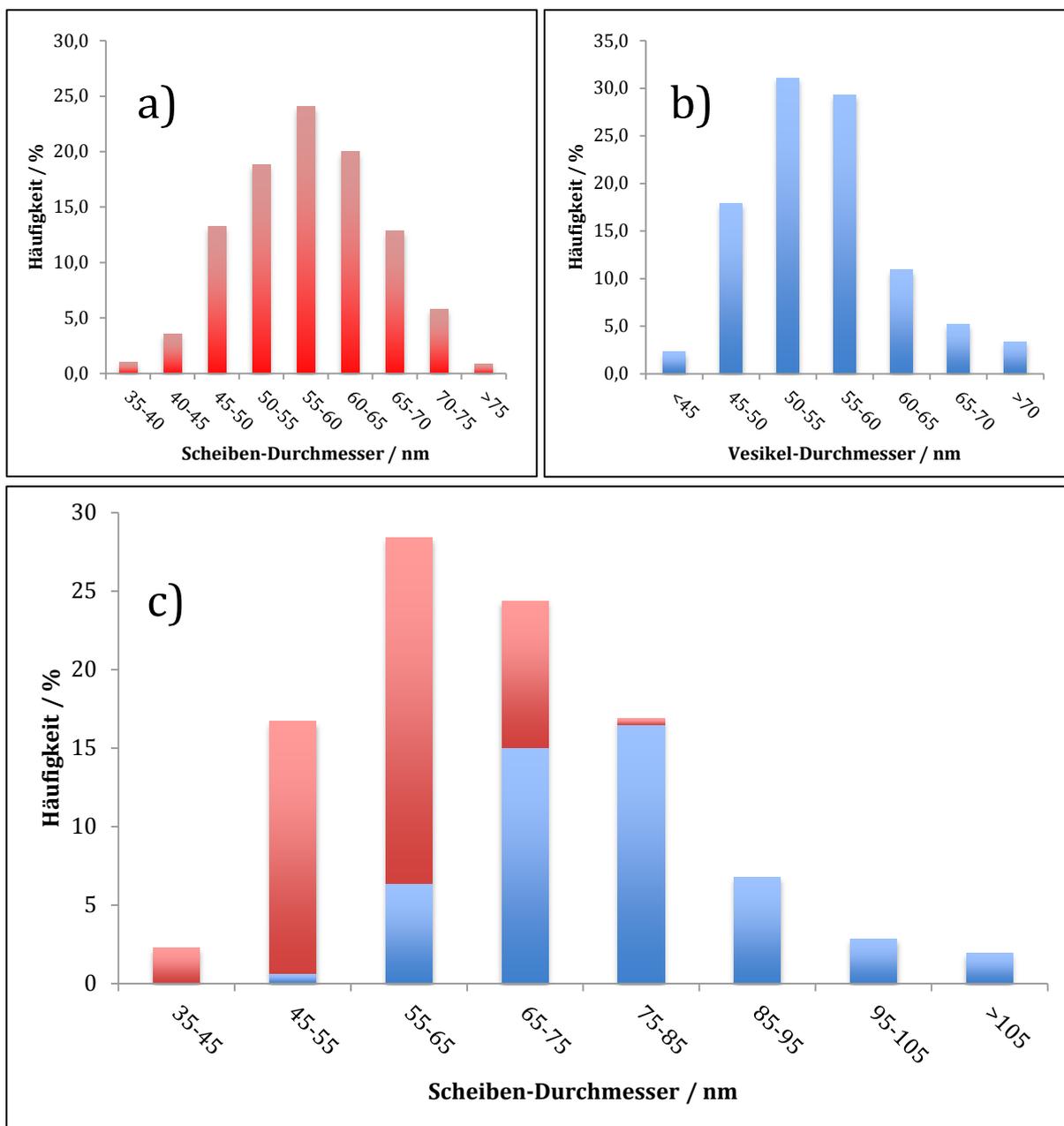


Abb. 4.13: Numerische Auswertung der TEM-Aufnahmen der Proben RT136-137
 a) Statistik der Scheibendurchmesser anhand von 950 Partikeln
 b) Statistik der Vesikeldurchmesser anhand von 400 Vesikeln
 c) Gemeinsame Statistik der Scheiben-Durchmesser von Vesikeln und Scheiben
 (Vesikel-Durchmesser umgerechnet in theoretischen Scheibendurchmesser mit $d = 18$ nm)

4.3.5.2 PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$

In Abschnitt 4.3.1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Selbstorganisation von PB_{130} - EO_{66} im Mikromischer konzentrationsabhängig ist. Auch das Polymer mit der Zusammensetzung PB_{160} - EO_{60} zeigt eine solche Konzentrations-abhängigkeit.

Tabelle 16-20 stellt die durch DLS ermittelten Partikelgrößen und ihre korrespondierende Morphologie dar. Abhängig von der gewählten Startkonzentration können aufgrund der unterschiedlichen Mischzeiten Partikel von 20-80 nm im Radius erstellt werden.

Tab. 17: DLS-Ergebnisse PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-292-1	3,6	46	0,07	V
XB-292-2	1,8	51	0,09	V
XB-292-3	0,6	79	[0,14]	V
XB-292-4	0,4	79	0,11	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Bei Verringerung der Startkonzentration werden die Partikel kleiner, da weniger Polymer vorhanden ist, um Vesikel zu bilden. Dies lässt sich auch sehr gut mit Simulationen der Selbstorganisation von amphiphilen Systemen in Übereinstimmung bringen, deren Partikelwachstum sehr stark von der Konzentration abhängt (vgl. Abb. 2.6 im Kap. 2.2.2).

Tab. 18: DLS-Ergebnisse PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-S072-4	3,6	18	0,1	s
XB-S072-1	1,8	22	0,08	s
XB-S072-2	0,6	23	0,08	s
XB-S072-3	0,4	25	0,04	s

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 0,72 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Bei einer sehr geringen Startkonzentration von 0,72 g/L Polymer im THF/H₂O-Gemisch erhält man ausschließlich Mizellen. Die Abstände zwischen den einzelnen Molekülketten sind deutlich größer, was zu längeren Diffusionszeiten führt.

Da nur eine begrenzte Zeit zur Verfügung steht, entstehen folgerichtig nur kleine Partikel. Die niedrige Konzentration an Blockcopolymer verschiebt zusätzlich die cac (critical association concentration) zu einem Lösungsmittel-gemisch mit höherer Wasserkonzentration. Dieses wird erst weiter Richtung Mischerausgang erreicht. Die Selbstorganisation setzt zum Teil erst in den turbulenten Strömungen ein und wird sehr früh gestoppt. Der Übergang von Mizelle zu Vesikel wird durch diese Mischbedingungen nicht erreicht.

Tab. 19: DLS-Ergebnisse PB_{160} - PEO_{60} -COOH Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-S.1-1	3,6	28	0,09	s,v
XB-S.1-2	1,8	33	0,07	s,v
XB-S.1-3	0,6	38	0,1	s,v
XB-S.1-4	0,4	43	0,1	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 1 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Erhöht man die Startkonzentration auf 1 g/L, ist der Abstand zwischen den Polymerketten geringer. Wie in Tab. 19 zu sehen ist, werden dabei auch deutlich größere Partikel erzielt. Bei sehr langsamer Flussgeschwindigkeit von insgesamt 0,4 ml/min werden vorwiegend Vesikel gebildet.

Tab. 20: DLS-Ergebnisse PB_{160} - PEO_{60} -COOH Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-S146-1	3,6	31	0,05	s,d,v
XB-S146-2	1,8	36	0,08	v
XB-S146-3	0,6	45	0,09	v
XB-S146-4	0,4	53	0,1	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 1,46 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Auch die weitere leichte Erhöhung der Konzentration auf 1,46 g/L führt zu größeren Partikelradien, was zu erwarten war.

Denn sind die Polymerketten vollständig gelöst und zeigen keine Wechselwirkungen miteinander, kann angenommen werden, dass sie in einer Art kubisch-dichtest Packung vorliegen. Jede Polymerkette hat dann den gleichen Abstand zu seinem nächsten Nachbarn. Halbiert man nun die Konzentration, nimmt auch die Polymerkettenanzahl um die Hälfte ab.

Da das Volumen gleich bleibt, vergrößert sich der Abstand der Ketten zur nächsten Nachbarkette um den Faktor $\sqrt[3]{2}$.

Vergleicht man Tabelle 17 und 20, bei der die Konzentration um die Hälfte abnimmt, kann der Faktor von $\sqrt[3]{2}$ in der Radiusveränderung wieder gefunden werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der Radius nicht linear mit der Partikelzahl ansteigt. Die Veränderung des Radius mit diesem Faktor kann daher nur als qualitativer Richtwert gesehen werden. Trotzdem zeigt er eine relativ gute Übereinstimmung bei der Halbierung der Konzentration.

Die Abb. 4.14 fasst diese Ergebnisse zusammen und demonstriert die Einflussmöglichkeiten auf die Selbstorganisation mittels Mikromischer sehr anschaulich. Je niedriger die Konzentration ist, desto kleiner sind die Partikel. Auch die Flussabhängigkeit bzw. die daraus folgende Mischzeitveränderung, wie sie schon in Kap. 4.2 beschrieben wurde, wird eindrucksvoll belegt.

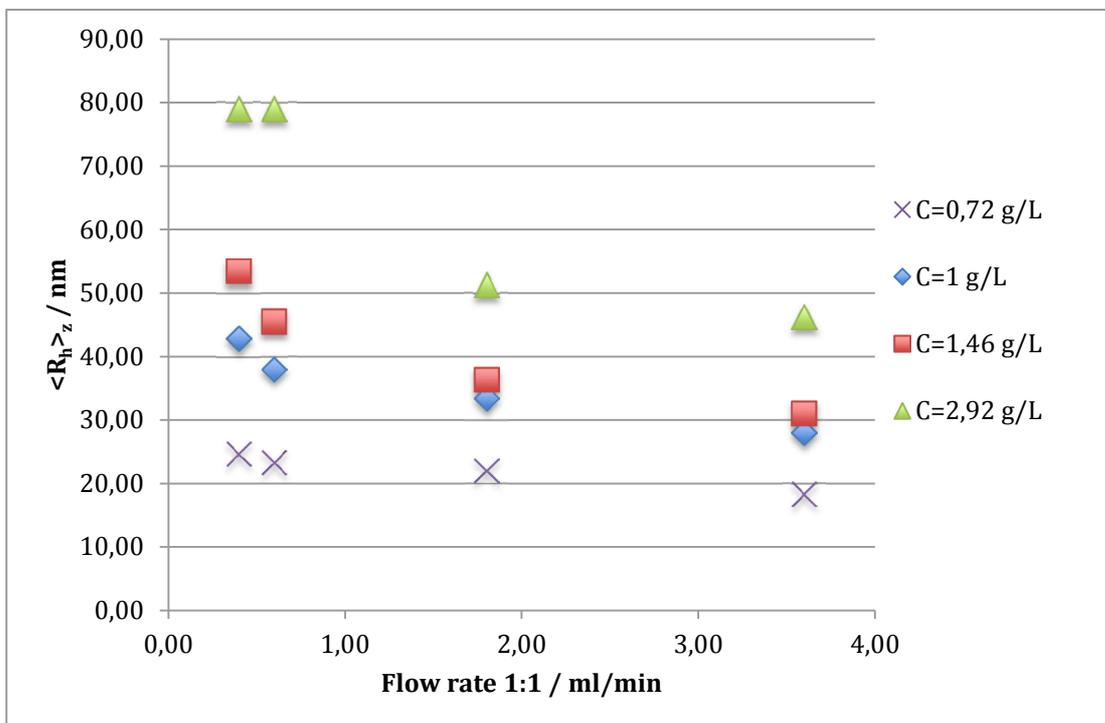


Abb. 4.14: Zusammenfassung der Mischergebnisse im CPMM bei unterschiedlichen Konzentrationen in 73/27 v%/v% THF/Wasser

Zusätzlich lassen sich vorwiegend bei Partikeln mit DLS-Radien $\sim 30 \text{ nm}$ anisotrope Partikel im Elektronenmikroskop finden. Abbildung 4.15 ist eine TEM-Aufnahme der vernetzten Probe XB-S146-1. Auch hier zeigen sich einige große sphärische Partikel ohne ausgeprägte Doppelschicht.

Dies bestätigt die Annahme, dass die Vesikel aus dem Zusammenschluss einer Scheibe geformt werden, denn sie lassen sich fast ausschließlich bei etwa DLS-Radien <35 nm finden. Über 35 nm sind bereits alle Scheiben so weit angewachsen, dass sie sich zu Vesikeln zusammengeschlossen haben.

Die Anzahl der Scheiben ist geringer als beim Polymer PB₁₃₀-EO₆₆. Eine Synthese von ausschließlich Scheiben des PB₁₆₀-PEO₆₀ war nicht möglich. Durch den noch größeren PB-Anteil erfolgte das Anwachsen der Lamelle im Vergleich zum PB₁₃₀-PEO₆₆ noch schneller und es entstanden schneller Vesikel. Aufgrund der geringen Anzahl an Scheiben im Vergleich zum PB₁₃₀-PEO₆₆ konnte für das Polymer PB₁₆₀-PEO₆₀ keine aussagekräftige Statistik wie in Abb. 4.13 erstellt werden.

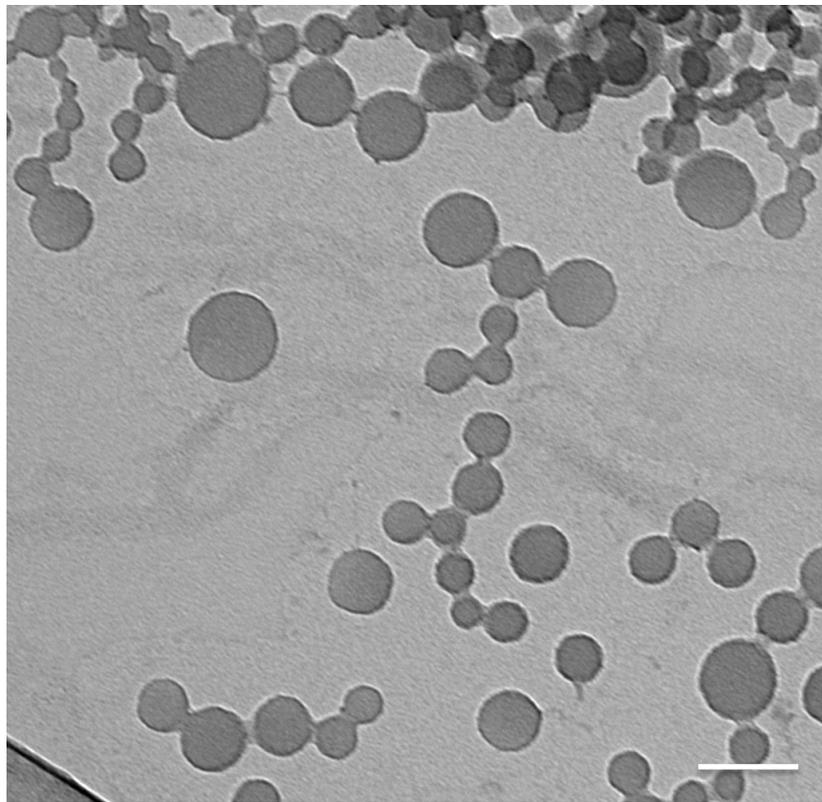


Abb. 4.15: Elektronenmikroskopieaufnahme der vernetzten
Proben XB-S146-1
Scalebar = 100nm

4.3.6 Temperaturabhängigkeit

Der Einfluss der Konzentration der Polymerlösung auf die Selbstorganisation konnte bereits nachgewiesen werden. Durch die Mikromischertechnologie lassen sich auch Reaktionen bei unterschiedlichen, kontrollierten Temperaturen leicht realisieren. Bedingt durch die gute Wärmeleitfähigkeit des Edelstahlmischers, kann die kontrollierte Selbstorganisation auch bei verschiedenen Temperaturen im thermostatisierten Bad durchgeführt werden.

Da die Temperatur sowohl die Diffusionsgeschwindigkeit (Brown'sche Bewegung schneller durch steigende thermische Energie) als auch die Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst, ist eine veränderte Selbstorganisation folgerichtig.

Die Tabellen 21-23 zeigen jeweils bei gleicher Konzentration von 2,92 g/L in der 73/27 v%/v% THF/Wasser Vormischung und gleichen Flussbedingungen die Analysen mittels DLS und TEM. Die höchste Konzentration wurde gewählt, da die höchste Flussrate ausschließlich Vesikel als dominierende Morphologie lieferte. Die Temperaturen wurden zwischen 10 °C (Tab. 22), 25 °C (Tab. 21) und 40 °C (Tab. 23) variiert.

Eine niedrige Temperatur von 10 °C verringert die Diffusionsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle bzw. deren selbstorganisierenden Strukturen im Vergleich zu 25°C. Außerdem erhöht sich die Viskosität des Wassers von 0,65 mPa*s bei 40 °C über 0,9 mPa*s bei 25 °C auf 1,3 mPa*s bei 10 °C.[116] Ähnlich wie bei der Verringerung der Konzentration um die Hälfte (Tabelle 20) kann ein Faktor bestimmt werden, der die Abnahme qualitativ widerspiegelt. Im Vergleich zur Strecke die bei Verringerung der Konzentration verlängert wird, wird jetzt die Geschwindigkeit der Ketten verändert. Die Mobilität einer Polymerkette kann über seinen Diffusionskoeffizienten ausgedrückt werden. Dieser kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung $D = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_h}$ für ein gegebenes Block-Copolymer mit dem Radius R_h bestimmt werden. Daraus ergeben sich dann die Faktoren $D_{25^\circ\text{C}}/D_{10^\circ\text{C}} = 1,5$ bzw. $D_{40^\circ\text{C}}/D_{25^\circ\text{C}} = 1,4$ unter Vernachlässigung des temperatur-abhängigen Löseverhaltens von PEO.

Die entstehenden Partikelradien folgen diesen Faktoren und werden bei allen Flussraten kleiner. Allerdings ist der Unterschied, vor allem bei sehr schnellen Flussraten, sehr klein. Ein möglicher Grund hierfür könnte die freigesetzte Mischungsenthalpie von Wasser und THF sein. Diese ist bei niedriger Temperatur am größten und nimmt mit steigender Temperatur ab (10°C → 25 °C → 40 °C).[117] Daher kann es bei hohen Flussraten und niedriger Temperatur des Bades zu einem Temperaturungleichgewicht innerhalb des Mischers kommen, da sich die Lösung sehr schnell erwärmt und nicht ausreichend vom Mischer gekühlt werden kann.

Bei niedrigeren Flussraten ist der Unterschied der DLS-Radien zwischen 10 °C und 25 °C größer. Die Mischungswärme wird nicht ganz so schnell frei und kann besser durch das Bad ausgeglichen werden.

Tab. 21: Analyse der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM bei 25 °C

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-292-1	3,6	46	0,07	V
XB-292-2	1,8	51	0,09	V
XB-292-4	0,4	79	0,11	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Tab. 22: Analyse der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM bei 10 °C

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-292-5	3,6	45	0,09	V
XB-292-6	1,8	48	0,09	V
XB-292-7	0,6	64	0,09	V
XB-292-8	0,4	68	0,06	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Bei höherer Temperatur von 40°C spielt die Mischungsenthalpie kaum noch eine Rolle und die DLS-Radien zeigen einen signifikanten Anstieg bei allen Flussgeschwindigkeiten. Allerdings vergrößern sich die μ_2 -Werte ebenfalls, was sich durch Fusionieren von großen Vesikeln bei dieser Temperatur erklären lässt.

Tab. 23: Analyse der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM bei 40 °C

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
XB-292-9	3,6	69	0,09	V
XB-292-10	1,8	85	0,1	V
XB-292-11	0,6	97	0,12	V
XB-292-12	0,4	107	0,14	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Die großen Radien bei hoher Flussgeschwindigkeit lassen sich nur teilweise durch die schnellere Diffusionsgeschwindigkeit erklären.

Ein weiterer Faktor liegt in der temperaturabhängigen Löslichkeit von PB-PEO im THF/Wasser Gemisch, der „cat“ (critical association temperature).

Die kritische Assoziationstemperatur gibt an, ab welcher Temperatur bei gegebener Konzentration die Bildung von Strukturen einsetzt. Hierbei entsteht durch Freisetzung des gebundenen Lösungsmittels mehr Energie, als durch die Lösungsenthalpie verloren geht. In wässriger Umgebung ist dieses Verhalten für das System PB-PEO vernachlässigbar, da PB in Wasser quasi unlöslich ist. Für die im Kanal auftretenden THF/Wasser-Gemische wird die „cat“ jedoch eine Rolle spielen. Die Selbstorganisation beginnt im Kanal durch die höhere Temperatur früher. Da am Anfang des Kanals noch durch langsame Diffusion und nicht durch Turbulenzen gemischt wird, erklärt es auch die bei erhöhter Temperatur deutlich größeren Partikelradien.

Die Zusammenfassung der Temperatureinflüsse ist in Abb. 4.16 zu sehen. Sie unterstreicht zum einen noch einmal die Kontrollierbarkeit der Partikelradien mit der Flussgeschwindigkeit wie sie in Kapitel 4.2 bereits anschaulich beschrieben wurde. Zum anderen zeigt sich auch die starke Temperaturabhängigkeit der Selbstorganisation von PB-PEO in Mikromischern.

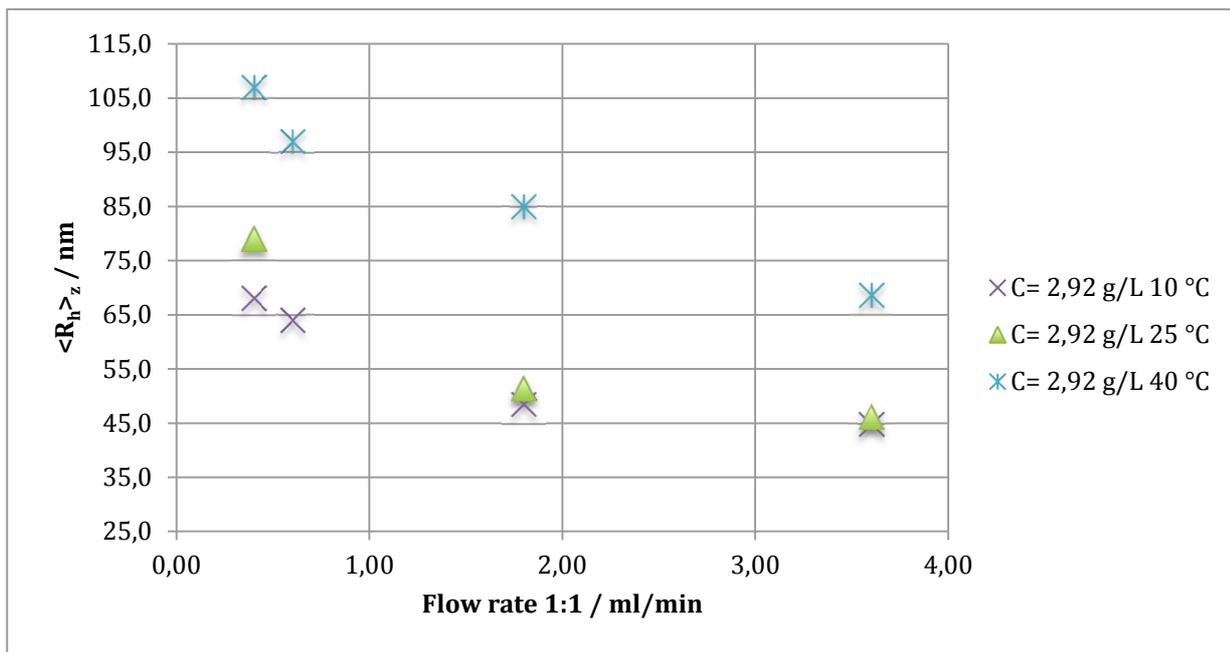


Abb. 4.16: Zusammenfassung der Mischergebnisse im CPMM bei unterschiedlichen Temperaturen
Startkonzentration von 2,92 g/L XB in 73/27 v%/v% THF/Wasser

4.3.7 Kontinuierliche hydrophobe Beladung von PB-PEO

4.3.7.1 Quantum Dots

Die erfolgreiche hydrophile und hydrophobe Beladung im Batchversuch konnte in der Arbeit von Mueller [2009] gezeigt werden. Als hydrophile Beladung des Kerns diente PhloxinB, dessen Fluoreszenz durch pH-Änderungen im Säuren gequenchet werden kann. Es konnte dort gezeigt werden, dass die hydrophobe Schale sogar Protonen erfolgreich vom inneren Kern abhalten konnte. Die Beladung erfolgte sowohl im Batchverfahren als auch in der Filmrehydration.

Als hydrophobe Beladung konnte sowohl Nilrot als auch Quantum Dots in die Schale eingelagert werden. Die hydrophobe Beladung mit Quantum Dots war nur über die Filmrehydration zugänglich. Während des Batchverfahrens fielen die Quantum Dots aus, da an der Eintropfstelle immer ein sehr großer Wasseranteil in der Lösung entsteht. Die relativ langsame Zugabe war nötig, da ansonsten keine gleichmäßige Wasserverteilung während der Selbstorganisation gewährleistet werden konnte. Da die Selbstorganisation noch nicht eingesetzt hatte, die Quantum Dots aber bereits ihre Löslichkeit im Wasser/THF Gemisch verloren hatten, konnten keine Quantum Dots über die Batchmethode in die Vesikelschale direkt eingelagert werden.

Da mit der Mikromischertechnologie eine ebenso schnelle wie gleichmäßige Mischung möglich ist, wird die Einlagerung der Quantum Dots in die Schale untersucht.

Tab. 24: Analyse der $PB_{160}-PEO_{60}-COOH$ Partikelsynthese mit QD-Beladung

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
GPXB10QD	4,8	34	0,06	V
GPXB5QD	3,6	35	0,06	V
GPXB6QD	1,8	45	0,08	V
GPXB7QD	0,6	52	0,09	V
GPXB9QD	0,4	50	0,09	V
GPXB8QD	0,2	61	0,07	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 0,5w% QD-Beladung (bezogen auf das Polymer); Morphologie: V=Vesikel

Trotz der Beladung mit in Wasser unlöslichen Quantum Dots, haben die Proben eine niedrige Polydispersität (Tab. 24). Ähnlich wie schon bei den unbeladenen Vesikeln reicht die Größe von 34 nm (schnelle Flussgeschwindigkeit) zu 61 nm (langsame Flussgeschwindigkeit).

Abbildung 4.17 zeigt ein TEM-Bild der Probe GPXB7QD mit QuantumDots in der Schale (Weiße Pfeile) mit sehr einheitlicher Größenverteilung.

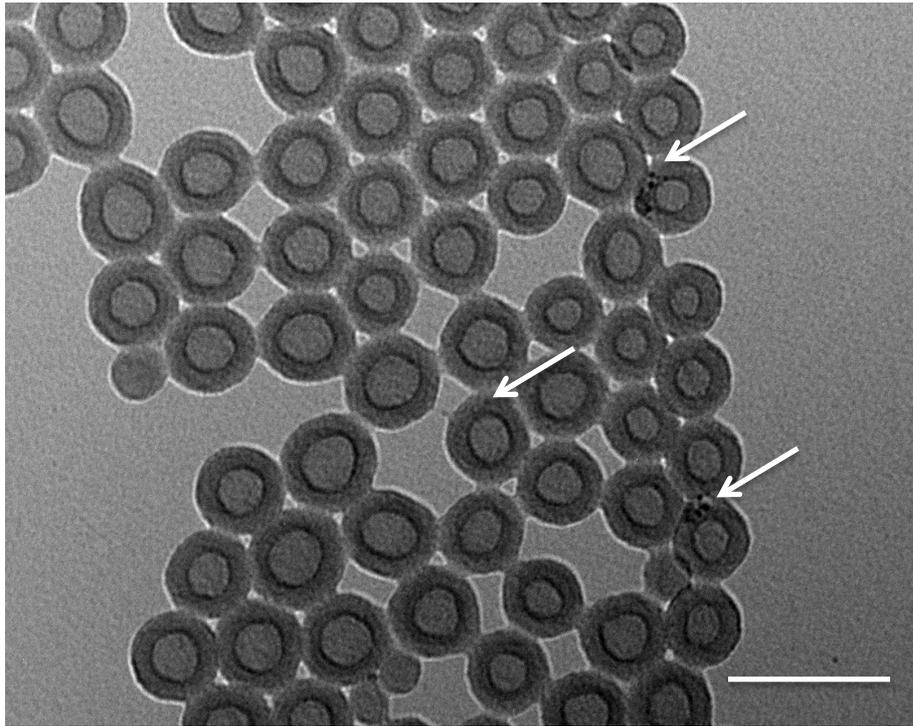


Abb. 4.17: TEM-Aufnahme der vernetzten Probe GPXB7QD mit eingelagerten QDs (weiße Pfeile)
Scalebar = 100nm

Mit Erhöhung der QuantumDot-Konzentration bezogen auf die Polymer-konzentration war es gleichzeitig möglich eine Erhöhung der Beladung zu erzielen. Dies allerdings führte zu einer sehr großen Polydispersität. Schon bei hohen Flussraten zeigten sich große DLS-Radien mit hohem μ_2 -Wert (Tabelle 25).

Es ist auch kein einheitlicher Trend mehr zu sehen, dass die Vesikel mit langsamerer Flussgeschwindigkeit größere Partikel ausbilden.

Tab. 25: Analyse der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese mit QD-Beladung

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
GPXB11	3,6	68	0,12	V
GPXB12	1,8	85	0,13	V
GPXB16	0,4	73	0,1	V
GPXB14	0,2	77	0,13	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 4w% QD-Beladung (bezogen auf das Polymer); Morphologie: V=Vesikel

Da sich trotz hoher QuantumDot-Konzentration keine Fällung zeigte, scheint die Selbstorganisation und der Einbau der Partikel nicht behindert gewesen zu sein. Die TEM-Aufnahme der Probe GPXB-16 (Abb. 4.18) zeigt verschiedene Partikel mit hoher Beladung an QuantumDots. Man kann sehen, dass das Polymer keine einheitliche Doppelschicht mehr ausbilden kann, da die hydrophobe Schale instabil wurde. Mehrere Vesikel fusionieren zum Teil zusammen und bilden Multivesikel aus. Es gibt also eine obere Grenze der Beladungskonzentration, bei der Vesikel aus PB-PEO ihre Stabilität verlieren.

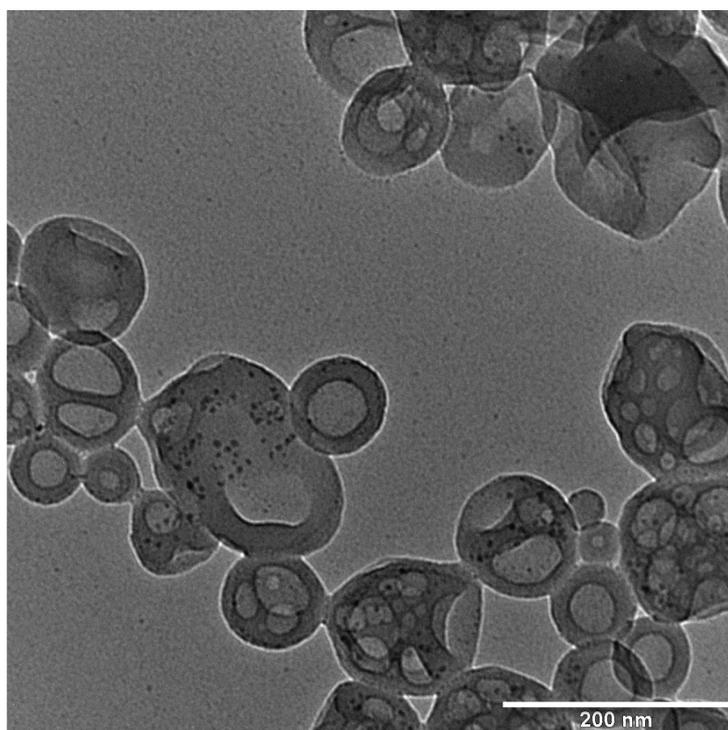


Abb. 4.18: TEM-Aufnahme der vernetzten Probe GPXB16, eingelagerte QD verursachen Destabilisierung der Schale

Nimmt man für die Kern-Schale-Schale Quantum Dots ein molares Gewicht von etwa 100 kg/mol an, kann die Beladungsdichte pro Vesikel abgeschätzt werden. Für eine Aggregationszahl von $Z = 20000$ ^[89] für Vesikel ergeben sich bei 4w% Beladung 88 Quantum Dots pro Vesikel und für 0,5w% 11 Quantum Dots pro Vesikel. Dies erklärt auch die Destabilisierung der Membran mit der hohen Anzahl an Quantum Dots pro Vesikel bei 4w% Beladung. Während in den Polymervesikeln bei 0,5w% Beladung auch zahlreiche Vesikel ohne Quantum Dots zu finden sind, gibt es bei 4w% Beladung nur noch sehr wenige Vesikel, welche in den TEM-Bildern keine Quantum Dots aufweisen.

4.3.7.2 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Neben QuantumDots als fluoreszente hydrophobe Partikel können auch superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel in die Schale eingelagert werden. Magnetische Vesikel bieten viele potentielle Anwendungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel als MRT Kontrastmittel, zur Hyperthermie oder als multifunktionaler Wirkstoffträger.

Die Mischbedingungen mussten für die Beladung mit Eisenoxidnanopartikeln allerdings angepasst werden, da diese bei 70/30 THF/Wasser-Gemischen innerhalb weniger Sekunden ausgefallen sind. Bei einer 80/20 Vormischung konnte keine direkte Fällung mehr beobachtet und die symmetrischen Mischbedingungen beibehalten werden. Auch Konzentrationen oberhalb von 4% Eisenoxidnanopartikel bezogen auf das Polymer waren nicht erfolgreich. Hierbei trat eine Fällung nach dem Mischen auf. Tabelle 26 zeigt die Vesikelgrößen resultierend aus der DLS.

Tab. 26: Analyse der PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH Partikelsynthese mit Fe-NP-Beladung

Probe	Flussrate ml/min	R _h nm	μ ₂	TEM Morphologie
XB8020-1	3,6	35	0,08	V
XB8020-2	1,8	36	0,1	V
XB8020-3	0,4	38	0,08	V
XB8020-4	0,2	52	0,12	V

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 2 g/L Polymer in THF/H₂O (80/20 v^o/v^o)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 4w% Fe-NP-Beladung (bezogen auf Polymer); Morphologie: V=Vesikel

Die Beladung mit 4w% Eisenoxid bezogen auf das Polymer scheint der Vesikelbildung nicht abträglich zu sein. Es bilden sich in ihrer Größe einheitliche Vesikel aus. Nach dem Mischvorgang ist auch keine Fällung von Eisenoxid zu erkennen. Trotzdem ist die Beladungsdichte im TEM relativ niedrig und es lassen sich nur wenige Partikel finden, bei denen Eisenoxid in die Schale eingelagert ist. Abb. 4.19 zeigt ein Vesikel mit Eisenoxid in der Schale (Weiße Pfeile). Der Grund für die niedrige Einbauquote könnte sein, dass sich die hydrophoben Eisenoxidpartikel im Lösungsmittelgemisch von Wasser und THF teilweise vororientieren und polymer-stabilisierte Cluster bilden, die anschließend nicht mehr eingebaut werden können. Dies findet bei größeren Konzentrationen noch schneller statt und führt somit zur Ausfällung. Für einen effizienten Einbau solcher hydrophober Partikel kann keine Vormischung gewählt werden. Um eine möglichst effiziente Beladung zu erreichen, muss man mit 100% THF als Lösungsmittel der Polymerphase starten.

Hierbei muss darauf geachtet werden, dass symmetrische Flussbedingungen ausgeschlossen sind. In diesem Fall würde der resultierende THF-Gehalt bei 50% liegen. Bei dieser THF-Konzentration ist die Selbstorganisation noch nicht abgeschlossen bzw. kinetisch eingefroren.

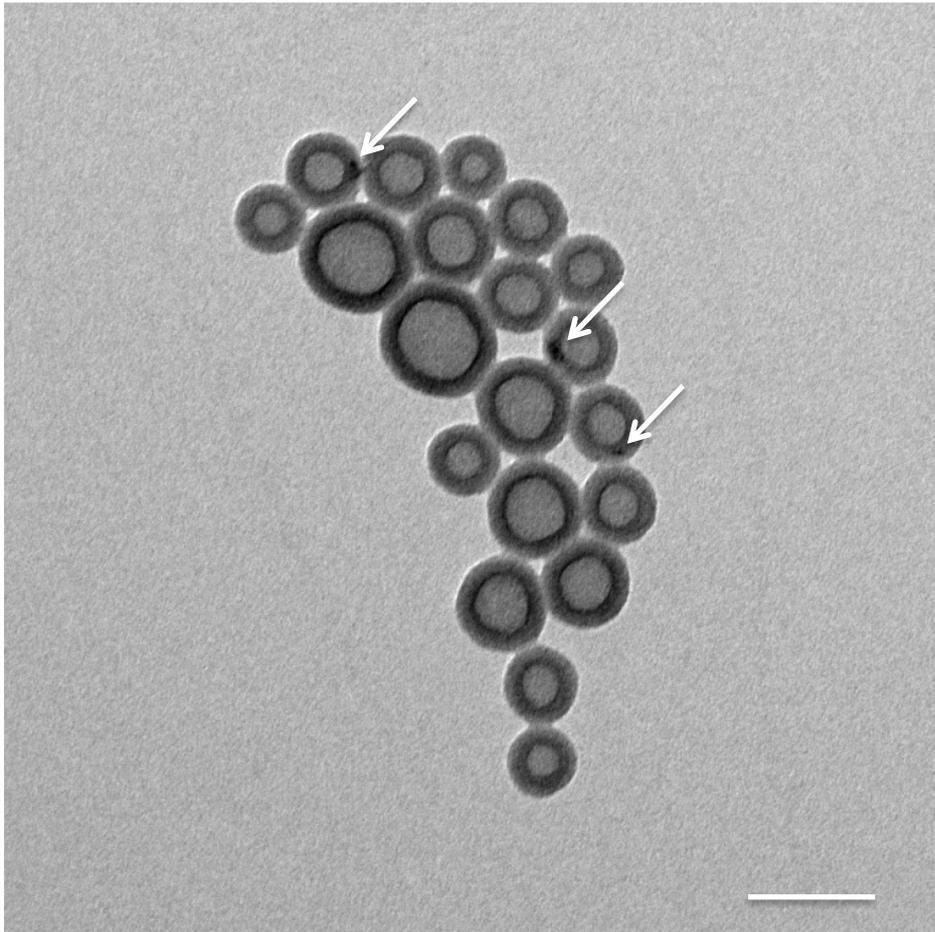


Abb. 4.19: TEM-Aufnahme der vernetzten Probe GPXB8020-4 mit eingelagerten Fe-NP (weiße Pfeile)
Scalebar= 100nm

4.3.7.3 Dualbeladung von Polymervesikeln

Eine gleichzeitige Beladung von Eisenoxidnanopartikeln und QuantumDots wurde ohne Vormischung untersucht. Die Verwendung von 100% THF als Lösungsmittel sollte die Effizienz der Beladung, wie bereits im Kapitel zuvor beschrieben, deutlich erhöhen.

Dazu wurden 4w% Eisenoxid und 0,5w% (jeweils bezogen auf die Polymerkonzentration) QuantumDots direkt in die Polymerlösung gegeben und im Mikromischer gemischt, um multifunktionelle Polymersomen zu erhalten.

Tab. 27 zeigt die Mischergebnisse mit dem CPMM von PB₁₆₀EO₆₀COOH mit Eisenoxidnanopartikeln und QuantumDots. Da sichergestellt werden musste, dass die THF-Konzentration nach dem Mischen unterhalb von 34% liegt, wurde im Verhältnis 1:3 (THF:Wasser) gemischt. Auch hier kann man erkennen, dass die Vesikelgröße mit steigender Flussrate abnimmt. Allerdings ist die Polydispersität relativ hoch. Dies ist einerseits der großen Anteile an hydrophoben Partikeln in der Schale geschuldet. Andererseits kann es aufgrund der asymmetrischen Flussbedingungen zu Turbulenzen bzw. Kompressionen im THF-Strom kommen, wie dies schon in Kap. 4.2 besprochen wurde.

Alle Proben waren stabil und keine Fällung wurde beobachtet. Die hydrophoben Partikel wurden also erfolgreich in die Vesikelschale eingebaut, obgleich eine erhöhte Polydispersität nicht verhindert werden konnte.

Tab. 27: Analyse der PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH Partikelsynthese mit Dual-Beladung

Proben	Flussrate H ₂ O (ml/min)	Flussrate THF/P (ml/min)	$\langle R_g \rangle$ nm	$\mu_2(90^\circ)$	TEM Morphologie
XB_C6_4	4,8	1,6	73,5	0,13	S, <u>V</u>
XB_C6_5	2,4	0,8	77,3	0,12	S, <u>V</u>
XB_C6_6	1,8	0,6	84,4	0,13	S, <u>V</u>
XB_C6_7	0,6	0,2	83,6	0,11	S, <u>V</u>
XB_C6_3	0,3	0,1	103	0,07	S, <u>V</u>

THF/P: 5 g/L Polymer in THF; 0,5% QD-Beladung, 4% Fe-Np

$\langle R_g \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung Morphologie: S=Mizelle, V=Vesikel

Auch die TEM-Bilder (Abb. 4.20) bestätigen den erfolgreichen Einbau von Eisenoxid-Nanopartikeln.

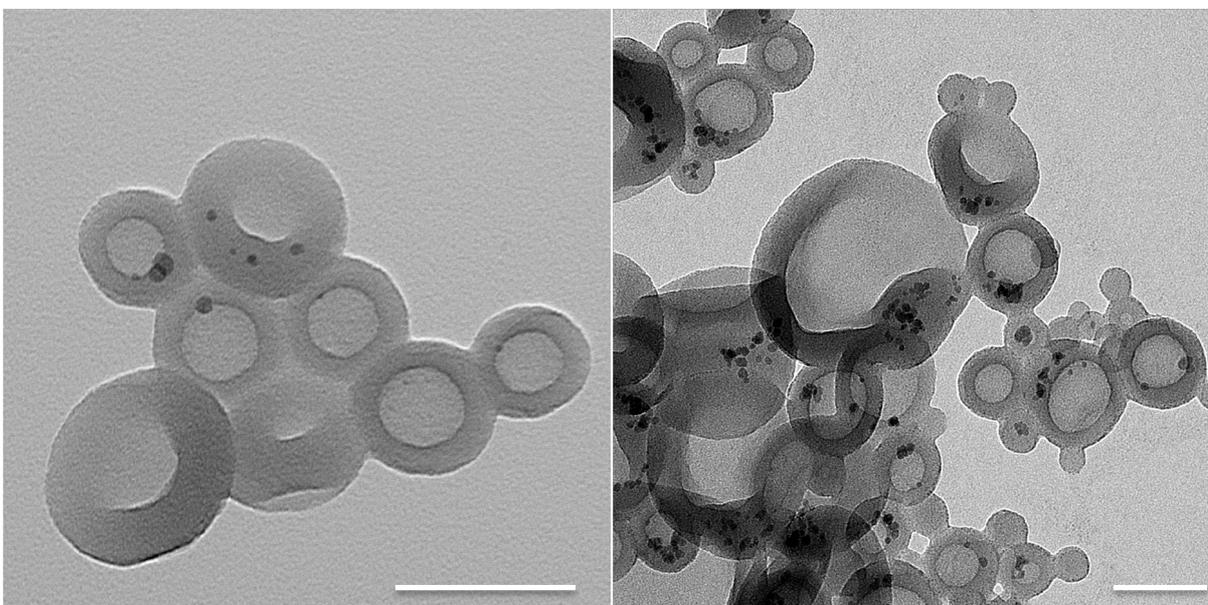


Abb. 4.20: TEM-Aufnahme der vernetzten Probe XB_C6_3 (links) und XB_C6_4 (rechts)
Einbau von Eisenoxid- und QuantumDot-Partikeln in die hydrophobe Vesikelschale
Scalebar = 100 nm

Abbildung 4.21 zeigt ebenfalls eine TEM Aufnahme der vernetzten Probe XB_C6_4. Dazu wurden zwei EDX-Spektren von einem Vesikel und einer Mizelle aufgenommen. Sie zeigen deutlich, dass sowohl die USPIOS (Fe-Signal) als auch die Quantum Dots (Cd-Signal) in das Polymer eingelagert wurden. Die Quantum Dots zeigen wie vermutet, einen deutlich schlechteren Kontrast und sind schwieriger als die Eisenoxid-Nanopartikel zu erkennen.

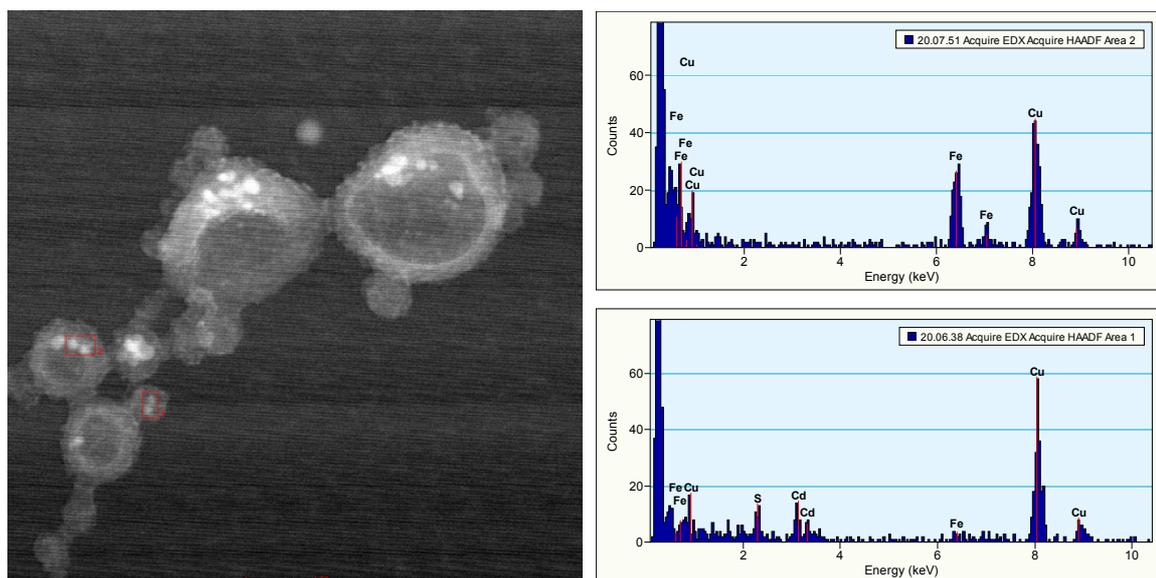


Abb. 4.21: TEM-Aufnahme der vernetzten Probe XB_C6_4 (links) und den EDX-Spektren aus zwei verschiedenen Positionen 1 und 2 (rechts)
(Rahmen 1 entspricht dem unteren Spektrum und Rahmen 2 dem oberen Spektrum)

4.4 Pluronic®-L121-Vesikel

4.4.1 Pluronic®-L121 im Mikromischer

Pluronic®-L121 Vesikel zeichnen sich durch Biokompatibilität und eine dünne flexible Membran aus. Die aus Polyethylenoxid und Polypropylenoxid bestehende Membran, ist nur etwa 3-5 nm dick und sehr durchlässig für Wasser oder andere hydrophile Moleküle.[46] Der sehr große hydrophobe Block von 68 Polypropylenoxid-Monomeren führt aber auch zu einer hohen Tendenz lamellare Strukturen mit kleiner Krümmung ausbilden zu wollen. Gepaart mit der hohen cmc dieses Polymers sind die Vesikel nur wenige Stunden bis Tage stabil. Durch die Instabilität war die Einsatzmöglichkeit bisher äußerst beschränkt, da es zur Stabilisierung erforderlich war, Quervernetzer in die Membran einzubauen. Diese Vernetzer müssen mittels UV oder Radikalstartern aktiviert werden und verändern bzw. verkomplizieren das System. Die Herstellung einheitlicher Vesikelgrößen ist schwierig bzw. langwierig, weil diese Vesikel meist über Elektroformation und anschließender Extrusion dargestellt werden.

Wie schon bei den Polybutadien-Polyethylenoxid Vesikeln wurde das Polymer L121 zunächst in THF gelöst. Dieses ist gleichermaßen für Ethylenoxid und Propylenoxid ein gutes Lösungsmittel. Anschließend wird es mit Wasser gemischt und die Selbstorganisation ausgelöst. Da die Selbstorganisation schon bei niedriger Wasserkonzentration ausgelöst wird, konnte bei L121 auf eine Vormischung verzichtet werden. Es wurde dafür eine höhere Konzentration an L121 in der Stammlösung von 10 g/L gewählt und diese in unterschiedlichen Flussraten verwendet. Tabelle 28 fasst unterschiedliche Flussraten mit den korrespondierenden Partikelgrößen zusammen. Wie schon bei PB-PEO führen niedrige Flussraten zu größeren Vesikeln, während hohe Flussraten zu kleineren Partikeln führen.

Tab. 28: DLS-Ergebnisse der Pluronic®-L121-Partikelsynthese im CPMM

Proben	Flussrate H ₂ O (ml/min)	Flussrate THF/P (ml/min)	$\langle R_h \rangle$ nm	$\mu_2(90^\circ)$
PLA1	10	1	47	0,16
PLA2	5	1	66	0,07
PLA3	1	0,2	73	0,10
PLA4	0,6	0,12	75	0,11

Konzentration THF/P: 10g/L L121

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Für weitere Anwendungen, die eine Modifikation mit unterschiedlichen Molekülen an der Membranwand erfordern, ist es oft hilfreich zunächst eine Modifikation der Endgruppe durchzuführen. Wie schon bei PB-PEO wurde die Endgruppe OH durch eine COOH-Gruppe ersetzt. Diese erfolgte analog zu den Polymeren PB₁₃₀-PEO₆₆/PB₁₆₀PEO₆₀ durch Addition eines Bernsteinsäureanhydrids. Dabei entstehen Esterbindungen, die basisch abgespalten werden können. (siehe Anhang)

Wie schon bei PB-PEO zu beobachten war, konnte eine erneute Veränderung des Selbstorganisationsverhaltens festgestellt werden (Tab. 29). Durch spezifische Wechselwirkung der Carboxygruppe mit der PEO-Kette wird das Polymer in die Länge gezogen und verschlankt damit im Vergleich zum ungeladenen Polymer seinen hydrophilen Anteil. Somit können auch die größeren Partikelradien erklärt werden, die im Vergleich zum unmodifizierten Polymer entstehen. Der Trend der Flussraten, die mit den Vesikelgrößen korrelieren, bleibt allerdings gleich und bestätigt, dass unterschiedliche Flussraten unterschiedlichen Mischzeiten entsprechen. Durch verschiedene Mischzeiten bleibt dem Polymer unterschiedlich viel Zeit zur Selbstorganisation, woraus verschiedene Vesikelgrößen resultieren.

Es können nicht nur verschiedene sondern auch einheitliche Größen dieser polymeren Nanohohlkugeln erzielt werden. Bedingt durch die hohe Affinität des Polymers zur Lamellenbildung verändern sich die Vesikel aus Polymeren mit COOH-Endgruppen noch schneller und zeigen auch eine erhöhte Polydispersität im Vergleich zu den Vesikeln mit OH-Endgruppen.

Tab. 29: DLS-Ergebnisse der Pluronic®-L121-COOH Partikelsynthese im CPMM

Proben	Flussrate H ₂ O (ml/min)	Flussrate THF/P (ml/min)	$\langle R_h \rangle$ nm	$\mu_2(90^\circ)$
PLB1	10	1	58	0,12
PLB2	5	1	62	0,13
PLB3	1	0,2	74	0,12
PLB4	0,6	0,12	95	0,11

Konzentration THF/P: 10g/L L121-COOH

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

4.4.2 Kontinuierliche Beladung von Pluronic®

Aufgrund der Biokompatibilität und guten Membrandurchlässigkeit sind Pluronic® als multifunktionelle Vesikel für den Einsatz als Wirkstoffträger oder Biomarker sehr interessant. Da eine Herstellung im Mikromischer in Kap. 4.6.1 gezeigt werden konnte, wurde nun die Aufnahme von hydrophoben Partikeln untersucht. Durch den großen hydrophoben Polypropylenoxidanteil von 68 Monomeren des Pluronic® L121 lassen sich ähnlich zum PB-PEO-Polymer hydrophobe Moleküle und Partikel in die Schale einlagern.

Tab. 30 zeigt die Mischergebnisse mit unterschiedlichen hydrophoben Einlagerungen. Als hydrophobe Einlagerungen wurden wieder superpara-magnetische, Ölsäure-beschichtete Eisenoxidnanopartikel und fluoreszierende Quantum Dots in wechselnden Konzentrationen gewählt.

Tab. 30: DLS-Ergebnisse der L121-COOH Partikelsynthese mit Beladung im CPMM

Proben	Fe-Gehalt (w% [*])	QD-Gehalt (w% [*])	R _h ^{**} (nm)	μ ₂ (90°)
PLB-8Fe	8	0	77	0,05
PLB-16Fe	16	0	83	0,05
PLB-4FeQD	4	0,5	74	0,09
PLB-QD	0	1	[100]	[0,12]
PLB-QD2	0	2	[84]	[0,14]

THF/P: 10g/L L121, Flussrate H₂O=10ml/min; Flussrate THF/P=1,5ml/min
 <R_h>: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels <1/Rh>z⁻¹ aus dynamischer Lichtstreuung
 Eckige Klammern = Hohe Polydispersität
 *bezogen auf das Polymer
 **gemessen nach Abdampfen über Nacht

Trotz der recht hohen Konzentration an hydrophoben Nanopartikeln blieben alle Lösungen stabil. Da die hydrophoben Nanopartikel in Wasser sofort ausfallen würden, müssen diese durch das Polymer stabilisiert worden sein.

Die Lichtstreuung zeigte ebenfalls keine Strukturen bei 10-20 nm, welches auf sphärische Mizellen hindeuten würde. Die Partikel scheinen in die Vesikelmembran eingebaut worden zu sein. Interessanterweise konnten für höhere Beladungsdichten ab 4w% niedrigere μ₂-Werte als für 1w% - 2w% Beladung gefunden werden. Alle μ₂-Werte liegen dann unterhalb von 0,1 und deuten auf eine niedrige Polydispersität hin. Da die Proben erst nach Abdampfen über Nacht gemessen wurden, sollte für alle Partikel eine erhöhte Polydispersität erwartet werden.

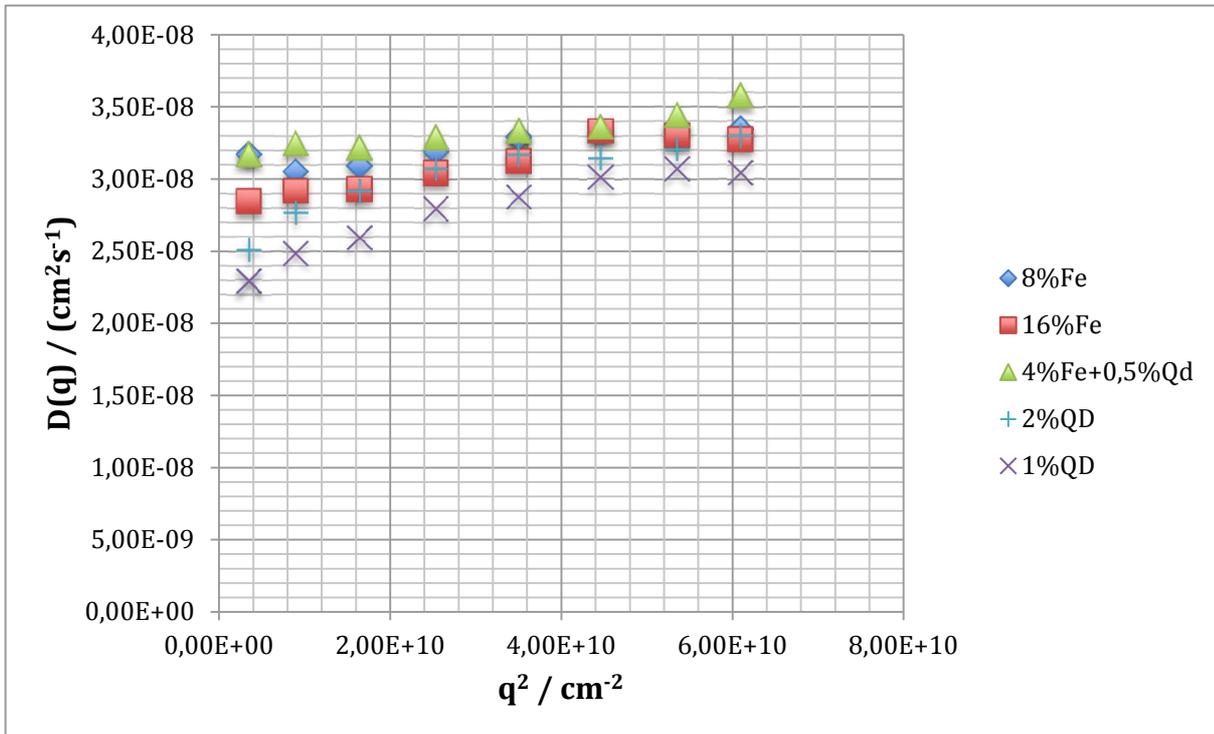


Abb. 4.22: Winkelabhängige Auftragung des apparenten Diffusionskoeffizienten der Proben; Unterschiedliche Beladungen führen zu geringerer Winkelabhängigkeit und damit zu einer niedrigeren Polydispersität

Bei hoher Beladungsdichte zeigte sich allerdings eine niedrige Winkelabhängigkeit (Abb. 4.22) und signalisiert eine Stabilisierung der Vesikel.

Durch 16w% Eisenoxidgehalt lassen sich die hergestellten Partikel durch ein Magnetfeld leicht separieren und erneut durch Lichtstreuung vermessen. Tab. 31 liefert die DLS-Ergebnisse der magnetseparierten Probe PLB16. Trotz der Instabilität von L121-Vesikeln ließen sich die Partikel sehr gut abtrennen. Bei gleicher Konzentration liefern die Vesikel mit Eisenoxid eine fast 30mal so hohe Intensität des gestreuten Lichts als die Partikel, die sich nicht mittels Magnetfeld abtrennen ließen. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass Eisenoxid rotes Laserlicht zusätzlich absorbiert, was das tatsächliche Verhältnis an Partikeln mit und ohne Eisen noch vergrößert. Das Eisenoxid scheint in die Vesikel gleichmäßig eingelagert worden zu sein.

Der hydrodynamische Radius ist trotz der Abtrennung nicht signifikant größer geworden. Dies beweist zum einen dessen magnetischen Eigenschaften und zum anderen die Stabilität der Partikel.

Auch die statische Lichtstreuung liefert einen Trägheitsradius der nahe des hydrodynamischen Radius liegt und daher die Annahme von Vesikeln als Morphologie der Partikel bestätigt.

Tab. 31: DLS-Ergebnisse und Streuintensität der Magnetseparation

Proben	Count-rate Verhältnis	Verhältnis Intensität	$\langle R_h \rangle$ (nm)	μ_2	$\langle R_g \rangle$ (nm)
PLB-16Fe-Separated	3,7 MHz	28	86	0,05	88
PLB-16Fe-Residue	131 kHz	1	65	0,07	64

PLB-Separated = Magnetseparation aus 2ml Probe PLB16 in 2ml H₂O

PLB-Residue = Magnetseparierte Lösung der Probe PLB16

Count-rate gemessen bei 90° einer 1:10 verdünnten Probe

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

$\langle R_g \rangle$: Trägheitsradius aus statischer Lichtstreuung bei 1:10 Verdünnung

4.4.3 Stabilität von Pluronic® Vesikeln

4.4.3.1 Unfunktionalisiertes Pluronic®-L121

Pluronic®-L121 Vesikel haben wie bereits erwähnt den Vorteil biokompatibel und ihre Polymermembran durchlässig für kleine Moleküle zu sein. Durch die Möglichkeit der direkten Beladung mit Eisenoxidpartikeln oder Quantendots können die Polymersomen in großer Zahl und engen Größenverteilungen kontinuierlich hergestellt werden. Die Synthese unter immer gleichen Bedingungen ermöglicht die bessere und häufigere Nutzung auch in biomedizinischen Anwendungsgebieten. Durch Kopplung mit Targeting-Proteinen und zusätzlichen Farbstoffmarkierungen lassen sich viele Anwendungsmöglichkeiten vorstellen.

Ein Nachteil der reinen L121-Polymersomen ist ihre Instabilität. Nur frisch hergestellte Vesikel haben eine enge Größenverteilung. Durch Diffusion einzelner Polymermoleküle und der Fusion vorhandener Vesikel werden die Polymerradien unterschiedlicher. Eine Stabilisierung wurde bereits mit PETA berichtet (siehe Kap. 2.4). PETA ist allerdings zytotoxisch und eignet sich nicht für Zellversuche. Außerdem muss das Molekül in großer Zahl in die Vesikel eingelagert werden und anschließend mittels UV oder Radikalstartern vernetzt werden. Dies würde weitere Anwendungsmöglichkeiten stark einschränken, da nicht alle eingelagerten Moleküle oder Partikel UV-Bestrahlung standhalten können.

Bei der Beladung der Vesikel mit Eisenoxidnanopartikeln konnte beobachtet werden, dass die resultierenden Polymervesikel eine sehr enge Größenverteilung haben. Diese war deutlich schmäler als bei den unbeladenen Vesikeln, die unmittelbar nach der Produktion entstanden sind. Trotz der hohen Beladung mit 16w% Eisenoxidnanopartikeln konnte hier beobachtet werden, dass sich die Größenverteilung dieser Vesikel kaum verändert.

Tab. 32: Zeitliche Veränderung der DLS-Radien mit unterschiedlicher Beladung

Probe	Fe-NP (w%)	Herstellung		+24 Stunden		+3 Tage		+4 Tage		+7Tage	
		$R_{h,90^\circ}$ nm	μ_2 (90°)								
PLSA9	0	65	0,09	61	0,09	51	0,11	49	0,1	50	0,1
PLSA10	4	66	0,09	68	0,06	66	0,08	65	0,12	65	0,1
PLSA12	16	70	0,09	67	0,1	66	0,1	66	0,1	66	0,09

THF/P: 10g/L L121, Flussrate H₂O=10ml/min; Flussrate THF/P=1,5ml/min; c_{dis} =0,1g/L
 $R_{h,90^\circ}$: Apparenter hydrodynamischer Radius bei 90° aus dynamischer Lichtstreuung
 Fe-Konzentration bezogen auf den Polymeranteil

Tabelle 32 zeigt drei verschiedene Proben mit unterschiedlichen Eisengehalten.

PLSA9 enthält kein Eisenoxid und zeigt eine deutliche Veränderung des apparenten hydrodynamischen Radius gemessen bei 90° . Die Probe verändert sich stetig weiter und zeigt auch eine Zunahme des μ_2 -Wertes bei 90° . Dies lässt darauf schließen, dass die Polydispersität zunimmt. Auch eine Auftragung der Diffusionskoeffizienten gegen den Streuvektor q^2 (Abb. 4.23) zeigt eine starke Veränderung der Partikelgröße.

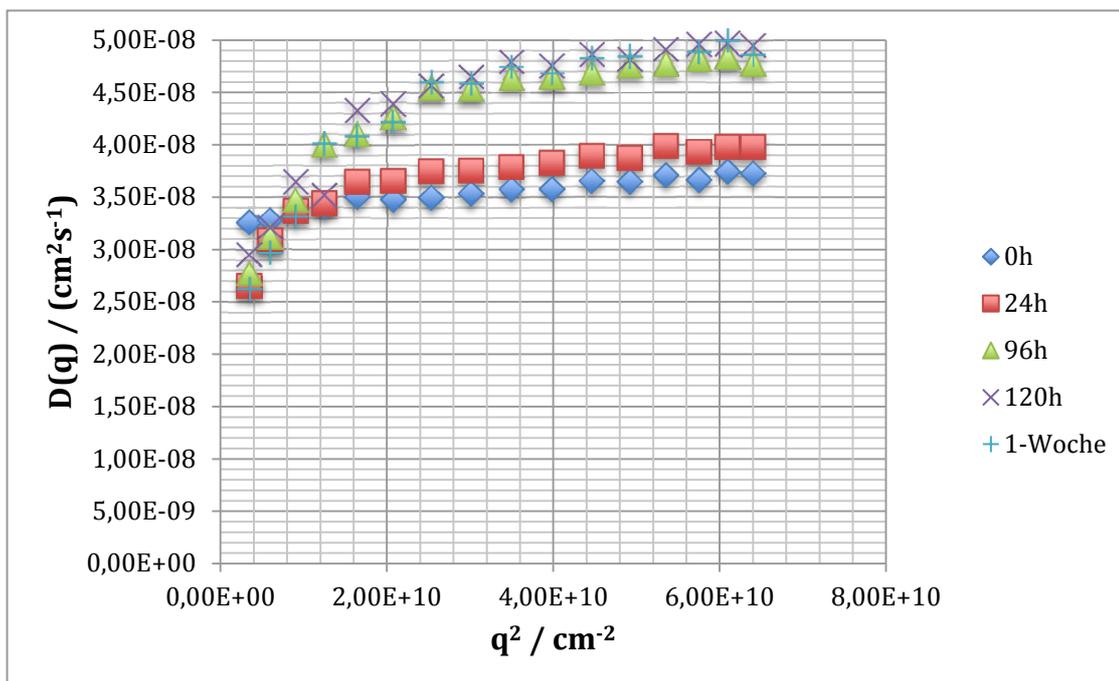


Abb. 4.23: Zeitliche Veränderung der winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe PLSA9 ohne Eisenoxidbeladung

Bei großen q -Werten bzw. Winkeln ist eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten zu sehen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Vesikel deutlich kleiner werden, weil Polymermoleküle aus den Vesikeln diffundieren. Bei kleinen Winkeln hingegen kann eine Verringerung des apparenten Diffusionskoeffizienten beobachtet werden, was auf Aggregation hindeutet.

Bringt man Eisenoxidnanopartikel in die Schale der Vesikel, erhöht dies die Hydrophobizität der Membran, denn Polymerketten können nicht ohne weiteres aus der Membran diffundieren, da sie an die hydrophoben Eisenoxidpartikel gebunden sind.

Die winkelabhängige Lichtstreuung zeigt bei 4%Fe-Beladung (Abb. 4.24) (w% bezogen auf den Polymeranteil) immer noch die Aggregation von Polymervesikeln, allerdings nicht mehr die Verkleinerung der Partikelradien bei höheren Winkeln.

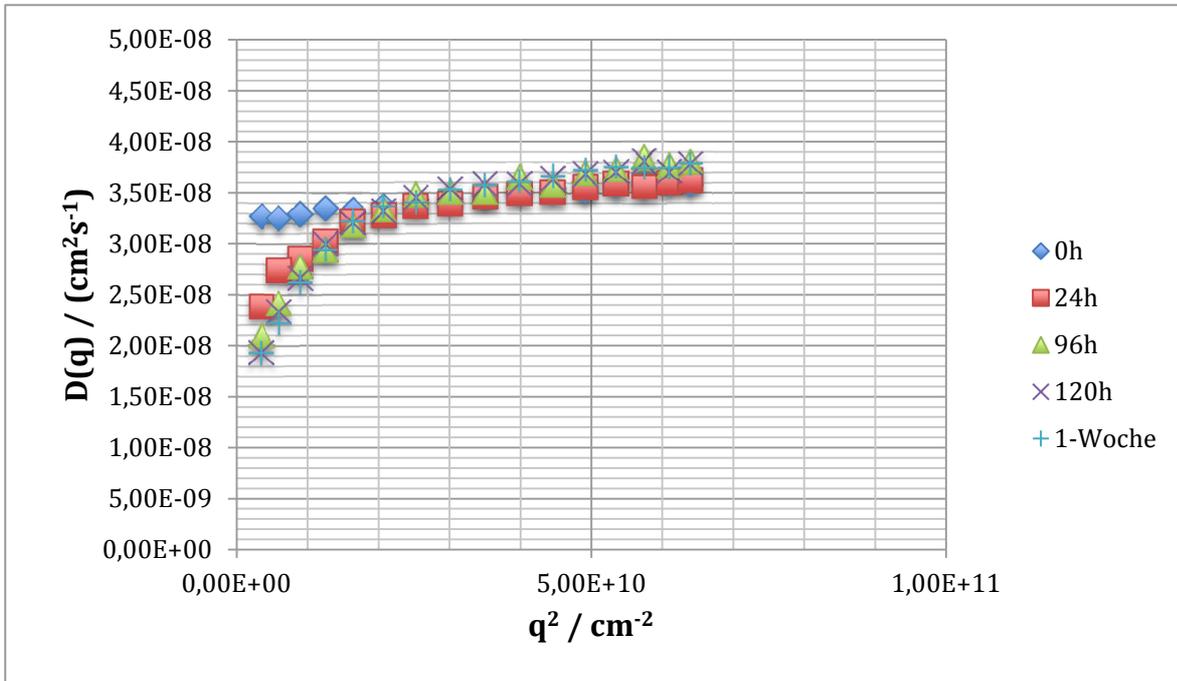


Abb. 4.24: Zeitliche Veränderung der winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe PLSA10 mit 4w% Fe-Np-Beladung

Belädt man die Vesikel mit 16% Eisenoxid, zeigt sich kaum eine Veränderung der Partikeldiffusionskoeffizienten (Abb. 4.25).

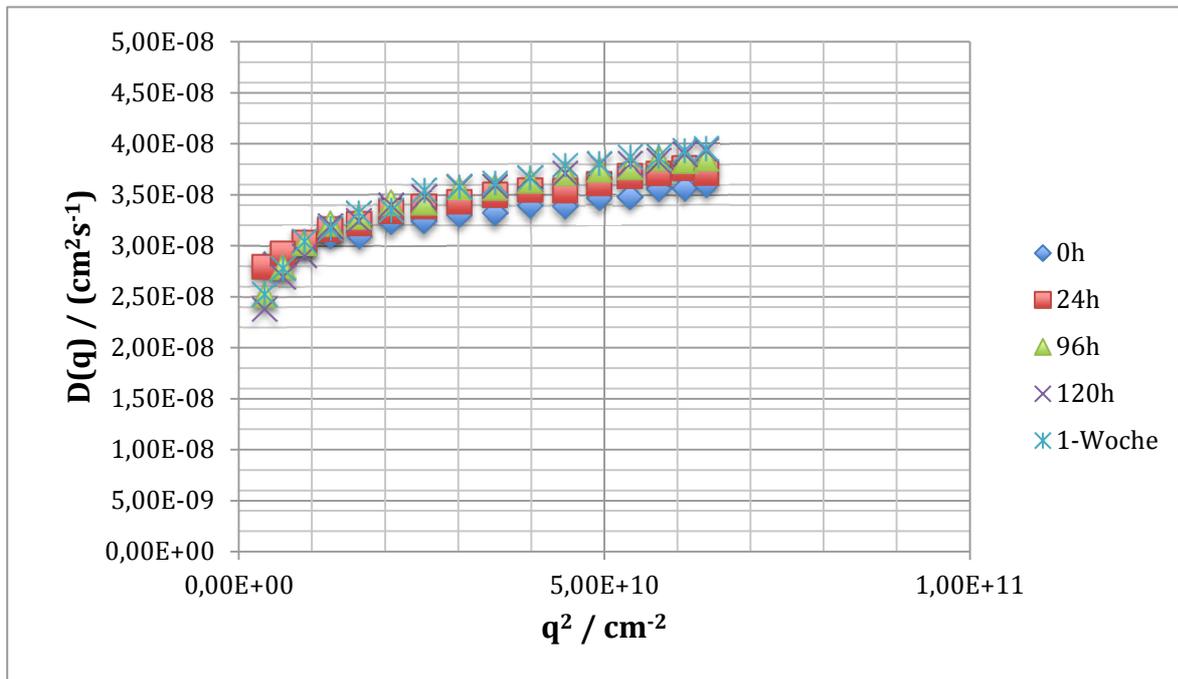


Abb. 4.25: Zeitliche Veränderung der winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe PLSA12 mit 16w% Fe-Np-Beladung

Die verbleibende Änderung ist damit zu erklären, dass immer noch Vesikel vorhanden sind, die kein oder sehr wenig Eisenoxid enthalten. Steigert man die Eisenkonzentration auf 50% im Verhältnis zum Polymer, entstehen immer noch sehr einheitliche Vesikel. Hier zeigt sich keine Veränderung der Lichtstreuungsdaten, weder winkelabhängig noch im μ_2 -Wert bei 90° (Abb. 4.26). Dies lässt sich damit begründen, dass Eisenoxid gleichmäßig in der Schale verteilt ist und keine Diffusion von Polymerketten aus der Membran erlaubt. Diese Vesikel sind über Monate stabil.

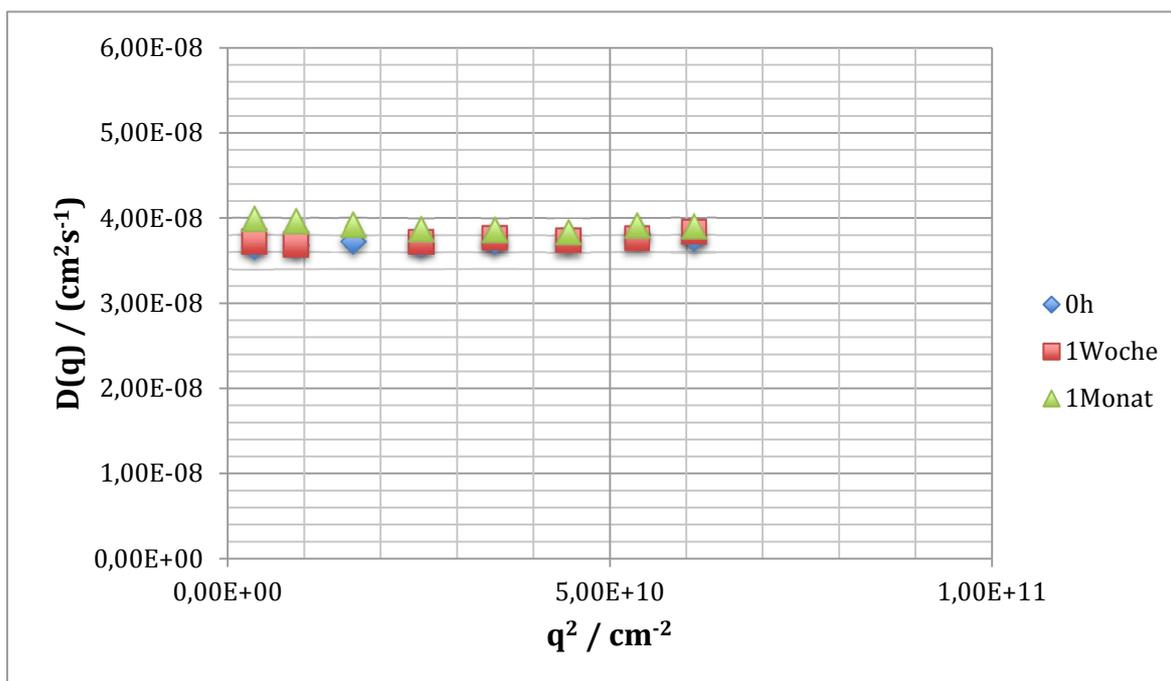


Abb. 4.26: Zeitliche Veränderung der winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe R232 mit 50w% Fe-Np-Beladung

Aufgrund des niedrigen Kontrastunterschieds des Polypropylenoxids zum Wasserfilm im Cryo-TEM konnten nur beladene Vesikel visualisiert werden. Man sieht in Abb. 4.27 ausschließlich die Eisenoxidnanopartikel. Da diese in Wasser nicht stabil sind, müssen sie durch das Polymer stabilisiert sein.

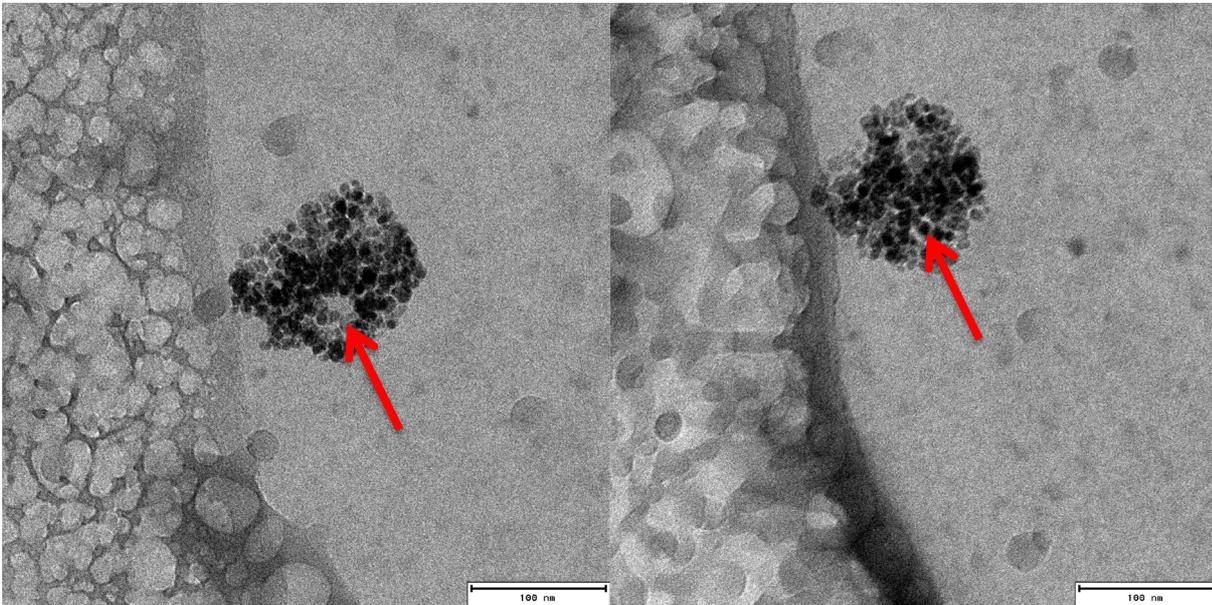


Abb. 4.27: Cryo-TEM Aufnahmen der Probe R232 mit 50w%Fe-NP Beladung (links)
Verkipfung um 35° offenbart dreidimensionale Hohlkörperstruktur (rechts)

Das linke TEM Bild zeigt ein Vesikel mit einer „Fehlstelle“ an der kein Eisenoxid vorhanden ist. An dieser Stelle fehlt sowohl in der im Vordergrund als auch in der im Hintergrund liegenden Schale das Eisenoxid. Dreht man nun das Grid im Elektronenstrahl um 35°, verschwindet das Loch scheinbar. Durch die drei dimensionale Form der Vesikel schiebt sich das Eisenoxid der im Vordergrund liegenden Schale über das Loch. Man kann daher nicht mehr durch das Vesikel hindurch schauen. Dadurch wird die vesikuläre Struktur dieser Partikel bestätigt.

4.4.3.2 Pluronic®-L121-COOH

Auch bei dem mit Bernsteinsäureanhydrid funktionalisierten L121 veränderte sich die Größe innerhalb von 24 Stunden von 59 nm auf 89 nm (R244, Tab. 33).

Tab. 33: Zeitliche Veränderung der DLS-Radien mit unterschiedlicher Beladung

Probe	Fe-NP (w%)	Herstellung		+24h		+4d		+7d	
		R _h	μ ₂						
R244	0	59	0,09	73	0,09	86	0,1	89	0,1
R245	4	72	0,13	78	0,13	84	0,14	85	0,12
R234	16	72	0,09			71	0,11	71	0,08

THF/P: 10g/L L121-COOH, Flussrate H₂O=10ml/min; Flussrate THF/P=1,5ml/min; c_{dis}=0,1g/L
 R_{h,90°}: Apparenter hydrodynamischer Radius bei 90° aus dynamischer Lichtstreuung

Interessanterweise wurde hier der Radius größer. Wie bereits in der Theorie erwähnt wurde, führt die Carboxyendgruppe zu einer Elongation der Polymerkette. Die hydrophile Kopfgruppe hat dadurch einen geringeren Platzbedarf und führt zu einer bevorzugten Lammellenbildung mit niedriger Krümmung. Bei kleineren Vesikeln ist diese Krümmung deutlich stärker als bei größeren Vesikeln und erklärt die Veränderung hin zu größeren Partikelradien (Abb. 4.28).

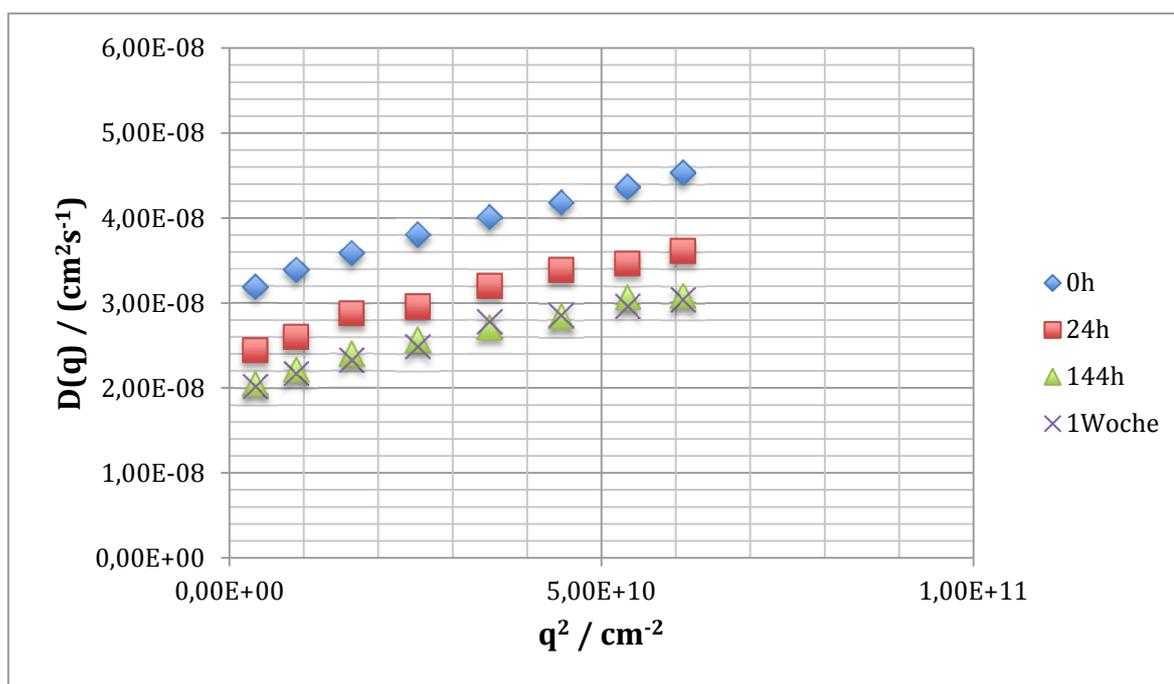


Abb. 4.28: Zeitliche Veränderung der winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe 244 ohne Fe-NP-Beladung

Trotz der veränderten Eigenschaften kann man in *Tab. 32* deutlich erkennen, dass bei Einlagerung von Eisenoxidpartikeln die Größenveränderung abnimmt. Bei einem Eisengehalt von 16% verändern sich auch diese Polymersomen nicht mehr mit der Zeit. Sie weisen im Vergleich zu den unmodifizierten Vesikeln einen etwas größeren Radius auf. Auch die winkelabhängige Auftragung der Diffusionskoeffizienten bestätigt die Stabilität der Vesikel bei Beladung mit 16%-Eisenoxid-Beladung (Abb. 4.29).

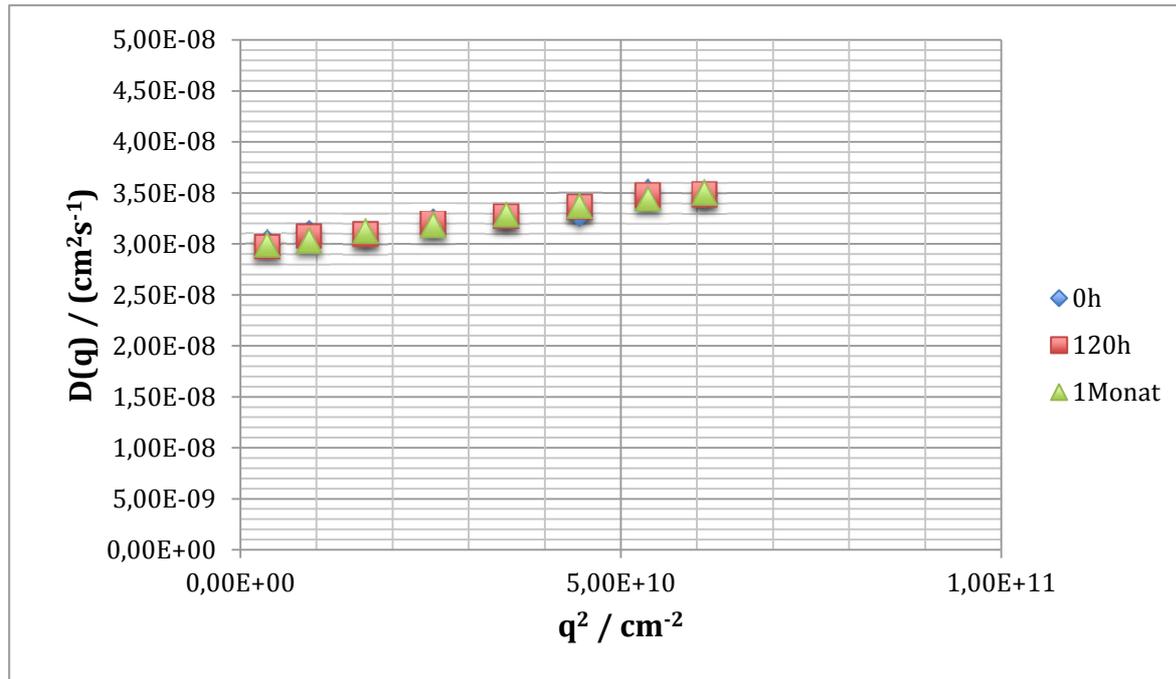


Abb. 4.29: Zeitliche Veränderung der winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe R234 mit 16% Fe-Beladung

Die Cryo-TEM Aufnahme der mit 16w% Eisenoxid beladenen Probe R234 bestätigen ebenfalls die vesikuläre Struktur (Abb. 4.30). Man erkennt ein sphärisches Partikel mit gleichmäßiger Eisenoxidnanopartikelverteilung. Bei diesem Vesikel fehlt an einer Stelle (roter Pfeil) das Eisenoxid im Fokusbereich und daher sieht man nur eine Doppelschicht mit Eisenoxid in der Vesikelschale im „Hintergrund“.

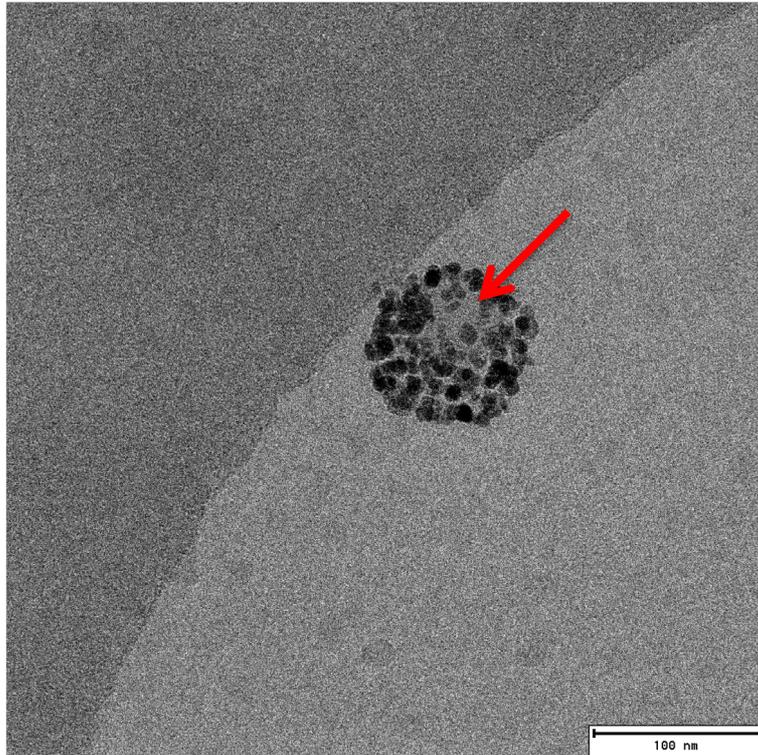


Abb. 4.30: Cryo-TEM-Aufnahme der Probe R234 mit
16w%-Fe-Beladung
Der rote Pfeil markiert den Hohlraum des Vesikels

Kugelförmige mizellare Strukturen ohne Hohlraum können auch hier ausgeschlossen werden, denn diese müssten in der Mitte des Partikels einen deutlichen Kontrastanstieg zeigen. Hier müsste der Elektronenstrahl einen erheblich längeren Weg durch das Partikel zurücklegen. Der innere Raum kann also nicht mit Eisenoxid-Nanopartikeln gefüllt sein.

4.4.3.3 Konzentrationsabhängige Stabilität der Pluronic®-Vesikel

Die kritische Mizellenkonzentration von Polymeren ist ein Parameter der die Strukturbildung beschreibt. Liegt diese sehr niedrig, bilden sich mizellare Strukturen sehr früh. (Kap. 2.1).

In Abb. 4.31 ist eine typische CMC Messung von PLSA9 zu sehen, die mit der Lichtstreuanlage durchgeführt wurde. Man kann die cmc am Schnittpunkt der beiden Geraden erkennen. Hier haben sich alle Partikel aufgelöst und es tritt keine weitere Größenveränderung in der Lösung auf. Die cmc liegt bei etwa 0,017 g/L und ergibt sich aus dem Schnittpunkt der zwei Geraden.

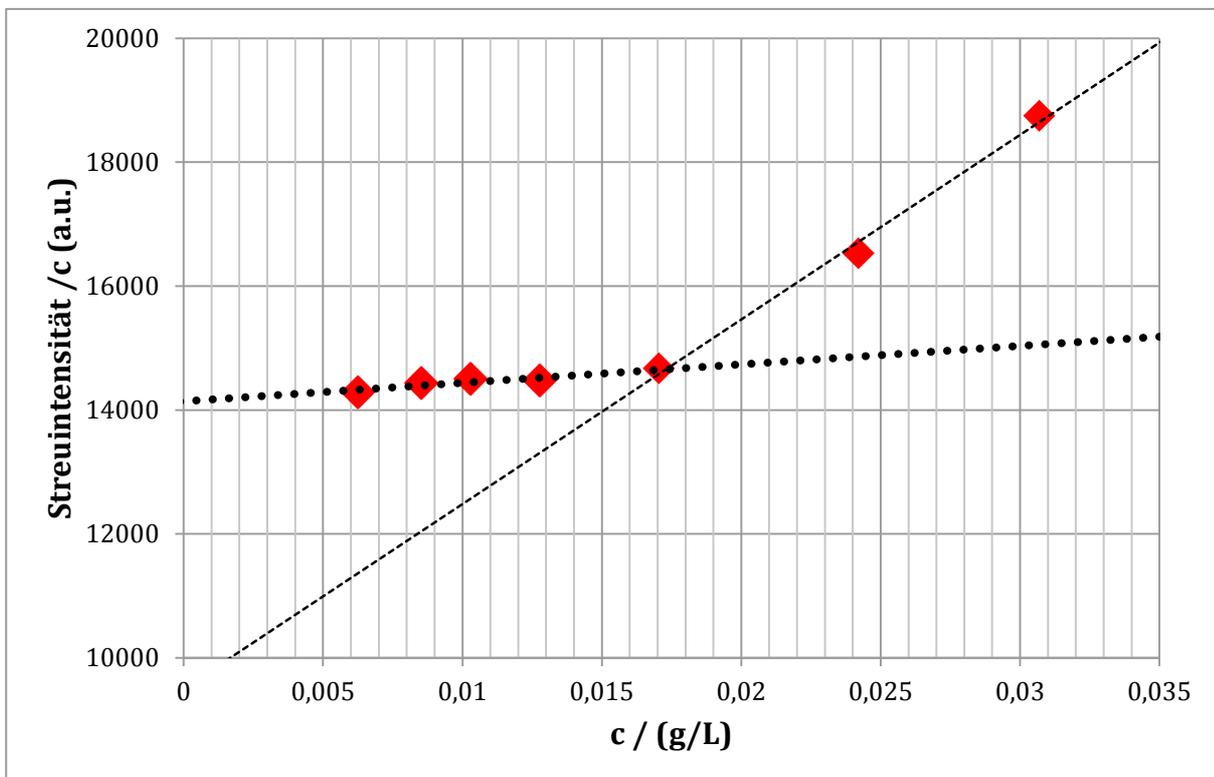


Abb. 4.31: cmc-Bestimmung der Probe PLSA9 durch Auftragung der konzentrationsunabhängigen Streuintensität gegen die Konzentration

Der Messwert von 0,017 g/L liegt etwas über dem Literaturwert von 0,0114 g/L. Dies kann durch die unterschiedlichen Messmethoden erklärt werden.

Bei 16% Eisenoxid verringert sich die cmc auf 0,0045 g/L und ist damit vier mal niedriger als bei den unbeladenen Vesikeln (Abb. 4.32).

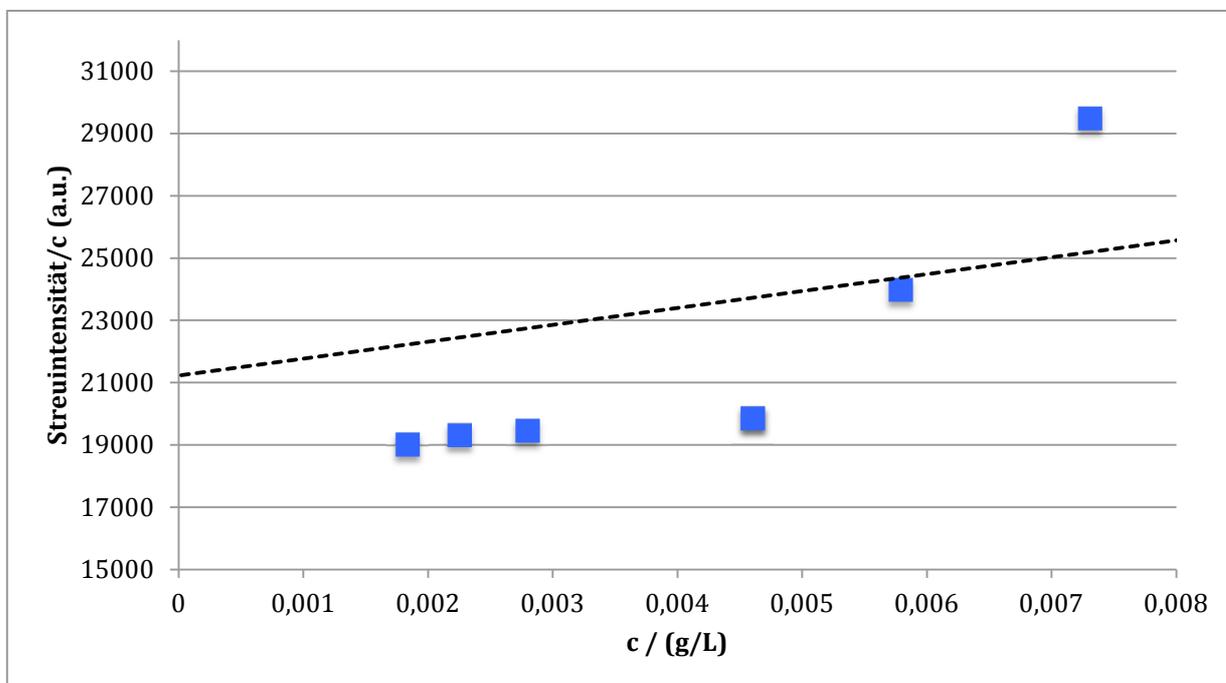


Abb. 4.32: cmc-Bestimmung der Probe PLSA12 durch Auftragung der konzentrations-unabhängigen Streuintensität gegen die Konzentration

Das Ergebnis erklärt auch, warum sich die mit Eisenoxidnanopartikeln beladenen Vesikel viel langsamer verändern als die unbeladenen Vesikel.

Bei den Vesikeln mit 50% Eisenoxidgehalt ist keine CMC mehr messbar. (Abb. 4.33). Deswegen verändern sich diese Vesikel überhaupt nicht mehr und sind über mehrere Monate stabil.

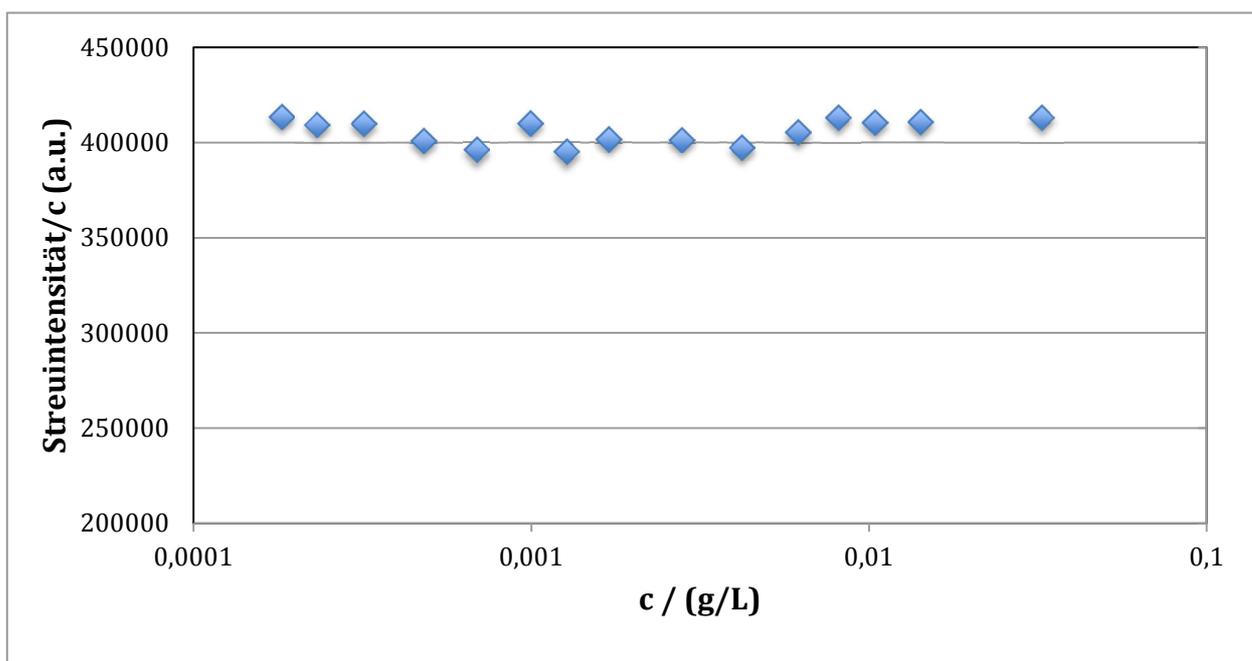


Abb. 4.33: cmc-Bestimmung der Probe R232 durch Auftragung der konzentrations-unabhängigen Streuintensität gegen die Konzentration

4.5 Pluronic® und PB-PEO Vesikel im Vergleich

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Vesikel aus PB-PEO Diblockcopolymeren als auch PEO-PPO-PEO Triblockcopolymeren kontinuierlich hergestellt werden können. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften wie Löslichkeit(cmc), Blockzusammensetzung etc. mussten die Bedingungen im Mikromischer an das jeweilige Polymer angepasst werden. Das hier verwendete Polybutadien-Polyethylenoxid hat ein deutlich höheres Molekulargewicht. Dadurch verlangsamt sich der Prozess der Selbstorganisation und die Mischzeiten müssen relativ lang gewählt werden. Dies führt dazu, dass man sehr niedrige Flussraten einstellen muss. Die Polymere bilden im ersten Schritt Mizellen, die durch Kollision anschließend wachsen müssen. Diese Mizellen besitzen einen viel größeren Radius, was die Diffusion deutlich verlangsamt und die Wahrscheinlichkeit auf eine Kollision sinken lässt. Es ist daher auch verständlich, warum die Polybutadien-polyethylenoxid Polymere bei symmetrischen Flussbedingungen gemischt werden müssen. Die sonst auftretenden Turbulenzen beschleunigen den Mischungsvorgang und führen ausschließlich zur Entstehung von Mizellen.

Im Falle des Triblockcopolymers L121 ist verläuft die Vesikelbildung leicht abweichend von dem des PB-PEO Polymers. Nachdem der Bereich der guten Löslichkeit des hydrophoben Blocks verlassen wurde und sich die Polymere selbst organisieren, kann sich theoretisch sofort eine Doppelschicht ausbilden. Diese kann direkt durch Anlagerung einer Polymerkette weiter wachsen ohne den Umweg über Mizellen zu nehmen. Dadurch wird die Vesikelbildungszeit im Vergleich zum Diblockcopolymer erheblich verkürzt. Hier wird eine sehr schnelle Mischzeit notwendig, da ansonsten die Vesikel sehr groß werden würden. Pluronic®-L121 ist dafür bekannt, riesige Doppelschichten aufzubauen und letztendlich auszufallen. Dies konnte auch beobachtet werden, wenn bei zu niedrigen Flussraten gearbeitet wurde (< 4 ml/min).

Auch im Vergleich mit ihrer Beladungsfähigkeit unterscheiden sich die Polymere erheblich. Während die Schale der Polybutadienvesikel destabilisiert wird, kann die L121-Membran deutlich verstärkt werden.

Im Falle der PB-PEO-Vesikel vergrößert die Einlagerung den hydrophoben Block und führt zu einer Destabilisierung der Membran. Dies lässt sich vor allem in den TEM-Aufnahmen von den Vesikeln mit hoher Konzentration an QuantumDots beobachten. Die Polymere bilden keine einfache Doppelschicht aus, sondern verschmelzen zum Teil mit anderen Vesikeln und bilden eine Art „Multivesikel“.

L121 weist eine relativ hohe kritische Mizellenkonzentration (cmc) auf. Dadurch sind reine Vesikel aus L121 fragil und weisen keine große Langzeitstabilität aus. Bereits nach einem Tag ist die Größenverteilung der Vesikel anders und verändert sich auch weiterhin. Belädt man diese Membran mit sehr hydrophoben Eisenoxid-Nanopartikeln, erhöht dies die Hydrophobizität der Membran. Die cmc sinkt und erhöht so ebenfalls die Stabilität der Vesikel. Die Temperaturabhängigkeit der cmc, die ebenfalls für die Stabilität der Vesikel verantwortlich ist, wird in einer parallelen Arbeit von R. Bleul untersucht.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Fragestellungen zur Selbstorganisation amphiphiler Polymere in Mikromischern untersucht. Zwei Polybutadien-b-Polyethylenoxid Copolymere PB₁₃₀-PEO₆₆ und PB₁₆₀EO₆₀ mit jeweils zwei unterschiedlichen Endgruppen und das Triblock Copolymer PEO₅-PPO₆₈-PEO₅ Pluronic®-L121 wurden im Mikromischer auf ihre Selbstorganisation untersucht. Alle untersuchten Polymere können im selektiven Lösungsmittel Wasser für PEO, Vesikel mit einer Doppelschicht und innerem wassergefüllten Kern ausbilden. Die kontinuierliche Beladung dieser Polymer-Hohlkugeln wurde ebenfalls behandelt.

In vorherigen Arbeiten wurden verschiedene Präparationsmethoden der PB-PEO-Polymersomen untersucht. Die Cosolvent-Methode erwies sich dabei als besonders vielversprechend und bildet die Grundlage der Synthese von Polymersomen in Mikromischern (vgl. Abbildung 5.1a).

Es wurden drei verschiedene Mikromischer auf ihre Fähigkeit, Polymersomen herstellen zu können, untersucht. Zwei dieser Mikromischer beruhen auf dem Prinzip der interdigitalen Multilamination und zwar der SIMM (Schlitz-Interdigital-MikroMischer) und der SFIMM (SuperFocus-Interdigital-Mikromischer) vom Institut für Mikrotechnik (IMM Mainz GmbH). Der dritte Mikromischer, es handelt sich hierbei um den gleichfalls vom IMM hergestellten CPMM (CaterPillar-Mikromischer), beruht auf dem SAR-Prinzip (Split-and-Recombine).

In den Mixern wurden Lösungen amphiphiler Blockcopolymere in THF mit dem für PEO selektiven Lösungsmittel Wasser kontinuierlich gemischt. Dabei konnte durch Änderungen der Bedingungen wie Konzentration, Flussratenverhältnisse, Flussraten, Lösungsmittelgemische oder Mischerarchitektur Einfluss auf die Selbstorganisation der Polymere genommen werden. Die dynamische und statische Lichtstreuung wurde als Ensemblemethode gewählt, um die erfolgreiche Synthese von selbstorganisierten Strukturen zu zeigen. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bzw. dessen kryogene Variante (Cryo-TEM) wurden als bildgebendes Verfahren ausgewählt.

Polybutadien-b-Polyethylenoxid Polymersomen konnten aus reinem Lösungsmittel THF in Mikromischern nicht hergestellt werden. Die im Verlauf des Mischens entstehenden

Lösungsmittelgemische, mit idealen Eigenschaften für eine freie Selbstorganisation (Abbildung 5.1a zwischen Start und Stop), sind dann nur über eine kurze Zeitspanne vorhanden.

Reine Lösungsmittelansätze erfordern asymmetrische Flussbedingungen im Mikromischer, damit der verbleibende THF-Gehalt gering genug ist, um ungewünschte Strukturveränderungen nach Austritt aus dem Mikromischer zu vermeiden. Durch diese Asymmetrie im Profil werden sehr kurze Mischzeiten erzielt. Dadurch lassen sich kinetisch eingefangene Strukturen erzeugen, die Einblick in den Mechanismus der Selbstorganisation geben. Die vom PB₁₃₀-PEO₆₆ bevorzugte Vesikelbildung wird nicht erhalten. Es entstehen nur sphärische Mizellen ohne hydrophilen Hohlraum. Diese Mizellen sind kinetisch eingefangene Zwischenstufen der Vesikelbildung.

Die Startbedingungen wurden in soweit geändert, dass Asymmetrien im Flussprofil vermieden werden. Dazu wurde die Menge an Wasser der THF-Lösung zugesetzt, die es ermöglichte, symmetrische Mischbedingungen zu nutzen und damit auch bessere Kontrolle ausüben zu können. Unterschiedliche Mischerarchitekturen haben Einfluss auf die Größe der gebildeten Polymersomen.

Dabei zeigen Mischerarchitekturen, die eine kurze Mischzeit ermöglichen kleine Polymersomen, wogegen Mischer mit längeren Mischzeiten größere Polymersomen ergeben (siehe Abbildung 5.1c links).

Auch die Flussgeschwindigkeiten der jeweiligen Ströme sind maßgeblich für die Größe der selbstorganisierten Strukturen. Schnelle Flussraten führen bei allen Mischerarchitekturen zu kürzeren Mischzeiten. Kleinere Zeiten lassen folglich auch nur kleinere Partikelgrößen zu. Je langsamer die Flussrate, desto größer werden die geformten Vesikel (Abbildung 5.1c rechts). Die Änderung der Flussraten liefert also einen sehr einfachen Weg, um kontrolliert und kontinuierlich Polymersomen mit einer bestimmten Größe zu erhalten. Durch die gleichbleibenden Bedingungen im Mikromischer haben die erzielten Polymersomen auch eine sehr niedrige Polydispersität.

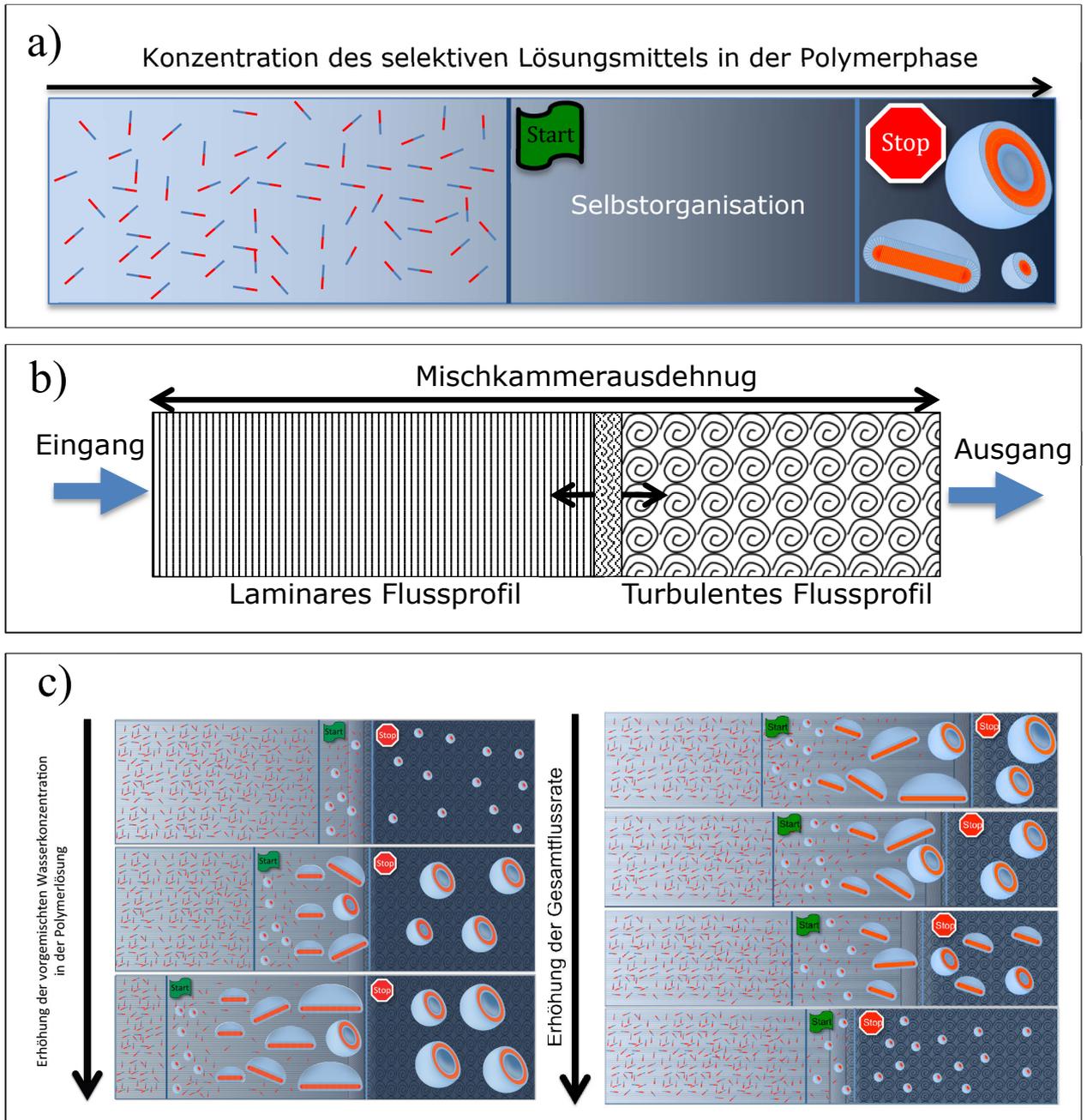


Abb. 5.1: Vereinfachte schematische Darstellungen der Selbstorganisation amphiphiler Block Copolymere in Mikromischern

- Auslösung / Abbruch der Selbstorganisation durch Veränderung der Lösungsmittleigenschaften
- Vereinfachtes Flussprofil in der Mikromischerkammer
- Größenabhängigkeit der selbstorganisierten Nanopartikel im Mikromischer bei Veränderung der Flussrate (rechts) bzw. der Lösungsmittelbedingungen (links)

Auch die Konzentration von PB-PEO in der THF-Phase hat einen Einfluss auf die Selbstorganisation. Niedrigere Konzentrationen vergrößern den Abstand zwischen den gelösten Polymerketten und verlängern die benötigte Zeit um vorgegebene Strukturen zu bilden. Bei symmetrischen Flussbedingungen und Justierungen auf die richtige Konzentration kann der Übergang von sphärischer Mizelle zu Vesikel beobachtet werden. Dabei entstanden anisotrope Polymerpartikel ohne Doppellagenmembran, welche sich durch Untersuchung mit Cryo-TEM als scheibenartige Mizellen herausstellten. Ein in der aktuellen Forschung

diskutierter Mechanismus der Vesikelbildung schlägt als Übergangszustand die Scheibe vor. Daher kann die Scheibe als Übergangszustand auch für die Block-Copolymere PB₁₃₀-PEO₆₆ und PB₁₆₀-PEO₆₀ favorisiert werden.

Die Beladung von Polymersomen mittels Mikromischer wurde ebenso untersucht. Dabei stand vor allem die hydrophobe Beladung im Mittelpunkt, die der Präparation mittels Filmrehydratation vorbehalten war. Durch Zugabe von hydrophoben Partikeln wie stark fluoreszierenden Quantum Dots oder superparamagnetischen Eisenoxidpartikel sollten multifunktionelle Polymersomen kontinuierlich dargestellt werden. Durch die hohe Mischgeschwindigkeit ist es möglich, diese Partikel mittels Cosolvent-Methode in die Membran einzulagern. Durch kurze Mischzeiten konnte die Ausfällung stark hydrophober Partikel im Mikromischer vermieden werden. Stattdessen werden sie in die Polybutadien-Membran eingebaut und stabilisiert.

Aufgrund besserer Bioverträglichkeit und Zugänglichkeit wurde auch die Selbstorganisation von Pluronic®-L121 in Mikromischern untersucht. Polymersomen aus L121 wurden bisher nur per Filmrehydratation oder Elektroformation hergestellt. Im Cosolvent-Verfahren war eine Herstellung bisher nicht möglich, da L121 zu großer Lamellenbildung neigt und schnell ausfällt. Trotzdem konnten Mischbedingungen gefunden werden, bei denen sich Polymersomen mit niedriger Polydispersität kontinuierlich produzieren ließen. Durch Veränderung der Endgruppe mittels Bernsteinsäureanhydrid werden die Modifizierungsmöglichkeiten erleichtert. Mit dem so entstandenen Polymer können ebenfalls Polymersomen kontinuierlich im Mikromischer hergestellt werden. Die L121 Vesikel sind allerdings zeitlich instabil und verlieren die im Mikromischer erreichte niedrige Polydispersität innerhalb weniger Tage.

Auch die Beladungsmöglichkeiten für von L121 mit Eisenoxid-Nanopartikeln und Quantum Dots wurden untersucht. Es gelang hier ebenfalls eine kontinuierliche Beladung dieser Hohlkugeln sowohl mit QDs als auch USPIOs.

Interessanterweise führte diese hydrophobe Beladung von Pluronic®-Polymersomen mit Quantum Dots oder Eisenoxidnanopartikeln zu einer Stabilisierung der flexiblen Membran. Je höher die Konzentration eingelagerter hydrophober Partikel ist, desto niedriger ist die zeitliche Veränderung der Partikelradien.

Auch die cmc des Polymers L121 verringert sich merklich. Dabei wird die cmc umso niedriger, desto höher die hydrophobe Beladung ist. Trotz der starken Hydrophobizität setzt auch nach Wochen weder Fällung noch Veränderung der Partikelgröße ein.

Abbildung 5.2 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Mikromischeranlage. Dabei kann zwischen den untersuchten drei Mikromischern gewählt werden. Hydrophile und hydrophobe Beladungen können den Startlösungen zugesetzt werden. Es entstehen schließlich kontinuierlich multifunktionelle Polymersomen.

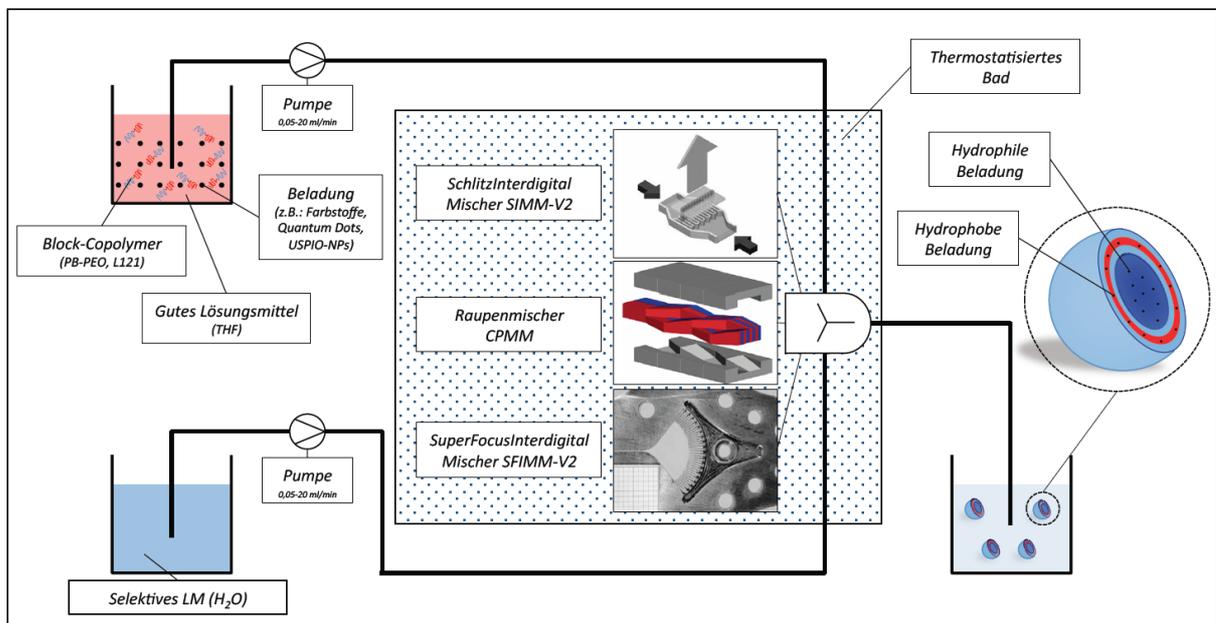


Abb. 5.2: Schematische Herstellung und Beladung von Polymersomen mittels Mikromischeranlage mit drei verschiedenen Mischerarchitekturen:
 Schlitzinterdigitalmischer (SIMM)
 Superfocusinterdigitalmischer (SFIMM)
 Caterpillar/Raupenmischer (CPMM)

Ausblick

Die vorgestellte Herstellung und Beladung amphiphiler Polymerpartikel im Mikromischer liefert einen einfachen und kontinuierlichen Zugang zu unterschiedlich großen selbstorganisierten Strukturen.

Anhand des Modellsystems PB-PEO, welches sich leicht mittels TEM und DLS analysieren lässt, konnte der erfolgreiche Syntheseweg auf ein anderes Polymersystem übertragen werden. Wie auch beim PB₁₃₀-PEO₆₆ kann der Mechanismus der Selbstorganisation von weiteren Polymersystemen untersucht werden.

Für ein spezifisches Polymer können im Mikromischer unterschiedlich große Strukturen erhalten werden. Anhand von Zelltests ließe sich die am besten verträgliche Struktur ermitteln. Dies ermöglicht bei späterer Anwendung im biomedizinischen Bereich unerwünschte Wirkungen reduzieren zu können.

Die großen Variationsmöglichkeiten, die sich allein durch die Änderung der Monomere bei Polymeren ergeben, können vielfältige Polymersomen mit spezifischen Eigenschaften liefern. Diese reichen von hoher bis niedriger Membranpermeabilität über stimuli-responsive bis hin zu magnetischen und fluoreszierenden Fähigkeiten. Die einfache und kontinuierliche Synthese unterschiedlicher Partikel amphiphiler Systeme bietet eine wichtige Grundlage für weitreichende Anwendungen als Nanoreaktoren, Kontrastmittel oder multifunktionelle Wirkstoffträger sowohl in der Forschung als auch in der Industrie.

Die Bioverträglichkeit und einfache Verfügbarkeit von PEO-PPO-PEO machen dieses System zu einem vielversprechenden Vertreter für biomedizinische Anwendungen. Mit weiterer Funktionalisierung durch Farbstoffe/Targeting-Liganden und sowohl hydrophiler als auch hydrophober Beladung von Wirkstoffen, stellen sich die Pluronic®-L121-Polymersomen als hoch interessantes System dar mit breiter Anwendungsperspektive im medizinisch-biologischen Umfeld. Bei gleichzeitiger Beladung mit Wirkstoffen und magnetischen Partikeln könnte sich durch Anlegen magnetische Felder die Freisetzung gezielt steuern lassen und ebnet den Weg zur Anwendung in der Theranostik.

6 Experimenteller Teil

6.1 Vesikelpräparation

Alle Lösungen wurden mit destilliertem, entionisiertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Satorius präpariert. Tetrahydrofuran wurde von Merck, Acros oder Fluka in p.a. Qualität bezogen und durch Destillation vom enthaltenen Stabilisator befreit. Die verwendeten Filter stammen von Millipore.

Das verwendete PB₁₃₀-PEO₆₆-H bzw. PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH (1A/1B, vgl. Theorie) wurden von M. Maskos durch anionische Polymerisation synthetisiert, charakterisiert und zur Verfügung gestellt. Das zweite PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH wurde ebenfalls durch anionische Polymerisation hergestellt, allerdings ein anderer Initiator verwendet. Pluronic® L121 (Sigma Aldrich) wurde ohne weitere Aufarbeitung verwendet. L121-COOH wurde durch Kopplung von L121 und Bernsteinsäureanhydrid hergestellt und mittels Dialyse von überschüssigem Bernsteinsäureanhydrid in THF befreit. Das THF wurde durch Destillation entfernt und das Polymer im Hochvakuum getrocknet.

6.1.1 Batch

Eine Stammlösung mit 10mg/ml des jeweiligen Polymers in THF wurde hergestellt und filtriert (LG-F, 0,2 µm). In einem Rundkolben mit Rührfisch wurden 1,6 ml THF vorgelegt und 0,5 ml dieser 1B-Stammlösung zugesetzt (entspricht 5 mg Polymer in 2,1 ml THF). Unter Rühren wurde 5 mL Wasser kontrolliert mittels einer Spritzenpumpe (Bioblock Scientific) mit einer Geschwindigkeit von 9,9 ml/h zudosiert. Nach beendeter Wasserzugabe standen die Proben offen bis das THF vollständig abgedampft war (Geruchs- und Gewichtskontrolle). Durch Wiegen wurde die Polymer-Endkonzentration bestimmt.

6.1.2 Vesikelvernetzung

Zur Vernetzung wurden die Polymerlösungen in Glasgefäßen gut verschlossen zum Versand verpackt. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentrationen der Lösungen nicht über 1,5 g/L lag, da ansonsten eine Fällung beobachtet werden konnte.

Bei der Firma Isotron Deutschland GmbH (Firmensitz: Kesselbodenstr. 7, D-85391 Allershausen) wurden die Proben mit einer Durchschnitts-Dosis von 60 kGy mittels Co^{60} Quelle bestrahlt und anschließend zurückgeschickt.

6.1.3 Mikromischer

6.1.3.1 Ansetzen der reinen Polymerlösungen

Das jeweilige Polymer wurde vor Verwendung im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde es abgewogen und dann mit destilliertem THF gelöst. Vor der Verwendung im Mikromischer wurde es mit einem Milex LCR 5 μm Filter von Staub oder anderen Partikeln befreit.

6.1.3.2 Polymergemische

Zunächst wurde das Polymer in reinem THF wie oben präpariert und anschließend mit Wasser auf das gewünschte Verhältnis langsam verdünnt. Dabei wurde beachtet, dass die Lösung weder eine hohe Viskosität noch eine starke Trübung aufwies.

6.1.3.3 Polymerlösungen mit hydrophober Beladung

Die QuantumDots QD2 wurden von Michaela Wagner, Arbeitskreis Prof. Basché wie in [87] beschrieben synthetisiert. Die QD2 tragen Ölsäure und Oleylamin als hydrophobe Oberflächenliganden, waren aus einem Kern mit vier Schalen CdS und einer Außenschale ZnS aufgebaut und in Chloroform gelöst. Durch Trocknung und anschließender Resolubilisierung wurden sie in THF überführt.

Die Quantum Dots von Can (Hamburg) wurden direkt in Hexan geliefert und wie QD2 in THF überführt.

Eisenoxidnanopartikel wurden als Ferrofluid (Eisenoxidnanopartikel in Mineralöl 80w%) bei supermagnete.de bestellt. Durch Zugabe von THF und anschließender Dialyse wurde das Mineralöl entfernt. Die THF Lösung war stabil und keine Fällung bzw. Trübung ist aufgetreten. Durch Trocknung wurde der Feststoffgehalt gravimetrisch bestimmt.

Den Polymerlösungen aus reinem THF wurden bei Beladung mit Quantum Dots oder Eisenoxidnanopartikeln in THF diese direkt in die Lösung getropft.

Bei den Polymeren in Lösungsmittelgemischen wurde zunächst das Beladungsagens in der gewünschten Menge zugesetzt und anschließend das Wasser zudosiert.

6.1.3.4 Partikelsynthese im Mikromischer

Die Förderung der jeweiligen Lösungen erfolgte mit zwei HPLC-Pumpen von Knauer. Die Pumpenköpfe waren aus Keramik, um diese auch mit aggressiveren Lösungen bzw. Reinigern betreiben zu können.

Zur Wahl standen drei verschiedene Mikromischer des Instituts für Mikrotechnik Mainz (IMM). Der SIMM (Schlitz Interdigital Mikromischer) mit interdigitalem Mischprofil, der SFIMM (SuperFocusInterdigitalMikromischer) mit vergleichsweise hoher Kompressionsrate und zuletzt der CPMM (CaterPillar Mikromischer) der ein „Split and Recombine“-Mischprofil erzeugt.

Alle Mischversuche wurden in einem Thermostat-Bad von Huber (Huber MPC-K12) bei kontrollierter Temperatur durchgeführt.

Vor jeder Synthese im Mikromischer wurden die Pumpen auf Ungenauigkeiten der Flussrate, die Mischer auf Verstopfung und die Schläuche auf Verunreinigungen geprüft.

Nachdem man beide Pumpen mit der jeweiligen Flussrate gestartet hatte, wurden 3,5 ml an eluierter Probe verworfen und anschließend in Schraub-deckelgläsern aufgefangen.

Polybutadienvesikel wurden zum Abdampfen bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis in der Probe kein THF mehr vorhanden war (Geruchs- und Gewichtskontrolle).

Durch die zeitliche und thermische Instabilität der Pluronicvesikel wurde das THF bei den L121-Proben im Rotationsverdampfer bei 30°C innerhalb einer halben Stunde abgedampft und direkt in der Lichtstreuung vermessen.

Bei allen Proben wurde darauf geachtet, dass keine Fällung beobachtet werden konnte.

Die Proben R232 (Pluronic®-L121 mit 50w% Eisenoxid) und R234 (L121-COOH mit 16w% Eisenoxid) wurden von R.Bleul analog zu den beladenen L121-Proben PLA/PLB im CPMM Mikromischer hergestellt und zur Verfügung gestellt.

6.2 Charakterisierung

6.2.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopieaufnahmen wurden an zwei verschiedenen Mikroskopen durchgeführt.

Vernetzte Proben wurden vorwiegend mit einem EM420 von Philips mit 120 kV Beschleunigungsspannung gemessen und mit einer CCD-Kamera festgehalten.

Alle Cryo-TEM Aufnahmen und einzelne getrocknete bzw. vernetzte Proben wurden an einem Tecnai F12 von Fei mit 120 kV Beschleunigungsspannung gemessen. Die EDX-Aufnahmen erfolgten an einem Tecnai 300 von Fei mit 300kV Beschleunigungsspannung.

Für die Vitrifizierung der cryogenen TEM-Proben wurde ein Vitrobot (FEI) zu Hilfe genommen. Auf die Grids (Quantifoil 'Holey Carbon Films' R2/1), die zuvor im Plasma-Ofen für 45 s im Argon-Sauerstoff-Strom gereinigt wurden, wurde 5 μL der Probe aufgetragen.

Die atmosphärischen Bedingungen lagen in der Präparationskammer bei 20°C und 90-100% Luftfeuchtigkeit.

Das Schockgefrieren der Probe erfolgte in kondensiertem Propan unter Kühlen mit flüssigem Stickstoff.

6.2.2 Lichtstreuung

Die Lichtstreu-Messungen wurden an einer Anlage der Firma ALV GmbH durchgeführt. Die Anlage besteht aus einem Helium-Neon Laser (JDS

Uniphase, $\lambda=632,8$ nm, $P=22$ mW), einem Goniometer (ALV, CGS-3) mit acht Single-Photon-Detektoren (SO-SIPD), einem Thermostat (Haake, C25P) und zwei Multiple-Tau Realtime Digital Korrelator (Multiple Tau Correlator ALV-7004) für jeweils 4 Korrelationsfunktionen.

Die dynamischen Messungen wurden in einem Winkelbereich von 26° bis 152° in 8°-Schritten durchgeführt. Das zur Auswertung verwendete, arbeitskreisinterne Fitprogramm basiert auf dem Simplex-Algorithmus (Simplexe Version 3.2, bzw. HDRC Version 5.1). Zur Bestimmung des Kumulanten μ_2 wurde jeweils für die Daten der 90°-Messung ein Kumulantenfit $[a+b*\exp(-x/c+d*x^2)]$ verwendet. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D_{app} wurde ein biexponentieller Fit $[a+b*\exp(-x/c)+d*\exp(-x/e)]$ verwendet, und die winkelabhängigen Ergebnisse anschließend für $q \rightarrow 0$ extrapoliert.

Im Folgenden wird eine beispielhafte Auswertung der dynamischen Lichtstreuung anhand der Probe XB-292-1 durchgeführt. Diese Methode wurde für alle DLS-Ergebnisse durchgeführt. Zunächst wurden vier Korrelationsfunktionen bei insgesamt 16 Winkeln gemessen. Die vier Korrelationsfunktionen eines Winkels wurden anschließend gemittelt (Abb. 6.1)

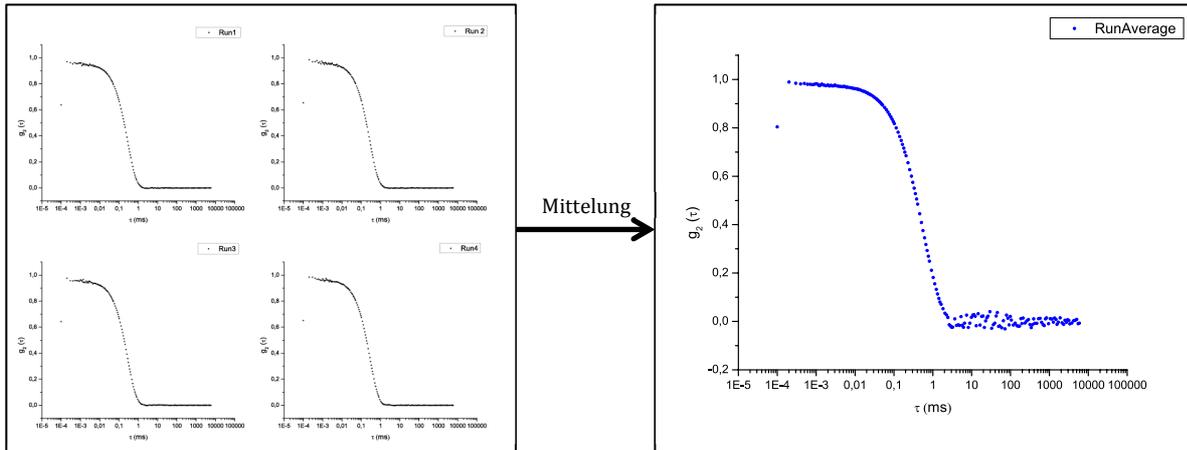


Abb. 6.1: Mittlung vier Korrelationsfunktionen eines Winkels

Im Anschluss wurde diese Korrelationsfunktion der Probe bei einem Winkel Bi-exponentiell gefittet. Aus diesem ergab sich der apparente Diffusionskoeffizient bei diesem Winkel (Abb. 6.2).

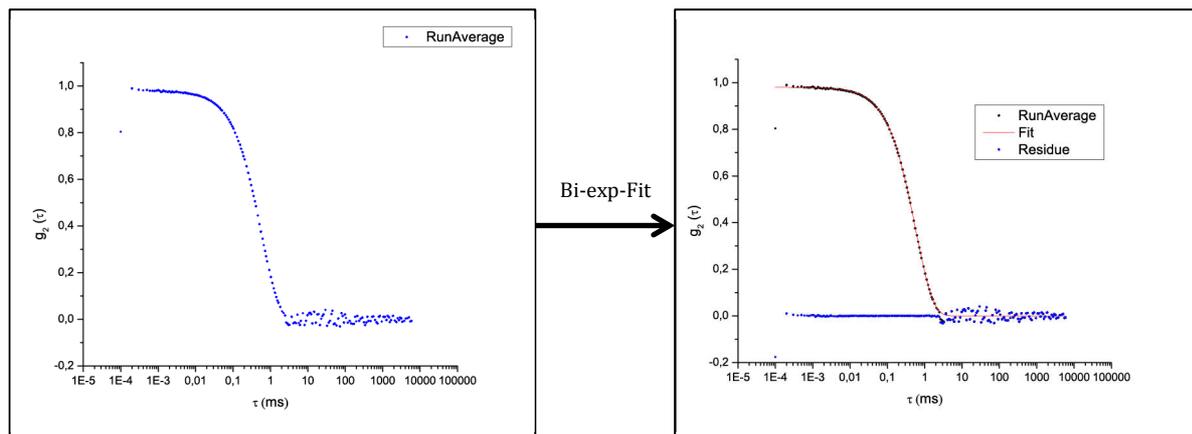


Abb. 6.2: Bi-exponentieller Fit zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten aus der gemittelten Korrelationsfunktion und zugehöriges Residuum

Durch Auftragung der einzelnen ermittelten Diffusionskoeffizienten konnte eine Regressionsgerade auf $q=0$ erstellt werden. Mit $q=0$ erhält man den z-gemittelten Diffusionskoeffizienten und über die Stokes-Einstein-Gleichung aus diesem den hydrodynamischen Radius (siehe Kap. 3).

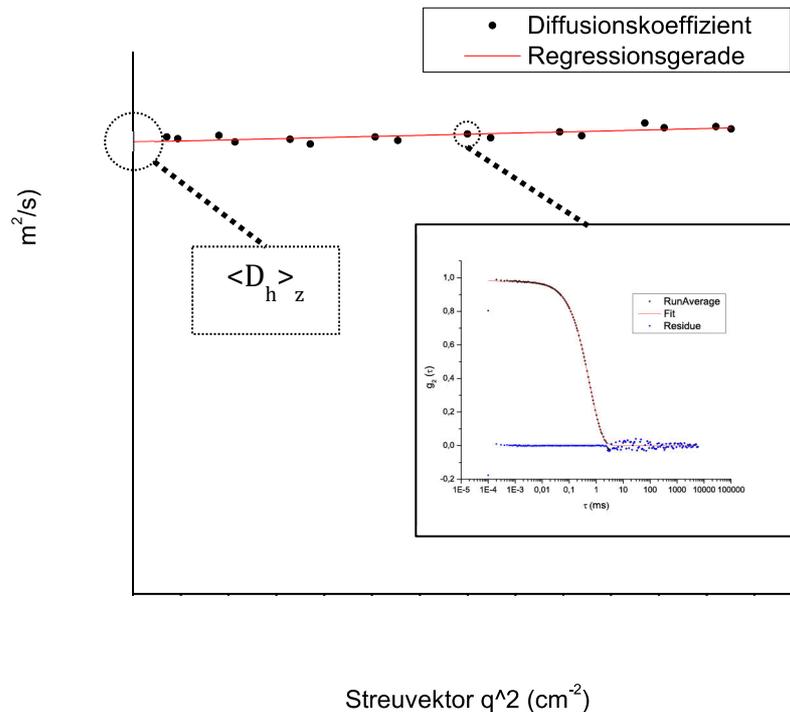


Abb. 6.3: Ermittlung des z-gemittelten Diffusionskoeffizienten durch lineare Regression auf $q=0$

Die statischen Messungen wurden in einem Winkelbereich von 25° bis 152° in 1° - bzw. 5° -Schritten durchgeführt und mit der Software ALV Statik Version 4.25 ausgewertet. Die verdünnten Vesikellösungen wurden durch geeignete Filter (LCR/LH mit $0,45 \mu m$ bzw. LS mit $5 \mu m$ Poren) in staubfreie Küvetten filtriert.

6.2.3 CMC-Messungen

Die Messung der kritischen Mizellenkonzentration (cmc) erfolgte mit der Lichtstreuungsanlage. Die Bestimmung der cmc wurde durch Auftragung der Countrate bei 90° gegen die Konzentration bestimmt. Um den durch die Verdünnung bedingten Abfall der Countrate zu bereinigen, wurde die Countrate noch mal durch die Konzentration geteilt. Die cmc wurde dann an dem Punkt bestimmt, an dem die konzentrationsbereinigte Countrate nicht weiter abfällt, da sich hier die Polymersomen vollständig aufgelöst haben.

7 Anhang

Ergänzende Daten

Weitere Ergebnisse des SFIMM mit PB₁₃₀-PEO₆₆

Auch höhere Konzentrationen führen nicht zur ausschließlichen Entstehung von Vesikeln im SFIMM. Auch eine Kontrolle über die Selbstorganisation ist nicht gegeben und spiegelt sich in den hohen μ_2 -Werten wider.

Tab. A. 1: Analyse der Partikelsynthese im Superfocus-Mikromischer

Probe	Fluss H ₂ O ml/min	Fluss THF ml/min	DLS-Radius nm	μ_2 (90°)	TEM Morphologie
SF17	19,2	0,24	20,8	0,1	s,v
SF18	19,2	0,16	23	0,09	s,v
SF19	16	0,2	23	0,09	s,v
SF20	16	0,14	33,5	0,1	s,v
SF21	12,8	0,16	32,5	0,12	s,v
SF22	12,8	0,1	35,6	0,1	s,v
SF23	8	0,1	43,6	0,15	s,v
SF24	8	0,06	37,9	0,1	s,v

Ausgangslösung: 80 g/L Polymer in THF

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

Tab. A. 2: Analyse der Partikelsynthese im Superfocus-Mikromischer

Probe	Fluss H ₂ O ml/min	Fluss THF ml/min	DLS-Radius nm	μ_2 (90°)	TEM Morphologie
SF25	20	0,2	27,4	0,18	s,v
SF26	20	0,1	39,3	0,19	s,v
SF27	16	0,16	41,4	0,17	s,v
SF28	16	0,08	46,1	0,19	s,v
SF29	12,8	0,12	44,5	0,20	s,v
SF30	12,8	0,06	44,1	0,18	s,v
SF31	8	0,08	44,6	0,17	s,v
SF32	8	0,04	49,2	0,19	s,v

Ausgangslösung: 100 g/L Polymer in THF

$\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung

Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

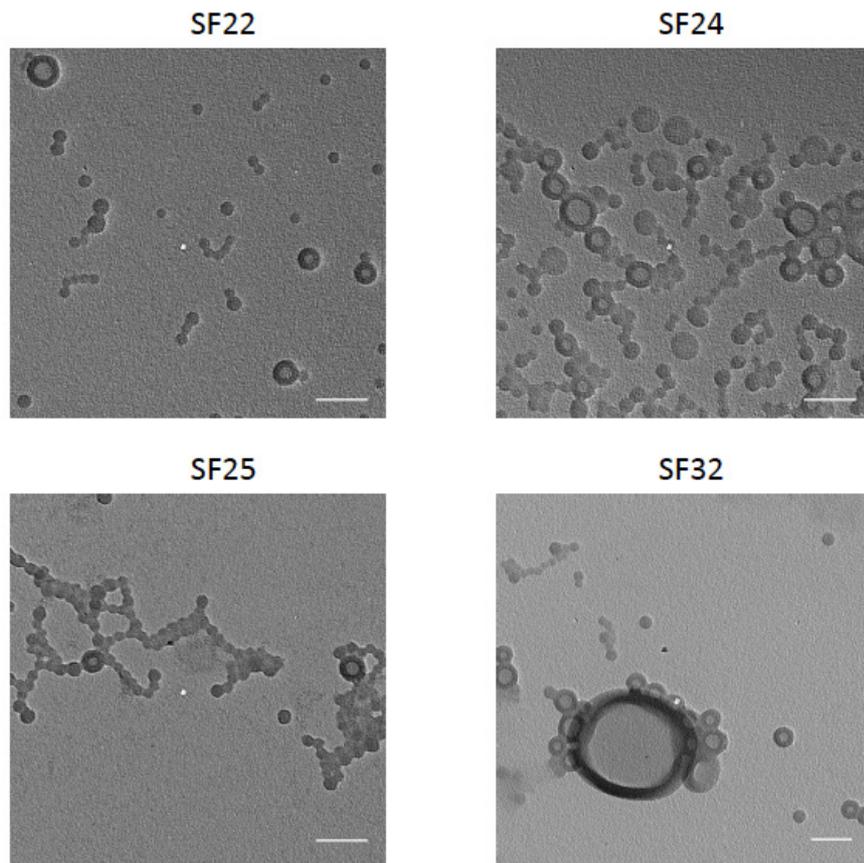


Abb. 7.1: TEM-Aufnahmen vernetzter Proben aus den Mischversuchen im SFIMM mit 80 und 100 g/L Polymerkonzentration
Scalebar = 100nm

Verhältnis der 1,2/1,4-Verknüpfung in Polybutadien

Abbildung 7.2 zeigt das H-NMR-Spektrum des Polybutadien-Precursors. Aus den Verhältnissen der Peakbanden lässt sich analog zu Förster [1999] ein Verknüpfungsgrad von 88% 1,2- und 12%-1,4-Polybutadien feststellen.

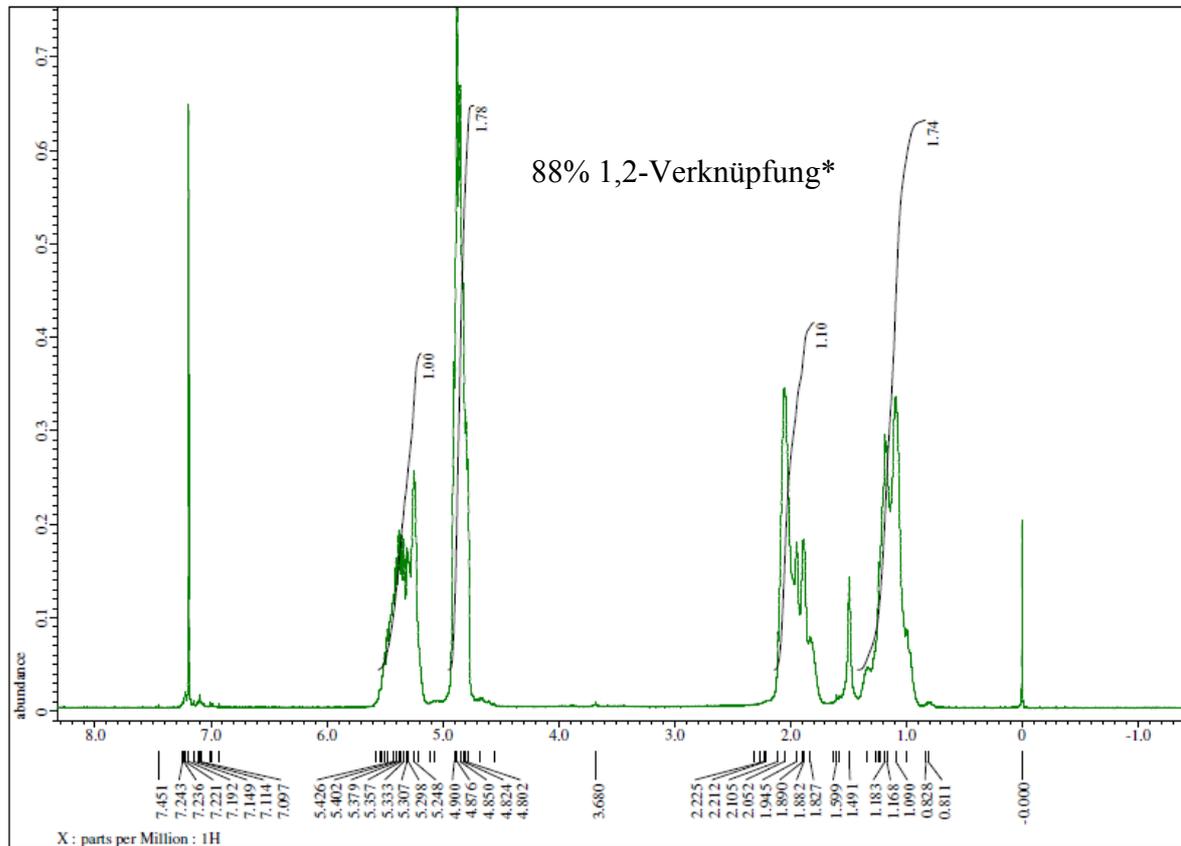


Abb. 7.2: NMR-Spektrum des Polybutadien-Precursors, anhand der Peakverhältnisse ergibt sich ein Verhältnis von 88% 1,2- und 12% 1,4-Verknüpfung

Pluronic-L121 Modifikation

Abb. 7.3 zeigt die Modifikation des Pluronic-L121 Polymers mit einer Carboxygruppe. Die OH-Endgruppe von L121 wird durch Bernsteinsäureanhydrid verestert. Überflüssiges Bernsteinsäureanhydrid wurde mittels Dialyse entfernt. Das IR-Spektrum (Abb. 7.4) zeigt die erfolgreiche Modifikation mit Bernsteinsäureanhydrid durch die Carbonylbande bei 1700 cm^{-1} .

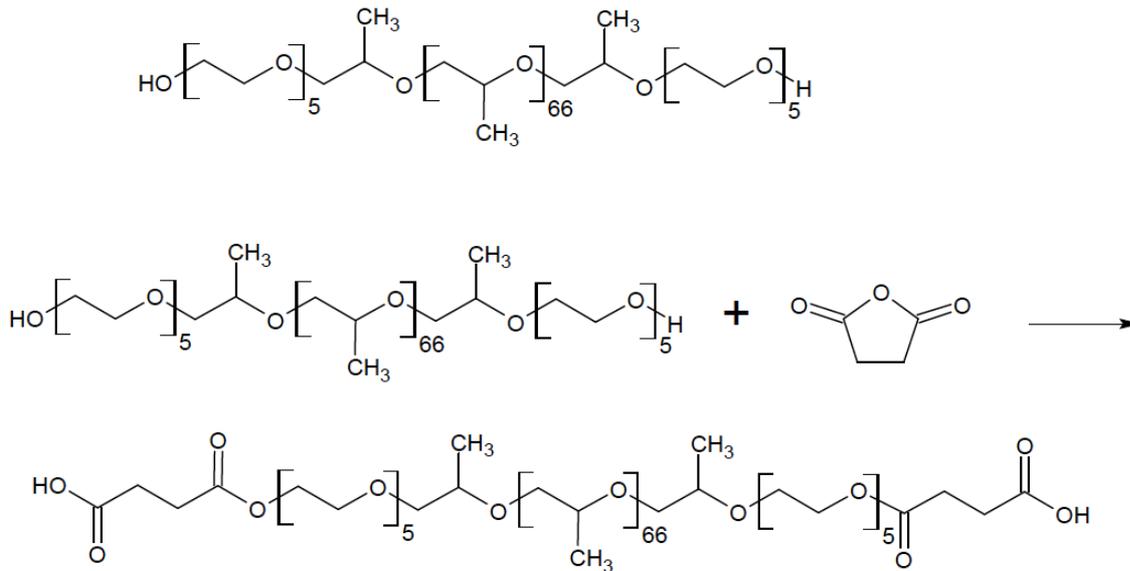


Abb. 7.3: Veresterung des Pluronic L121 mit Bernsteinsäureanhydrid

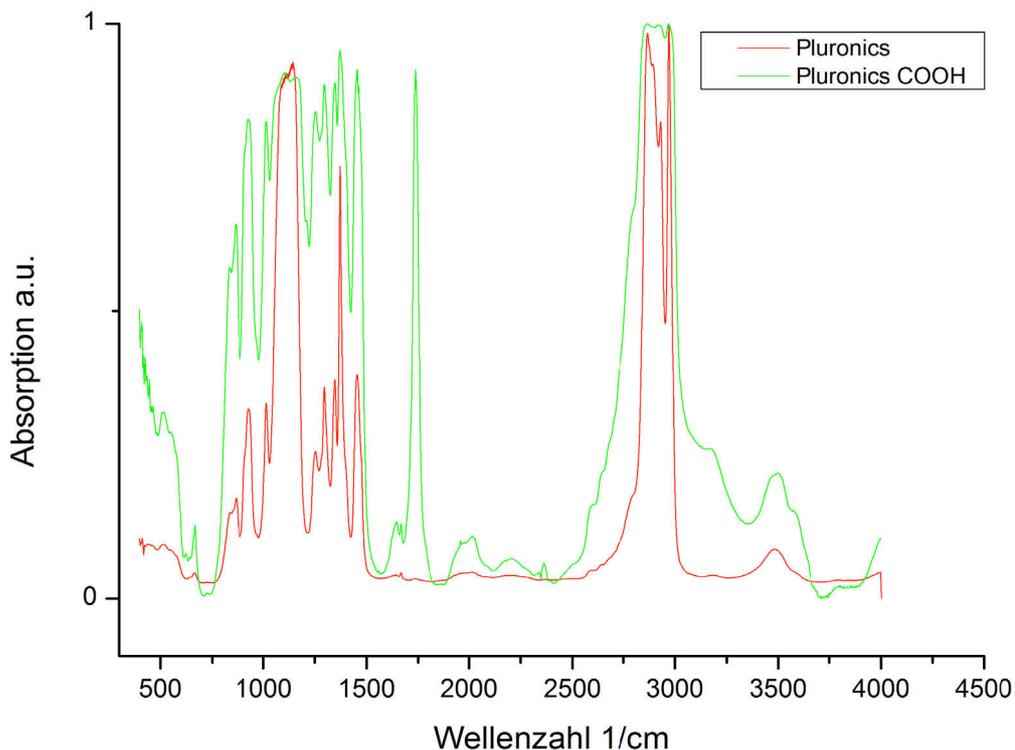


Abb. 7.4: IR-Spektrum von L121 vor und nach der Modifikation mit Bernsteinsäureanhydrid; die Bande bei 1700 cm^{-1} zeigt die Carbonylbande des Bernsteinsäureanhydrids

Fluoreszenzmessung von Vesikeln mit Quantum Dots

Um die Reproduzierbarkeit und Fluoreszenz unter Beweis zu stellen, wurden Quantum Dots der Firma Can in die Vesikel eingelagert. Die Fluoreszenz dieser Partikel ist in Abbildung 7.5-7.7 zu sehen.

Tab. A. 3: Analyse der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM mit QDs

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2	TEM Morphologie
Cd9	3,6	34	0,08	s,v
Cd10	1,8	39	0,08	v
Cd11	0,4	43	0,07	v

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 0,5w% QD 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

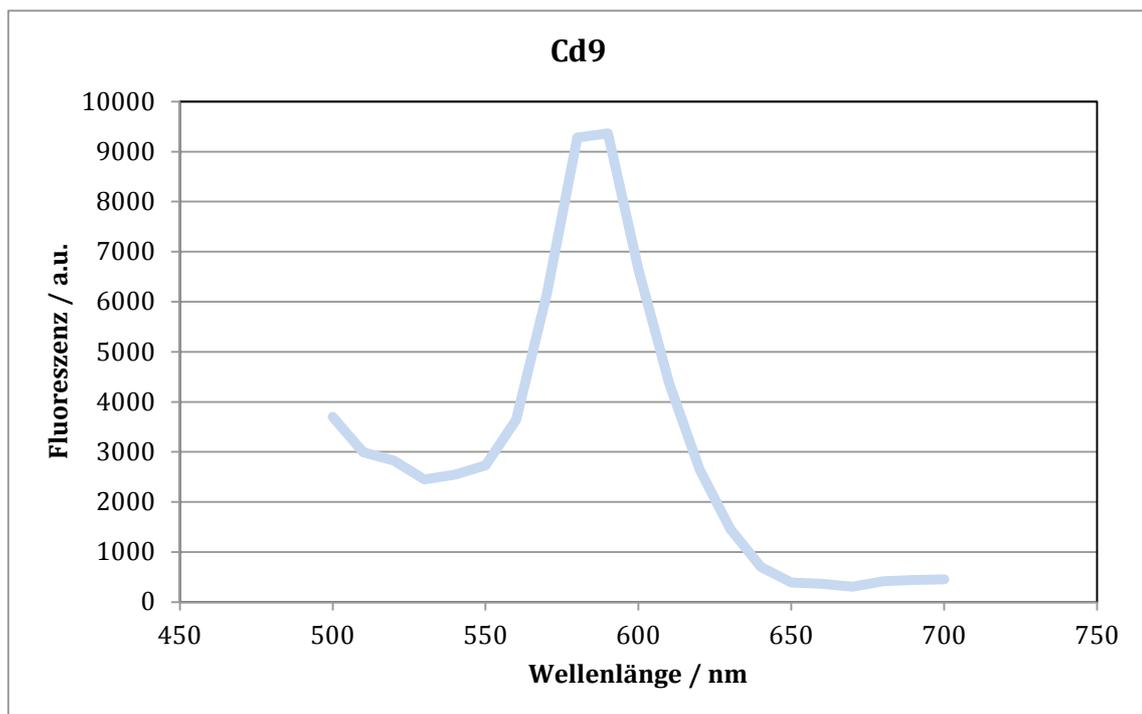


Abb. 7.5: Fluoreszenzspektrum der Probe Cd9

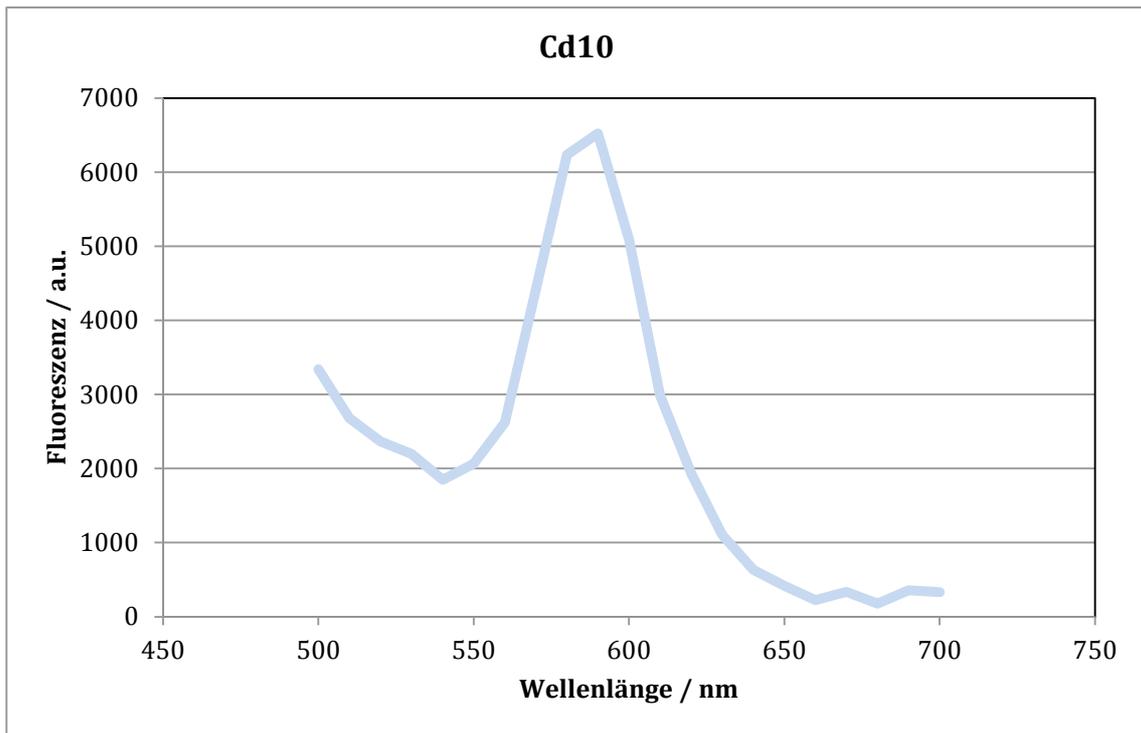


Abb. 7.7: Fluoreszenzspektrum der Probe Cd10

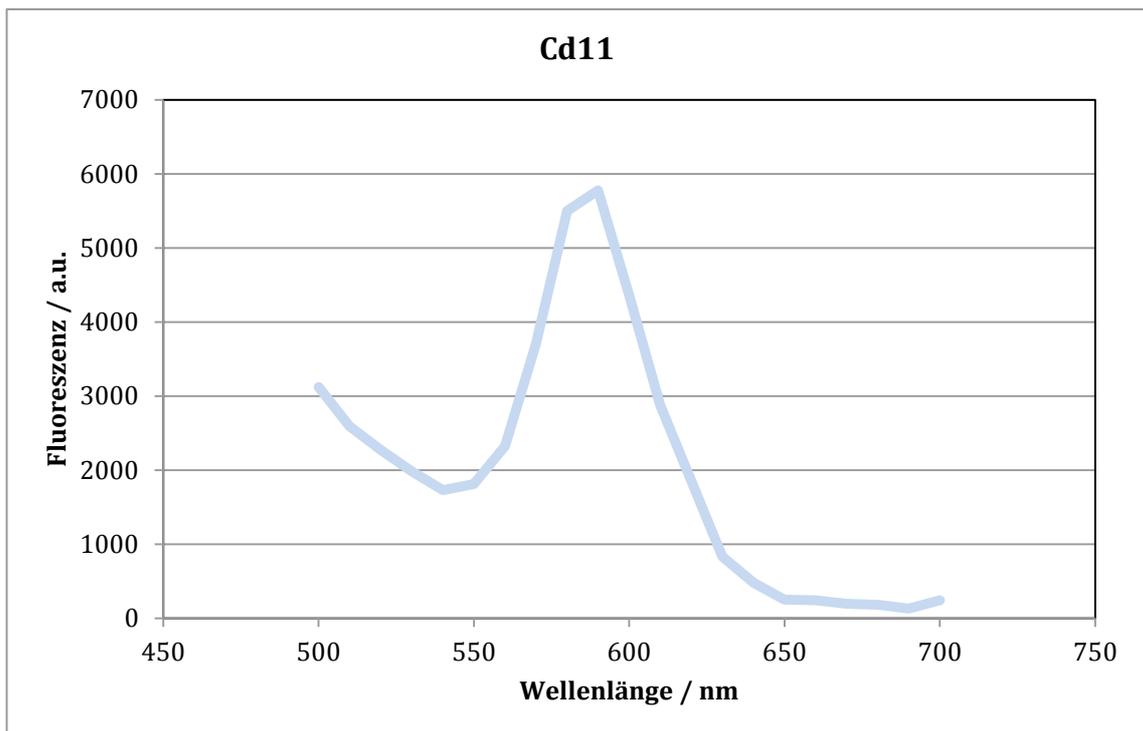
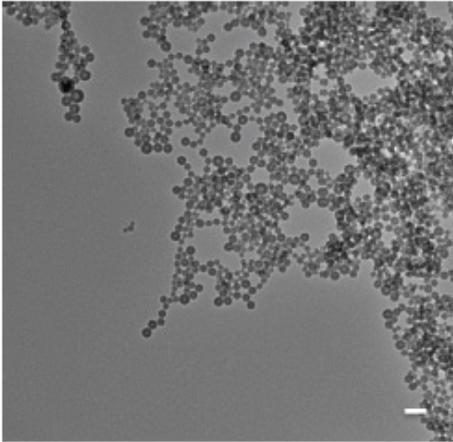
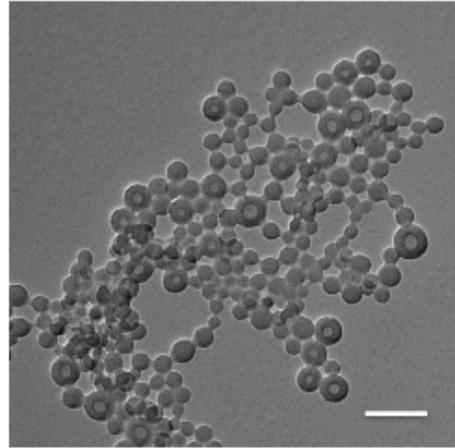


Abb. 7.6: Fluoreszenzspektrum der Probe Cd11

Cd9



Cd10



Cd11

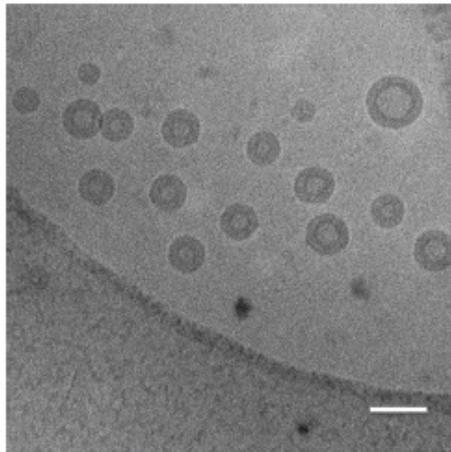


Abb. 7.8: TEM-(oben) und Cryo-TEM-(unten)-Aufnahmen der Proben Cd9-Cd11
Scalebar = 100 nm

Reproduzierbarkeit

Zusätzlich wurde die gleiche Synthese am nächsten Tag für eine Flussrate wiederholt. Die größten Fehlerquellen sind gegeben durch Konzentrations-schwankungen und Schwankungen in der THF-Vormischung. Wenn diese genau eingestellt werden, ist die Reproduzierbarkeit im Mischer extrem hoch und beträgt nur wenigen Prozent. Auch die winkelabhängige Auftragung und die niedrigen μ_2 -Werte zeigen die gute Kontrollierbarkeit der Selbstorganisation.

Tab. A. 4: Wiederholung der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ Partikelsynthese im CPMM

Probe	Flussrate ml/min	R_h nm	μ_2
Cd10	1,8	39,3	0,08
Cd10w	1,8	39	0,07

Flussbed.: Wasser/THF 1:1; Ausgangslösung: 0,5w% QD 2,92 g/L Polymer in THF/H₂O (73/27 v%/v%)
 $\langle R_h \rangle$: Reziprokwert eines reziproken z-Mittels $\langle 1/R_h \rangle z^{-1}$ aus dynamischer Lichtstreuung
 Morphologie: s=Mizelle; v=Vesikel; d=Scheibe

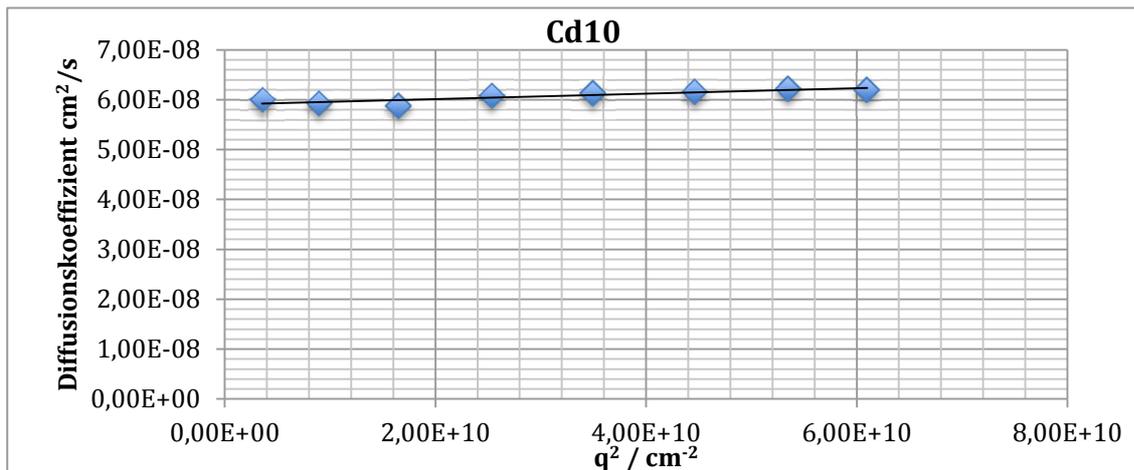


Abb. 7.9: Winkelabhängige Auftragung der Diffusionskoeffizienten

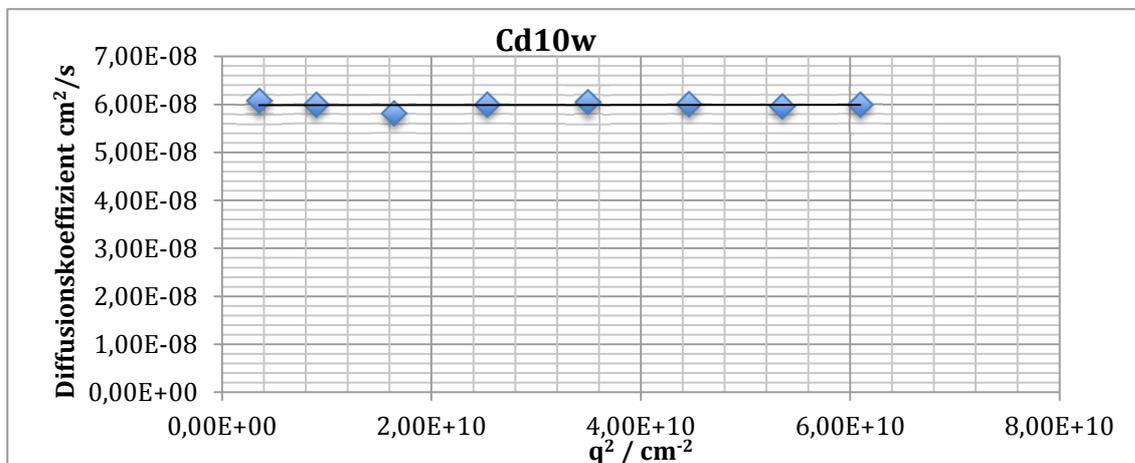


Abb. 7.10: Winkelabhängige Auftragung der Diffusionskoeffizienten

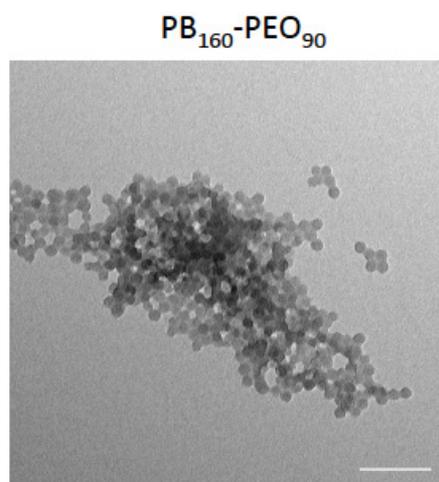
Ergänzende TEM-Aufnahmen

Abb. 7.11: TEM-Aufnahme von vernetzten Mizellen bestehend aus dem Polymer PB₁₆₀-PEO₉₀ nach Batchsynthese (Scalebar = 100 nm)

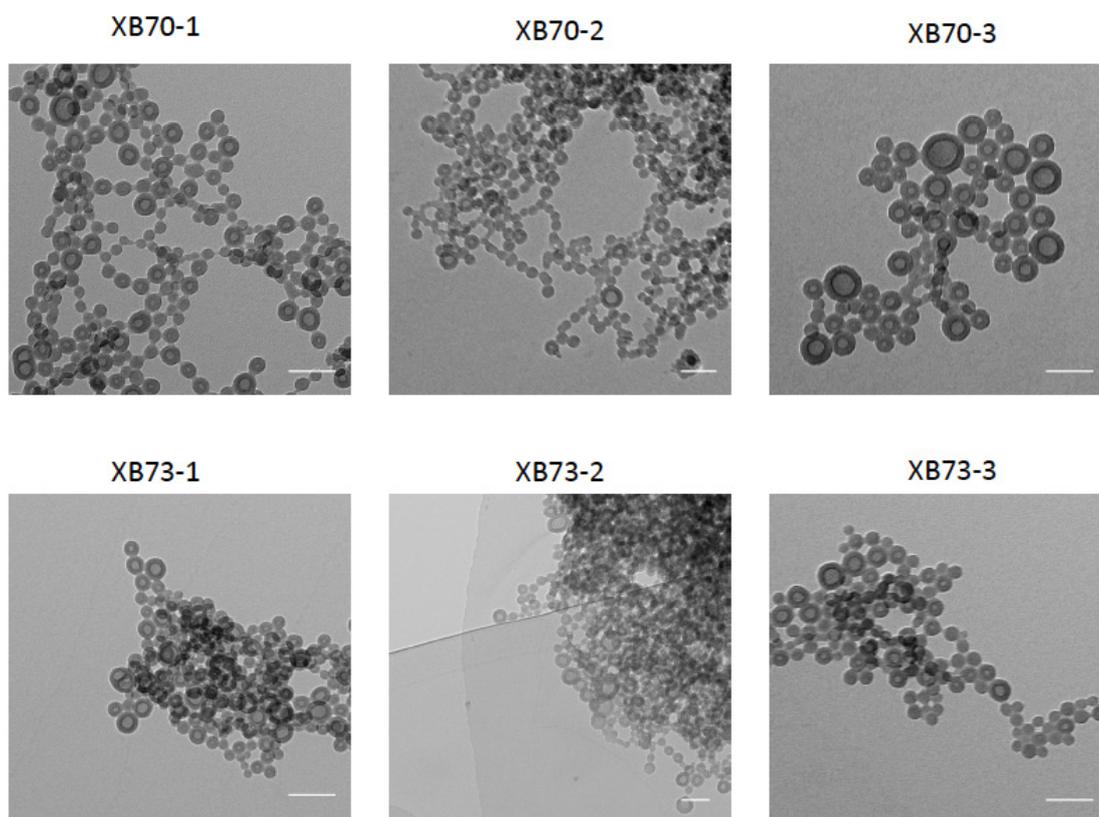


Abb. 7.12: Weitere TEM-Aufnahmen der PB₁₆₀-PEO₆₀-COOH-Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

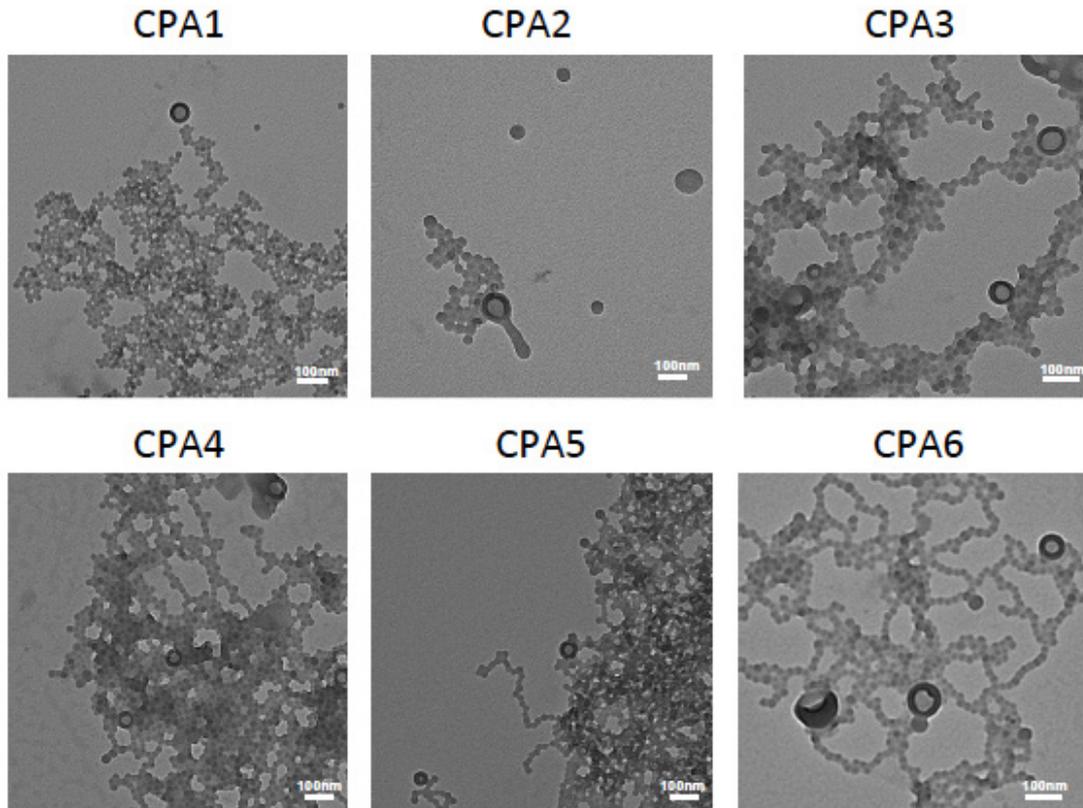


Abb. 7.13: Weitere TEM-Aufnahmen der PB₁₃₀-PEO₆₆-Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung

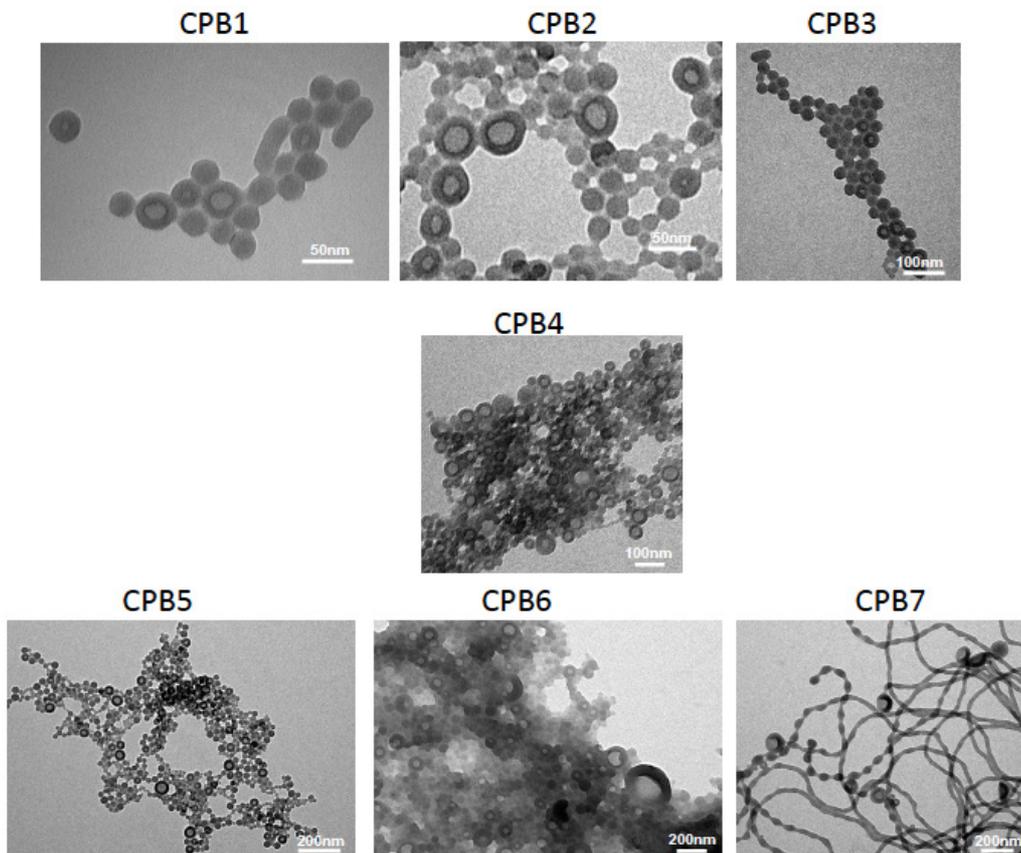


Abb. 7.14: Weitere TEM-Aufnahmen der PB₁₃₀-PEO₆₆-COOH-Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung

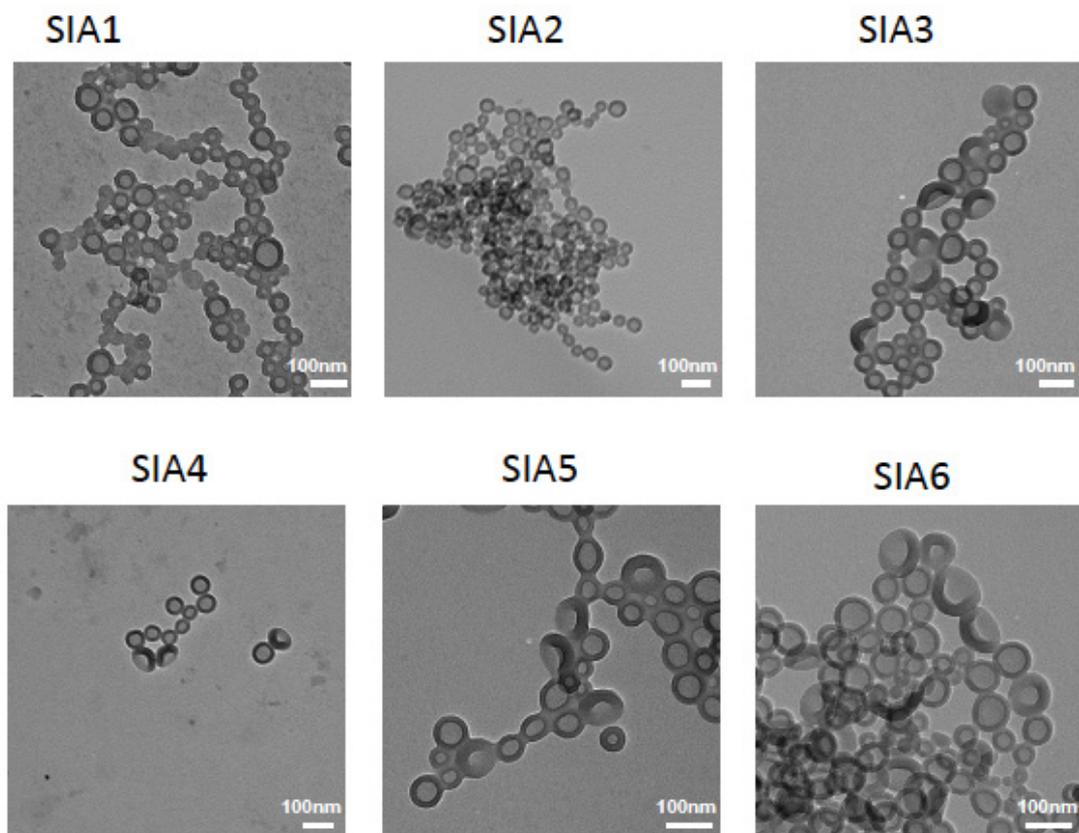


Abb. 7.15: TEM-Aufnahmen der $PB_{130}-PEO_{66}$ -Partikel aus dem SIMM nach Vernetzung

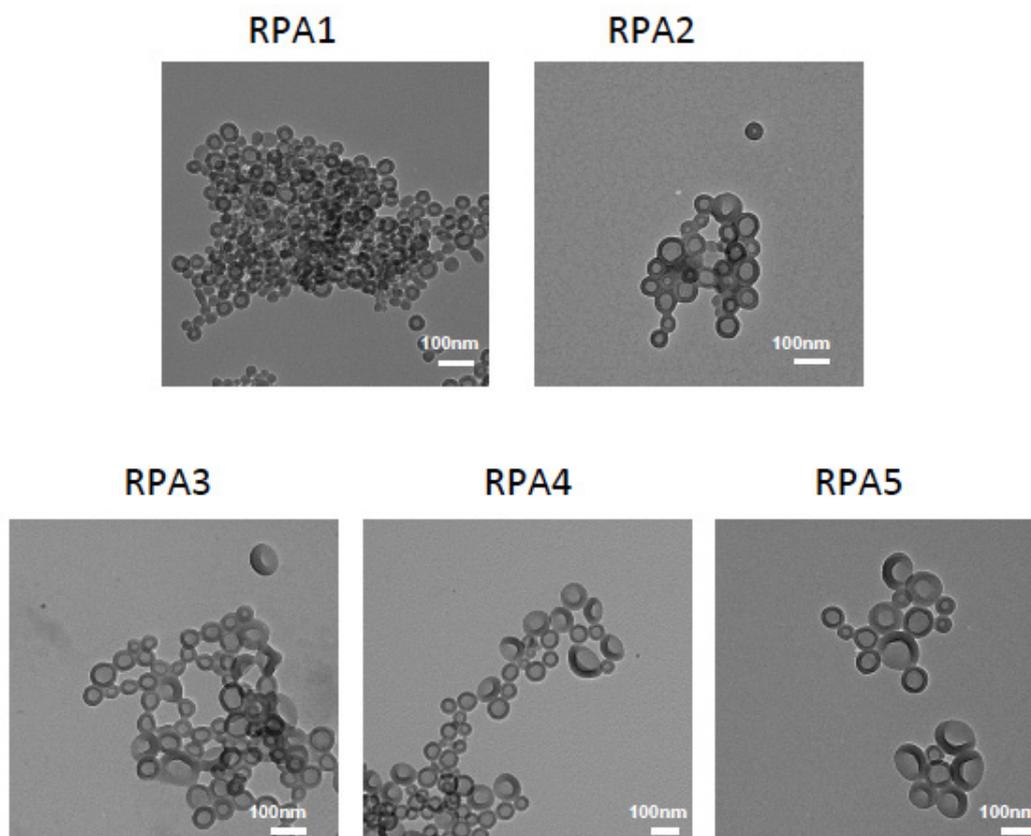


Abb. 7.16: TEM-Aufnahmen der $PB_{130}-PEO_{66}$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung

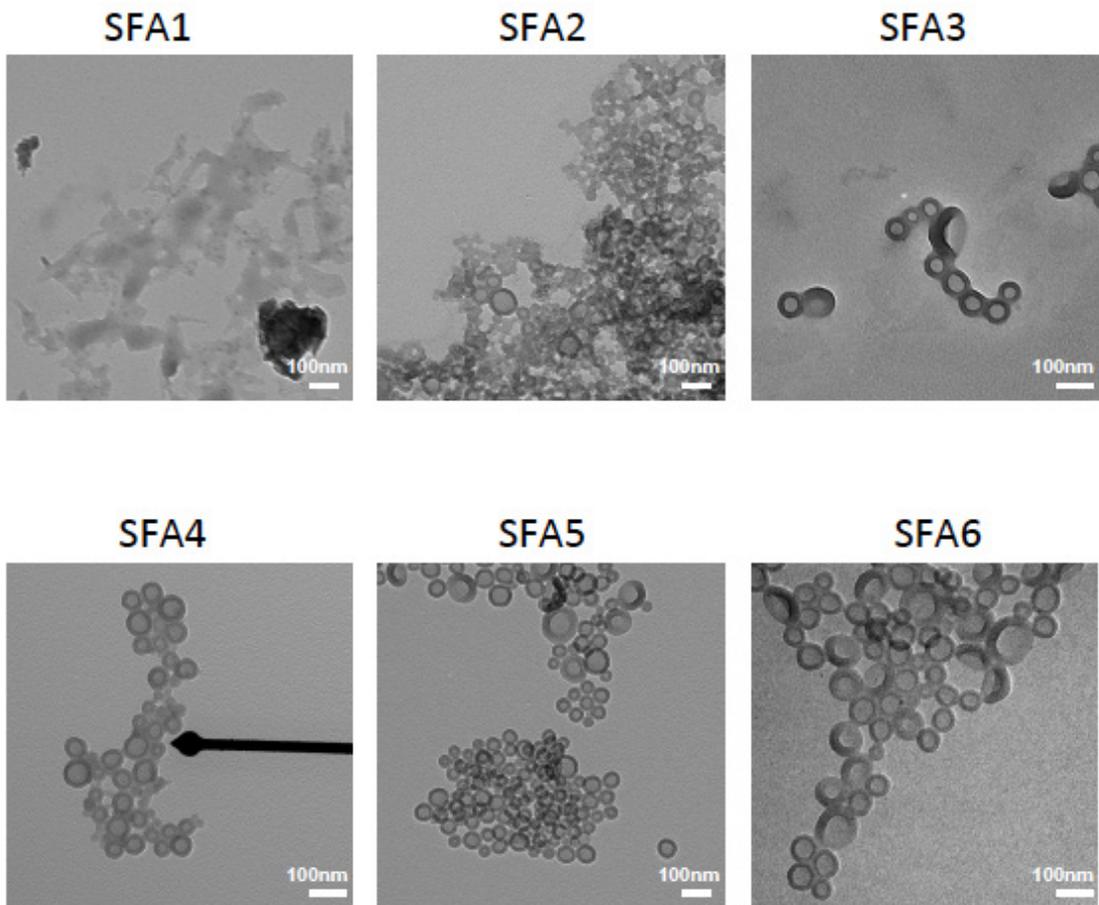


Abb. 7.17: TEM-Aufnahmen der PB_{130} - PEO_{66} -Partikel aus dem SFIMM bei symmetrischen Flussraten nach Vernetzung

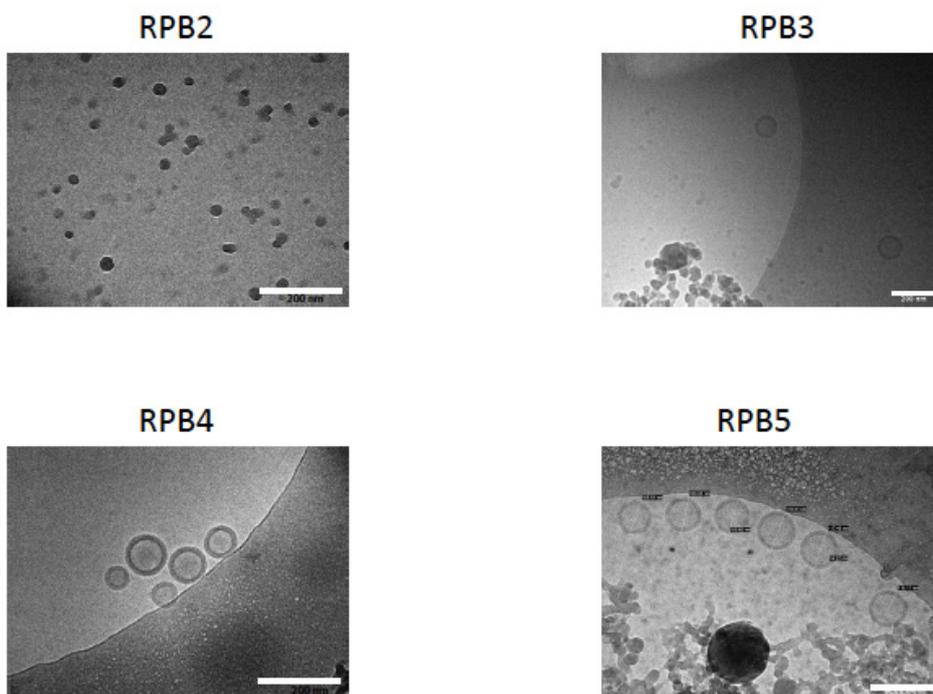


Abb. 7.18: TEM-Aufnahmen der PB_{130} - PEO_{66} -COOH Partikel aus dem SFIMM bei symmetrischen Flussraten nach Vernetzung

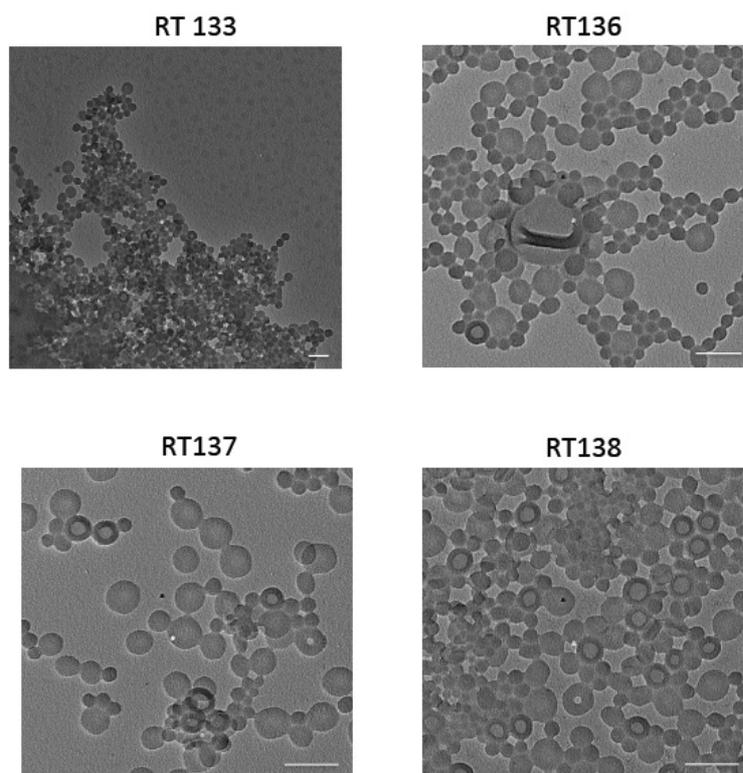


Abb. 7.19: Weitere TEM-Aufnahmen der PB₁₃₀-PEO₆₆-Partikel aus dem SFIMM bei symmetrischen Flussraten und niedriger Konzentration nach Vernetzung

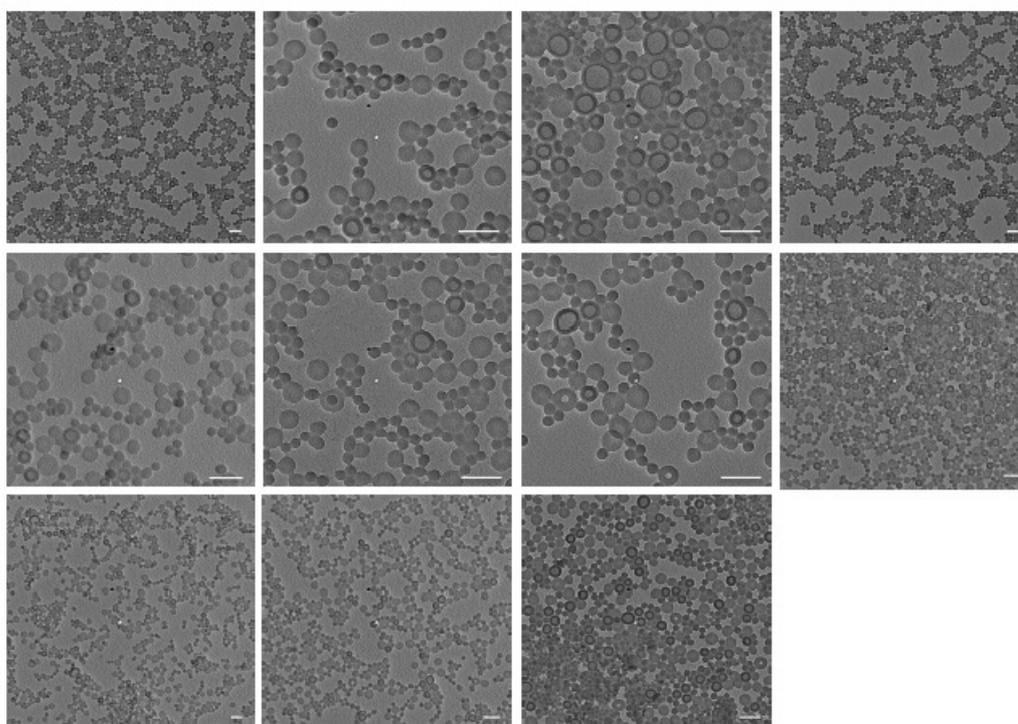


Abb. 7.20: TEM-Bilder vernetzter Proben aus denen die Scheiben/Vesikel-Statistik erstellt wurde

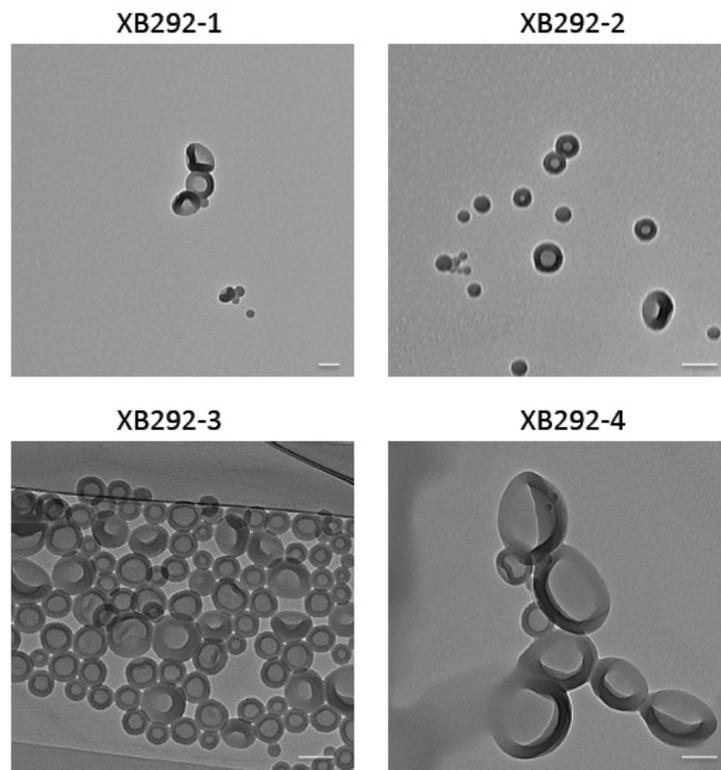


Abb. 7.22: Weitere TEM-Aufnahmen der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

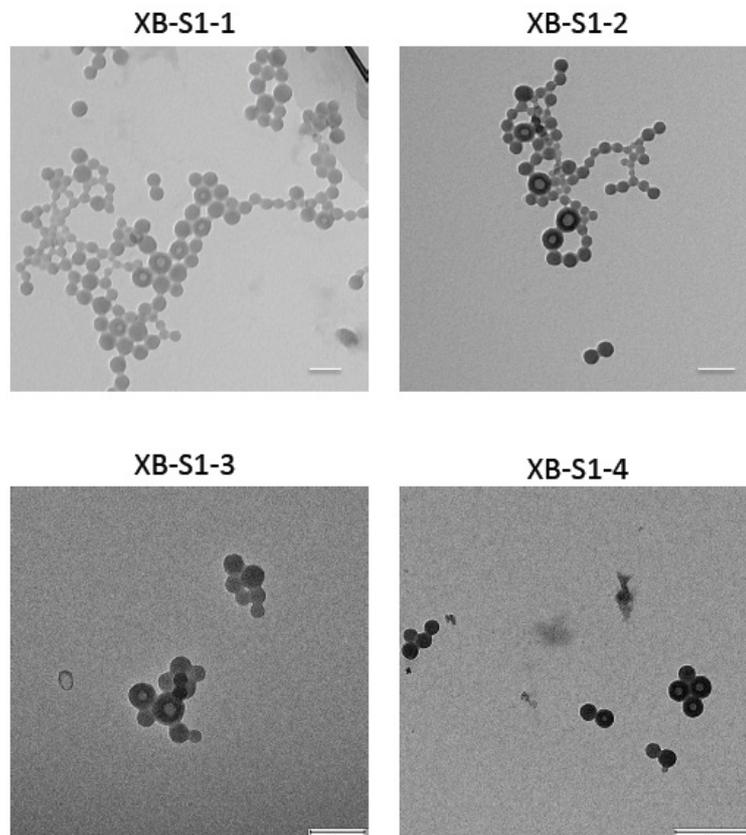


Abb. 7.21: Weitere TEM-Aufnahmen der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

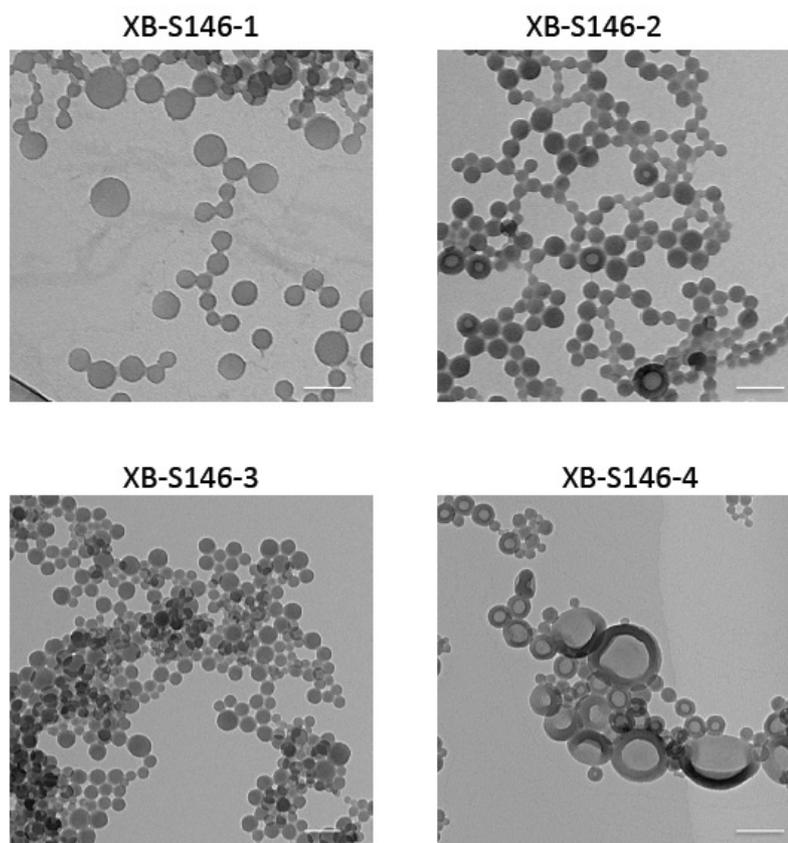


Abb. 7.24: Weitere TEM-Aufnahmen der PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

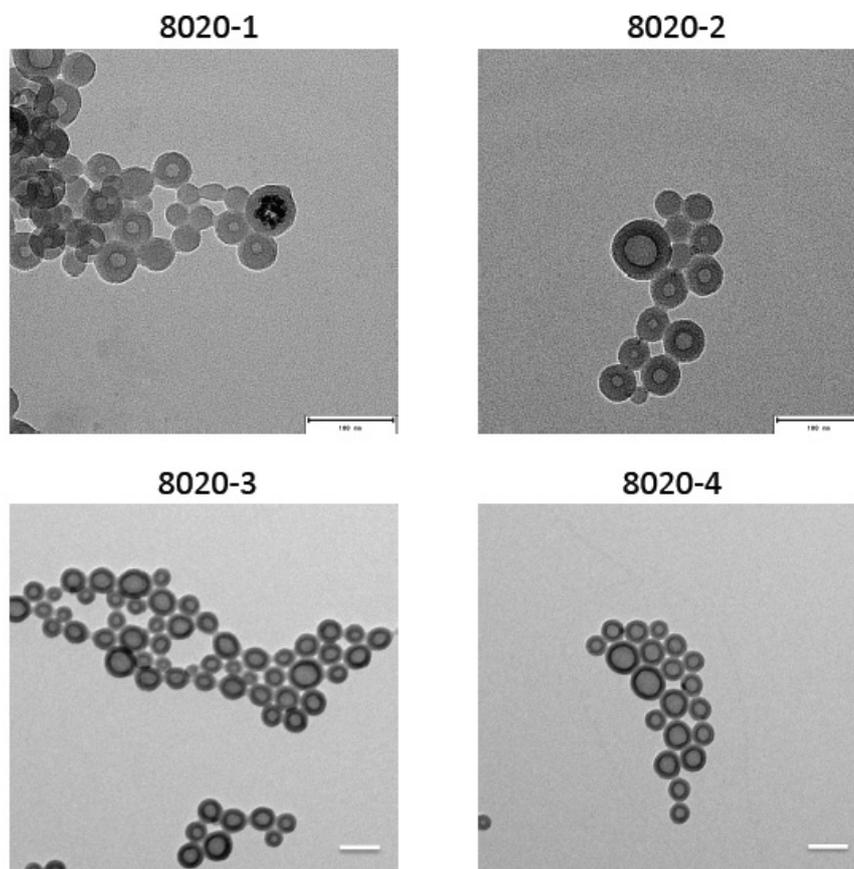


Abb. 7.23: Weitere TEM-Aufnahmen Eisenoxid-beladenen PB_{160} - PEO_{60} - $COOH$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

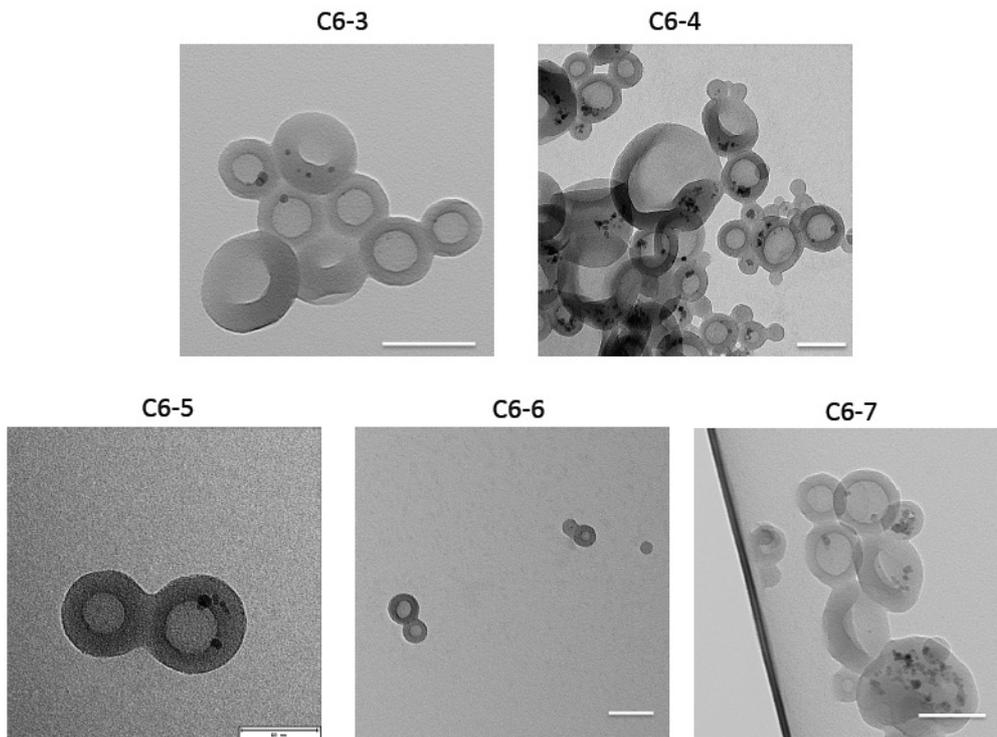


Abb. 7.26: Weitere TEM-Aufnahmen der dual-beladenen $PB_{160}-PEO_{60}-COOH$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

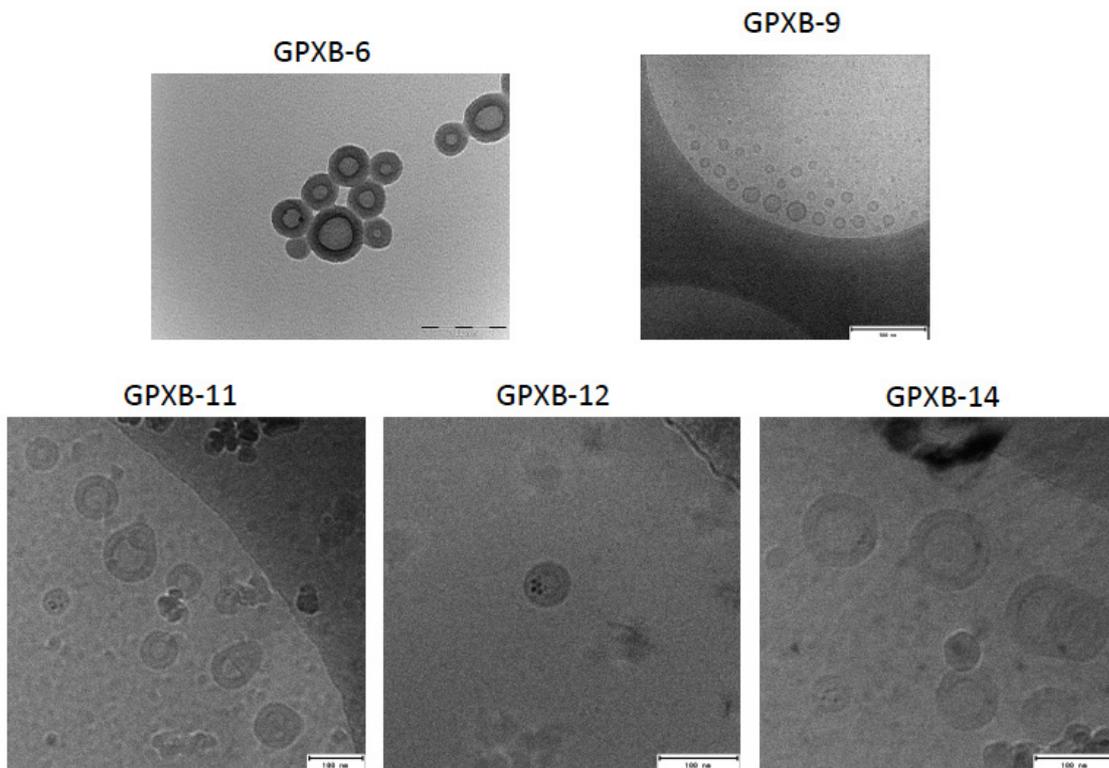


Abb. 7.25: Weitere TEM-Aufnahmen der QD-beladenen $PB_{160}-PEO_{60}-COOH$ -Partikel aus dem CPMM nach Vernetzung (Scalebar entspricht 100 nm)

Abkürzungsverzeichnis

1A	Copolymer PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ -OH
1B	Copolymer PB ₁₃₀ -PEO ₆₆ -COOH
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AFM	Rasterkraftmikroskopie
s-BuLi	s-Butyllithium
C _x	Konzentration x
CdSe	Cadmiumselenid
CdS	Cadmiumsulfid
CPMM	'split and recombine'-Mikromischer
CryoTEM	Cryogene Transmissionselektronenmikroskopie
d	Durchmesser
D	Diffusionskoeffizient
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
L121	PEO ₅ -PPO ₆₈ -PEO ₅
LS	Lichtstreuung
M _n	Zahlenmittel der Molmasse
M _w	Gewichtsmittel der Molmasse
NR	Nilrot
PB	Polybutadien
PEO	Polyethylenoxid
PLA	PEO ₅ -PPO ₆₈ -PEO ₅
PLB	HOOC-PEO ₅ -PPO ₆₈ -PEO ₅ -COOH
PPO	Polypropylenoxid
QD	Quantum Dot, Halbleiter-Nanokristall
R _g	Trägheitsradius
R _h	Hydrodynamischer Radius
SIMM	Schlitz-interdigital Mikromischer
SFIMM	SuperFocus Mikromischer
SLS	Statische Lichtstreuung
t-BuP4	N-[[tert-butylimino-bis[[tris(dimethylamino)-λ ⁵ -phosphanylidene]amino]-λ ⁵ -phosphanyl]imino-bis(dimethylamino)-λ ⁵ -phosphanyl]-N-methylmethanamin
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
USPIO-NP	Ultra-kleine superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel
XA	Copolymer PB ₁₆₀ -PEO ₆₀ -OH
XB	Copolymer PB ₁₆₀ -PEO ₆₀ -COOH
ZnS	Zinksulfid
w%	Gewichtsprozent
v%	Volumenprozent

8 Literatur

1. Wolf EL and Medikonda M. *Understanding the Nanotechnology Revolution*, 2012.
2. Goddard WA, Brenner DW, Lyshevski SE, and Iafrate GJ. *Handbook of NANOSCIENCE, ENGINEERING, and TECHNOLOGY*, Third ed., 2012.
3. Kita-Tokarczyk K, Grumelard J, Haefele T, and Meier W. *Polymer* 2005;46(11):3540-3563.
4. Discher BM, Won YY, Ege DS, Lee J-M, and Bates FS. *Science* 1999;284:1143.
5. Meier W. *Block Copolymer Vesicles. Block Copolymers in Nanoscience*.
6. Brown L, McArthur SL, Wright PC, Lewis A, and Battaglia G. *Lab on a Chip* 2010;10(15):1922-1928.
7. Liu GY, Liu XS, Wang SS, Chen CJ, and Ji J. *Langmuir* 2012;28(1):557-562.
8. Allen TM and Cullis PR. *Science* 2004;303(5665):1818-1822.
9. Kuznetsov AA, Filippov VI, Nikolskaa TA, Budko AP, Kovarskii AL, Zontov SV, Kogan BY, and Kuznetsov OA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2009;321(10):1575-1579.
10. Vartholomeos P, Fruchard M, Ferreira A, and Mavroidis C. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2011;13(1):157-184.
11. Saritas EU, Goodwill PW, Zhang GZ, and Conolly SM. *Medical Imaging, IEEE Transactions on* 2013;PP(99):1-1.
12. Lensen D, Vriezema DM, and van Hest JCM. *Macromolecular Bioscience* 2008;8(11):991-1005.
13. Nardin C, Hirt T, Leukel J, and Meier W. *Langmuir* 2000;16:1035.
14. Meier W, Nardin C, and Winterhalter M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2000;39:4599.
15. Ringsdorf H, Schlarb B, and Venzmer J. *Angewandte Chemie* 1988;100(1):117-162.
16. Vögtle F. *Supramolekulare Chemie*. Stuttgart: Teubner, 1992.
17. Blokzijl W and Engberts JBFN. *Angewandte Chemie International Edition in English* 1993;32(11):1545-1579.
18. Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed., 1992.
19. Hyde ST. *J. Phys. Colloques* 1990;51(C7):C7-209-C207-228.
20. Antonietti M and Förster S. *Advanced Materials* 2003;15(16):1323-1333.
21. Rodriguez-Garcia R, Mell M, Lopez-Montero I, Netzel J, Hellweg T, and Monroy F. *Soft Matter* 2011;7(4):1532-1542.
22. Uneyama T. *Journal of Chemical Physics* 2007;126(11).
23. Le Meins JF, Sandre O, and Lecommandoux S. *Eur. Phys. J. E* 2011;34(2):14.
24. Bressel K, Muthig M, Prevost S, Grillo I, and Gradzielski M. *Colloid and Polymer Science* 2010;288(8).
25. Bressel K, Muthig M, Prevost S, Gummel J, Narayanan T, and Gradzielski M. *Acs Nano* 2012;6(7):5858-5865.
26. Adams DJ, Adams S, Atkins D, Butler MF, and Fuzeland S. *Journal of Controlled Release* 2008;128(2):165-170.
27. de Vries AH, Mark AE, and Marrink SJ. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126(14):4488-4489.
28. Daoulas K and Müller M. Comparison of Simulations of Lipid Membranes with Membranes of Block Copolymers. In: Meier WP and Knoll W, editors. *Polymer Membranes/Biomembranes*, vol. 224: Springer Berlin Heidelberg, 2010. pp. 43-85.
29. Shillocock JC. *Langmuir* 2011;28(1):541-547.
30. He X and Schmid F. *Macromolecules* 2006;39(7):2654-2662.
31. Bermudez H, Brannan AK, Hammer DA, Bates FS, and Discher DE. *Macromolecules* 2002;35:8203.
32. Mueller W, Koynov K, Pierrat S, Thiermann R, Fischer K, and Maskos M. *Polymer* 2011;52(5):1263-1267.
33. Discher BM, Bermudez H, Hammer DA, Discher DE, Won YY, and Bates FS. *J. Phys. Chem. B* 2002;106:2848.
34. Won Y-Y, Davis HT, and Bates FS. *Science* 1999;283(5404):960-963.
35. Michael M and Harris JR. *Macromolecular Rapid Communications* 2001;22(4):271-273.
36. Owens DE and Peppas NA. *International Journal of Pharmaceutics* 2006;307(1):93-102.
37. Illum L and Davis SS. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1983;72(9):1086-1089.
38. Jain S and Bates FS. *Macromolecules* 2004;37(4):1511-1523.
39. Kukula H, Schlaad H, Antonietti M, and Forster S. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124:1658.
40. Maskos M. *Polymer* 2006;47(4):1172-1178.
41. Jiang X, Ortiz C, and Hammond PT. *Langmuir* 2002;18(4):1131-1143.
42. Rheingans O. vol. Ph.D. Mainz, 1999.
43. Forster S and Kramer E. *Macromolecules* 1999;32(8):2783-2785.
44. Geng Y, Discher DE, Justynska J, and Schlaad H. *Angewandte Chemie* 2006;118(45):7740-7743.
45. Pawar PV, Gohil SV, Jain JP, and Kumar N. *Polymer Chemistry* 2013;4(11):3160-3176.
46. Schillén K, Bryskhe K, and Mel'nikova YS. *Macromolecules* 1999;32(20):6885-6888.
47. Kabanov AV, Batrakova EV, Meliknubarov NS, Fedoseev NA, Dorodnich TY, Alakhov VY, Chekhonin VP, Nazarova IR, and Kabanov VA. *Journal of Controlled Release* 1992;22(2):141-157.
48. Foster T, Dorfman KD, and Davis HT. *Langmuir* 2010;26(12):9666-9672.
49. Li F, de Haan LHJ, Marcelis ATM, Leermakers FAM, Stuart MAC, and Sudholter EJR. *Soft Matter* 2009;5(20):4042-4046.
50. Bryskhe K, Jansson J, Topgaard D, Schillén K, and Olsson U. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004;108(28):9710-9719.
51. Su YL, Wang J, and Liu HZ. *Macromolecules* 2002;35(16):6426-6431.
52. Wanka G, Hoffmann H, and Ulbricht W. *Macromolecules* 1994;27(15):4145-4159.
53. Glatter O, Scherf G, Schillén K, and Brown W. *Macromolecules* 1994;27(21):6046-6054.
54. Hvidt S, Jorgensen EB, Brown W, and Schillén K. *Journal of Physical Chemistry* 1994;98(47):12320-12328.
55. Kwon JW, Han YK, Lee WJ, Cho CS, Paik SJ, Cho DI, Lee JH, and Wee WR. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2005;31(3):607-613.
56. Chiappetta DA and Sosnik A. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;66(3):303-317.
57. *International Journal of Toxicology* 2008;27(2 suppl):93-128.
58. Grindel JM, Jaworski T, Piraner O, Emanuele RM, and Balasubramanian M. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002;91(9):1936-1947.
59. Pec EA, Wout ZG, and Johnston TP. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1992;81(7):626-630.
60. Li F, Ketelaar T, Marcelis ATM, Leermakers FAM, Cohen Stuart MA, and Sudholter EJR. *Macromolecules* 2006;40(2):329-333.
61. Lee J-M, Bermudez H, Discher BM, Sheehan MA, and Won YY. *Biotechnol. Bioeng.* 2001;73:135.
62. Dimova R, Seifert U, Pouligny B, Forster S, and Dobereiner HG. *Eur. Phys. J. E Soft Matter* 2002;7:241.
63. Lorenceau E, Utada AS, Link DR, Cristobal G, Joanicot M, and Weitz DA. *Langmuir* 2005;21(20):9183-9186.
64. Beaune G, Dubertret B, Clément O, Vayssettes C, Cabuil V, and Ménager C. *Angewandte Chemie* 2007;119(28):5517-5520.
65. Hessel V, Löwe H, and Schönfeld F. *Chemical Engineering Science* 2005;60(8-9):2479-2501.
66. Falk L and Commenge JM. *Chemical Engineering Science* 2010;65(1):405-411.

67. Anderson NG. *Organic Process Research & Development* 2012;16(5):852-869.
68. Ehrfeld W, Hessel V, and Löwe H. *Microreactors: New Technology for Modern Chemistry* 1ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.
69. Wirth T. *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*, 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
70. Bayer T and Himmler K. *Chemical Engineering & Technology* 2005;28(3):285-289.
71. Hessel V, Hardt S, Löwe H, Müller A, and Kolb G. *Chemical Micro Process Engineering* 1ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
72. Yube K and Mae K. *Chemical Engineering & Technology* 2005;28(3):331-336.
73. Jähnisch K, Baerns M, Hessel V, Ehrfeld W, Haverkamp V, Löwe H, Wille C, and Guber A. *Journal of Fluorine Chemistry* 2000;105(1):117-128.
74. Ehrlich H, Linke D, Morgenschweis K, Baerns M, and hnisch K. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 2002;56(11):647-653.
75. Löb P, Löwe H, and Hessel V. *Journal of Fluorine Chemistry* 2004;125(11):1677-1694.
76. Ziegenbalg D, Kompter C, Schönfeld F, and Kralisch D. Evaluation of different micromixers by CFD simulations for the anionic polymerisation of styrene. *Green Processing and Synthesis*, vol. 1, 2012. pp. 211.
77. Nagaki A, Kawamura K, Suga S, Ando T, Sawamoto M, and Yoshida J-i. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126(45):14702-14703.
78. Wu T, Mei Y, Cabral JT, Xu C, and Beers KL. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126(32):9880-9881.
79. Usutani H, Tomida Y, Nagaki A, Okamoto H, Nokami T, and Yoshida J-i. *Journal of the American Chemical Society* 2007;129(11):3046-3047.
80. Shum HC, Kim J-W, and Weitz DA. *Journal of the American Chemical Society* 2008;130(29):9543-9549.
81. Thiele J, Steinhäuser D, Pfohl T, and Förster S. *Langmuir* 2010;26(9):6860-6863.
82. Hardt S and Schönfeld F. *Aiche Journal* 2003;49(3):578-584.
83. Hessel V, Hardt S, Löwe H, and Schönfeld F. *Aiche Journal* 2003;49(3):566-577.
84. Löb P, Drese KS, Hessel V, Hardt S, Hofmann C, Löwe H, Schenk R, Schönfeld F, and Werner B. *Chemical Engineering & Technology* 2004;27(3):340-345.
85. Bošković D. *Experimentelle Bestimmung und Modellierung des Verweilzeitverhaltens mikrofluidischer Strukturen*. Ilmenau: Technischen Universität Ilmenau, 2010.
86. Schönfeld F, Hessel V, and Hofmann C. *Lab on a Chip* 2004;4(1):65-69.
87. IMM. *The Catalogue*. In: Mainz IfM, editor., 2006.
88. Li S, Byrne B, Welsh J, and Palmer AF. *Biotechnology Progress* 2007;23(1):278-285.
89. Mueller W. *Hydrophobe und hydrophile Beladung polymerer Vesikel*. Physical Chemistry, vol. PhD. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität, 2009. pp. 147.
90. Rogach AL. *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots*: Springer-Verlag, 2008.
91. Klein DL, Roth R, Lim AKL, Alivisatos AP, and McEuen PL. *Nature* 1997;389(6652):699-701.
92. Klimov VI. *Nanocrystal quantum dots*: CRC Press Boca Raton, 2010.
93. Sperling RA and Parak WJ. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science* 2013;47(1):1333-1383.
94. Reiss P, Protiere M, and Li L. *Small* 2009;5(2):154-168.
95. Hines MA and Guyot-Sionnest P. *The Journal of Physical Chemistry* 1996;100(2):468-471.
96. Xie R, Kolb U, Li J, Basché T, and Mews A. *Journal of the American Chemical Society* 2005;127(20):7480-7488.
97. Corot C, Robert P, Idee JM, and Port M. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006;58(14):1471-1504.
98. Gupta AK and Gupta M. *Biomaterials* 2005;26(18):3995-4021.
99. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, and Muller RN. *Chemical Reviews* 2008;108(6):2064-2110.
100. *Odenbach S. Handbook of Magnetic Materials*. Amsterdam: Elsevier, 2006
101. <http://www.supermagnete.de>.
102. Vogel H. *Gerthsen Physik*, 1999.
103. Company F. *Vitrobot Guide*. vol. 6.0.
104. Bantle S, Schmidt M, and Burchard W. *Macromolecules* 1982;15(6):1604-1609.
105. Tieke. *Makromolekulare Chemie: Eine Einführung*, 2 ed.: Wiley-VCH, 2005.
106. Schärfl W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*: Springer, 2007.
107. Bantle S, Schmidt M, and Burchard W. *Macromolecules* 2002;15(6):1604-1609.
108. Schmidt M and Burchard W. *Macromolecules* 1981;14(1):210.
109. *Basislexikon Chemie*. Römpp. Thieme, 1998.
110. Petzke F. *Praktikums-Skript Spektroskopie*. Mainz: Physikalische Chemie, 2003.
111. Discher DE and Eisenberg A. *Science* 2002;297(5583):967-973.
112. Thiermann R, Mueller W, Montesinos-Castellanos A, Metzke D, Lob P, Hessel V, and Maskos M. *Polymer* 2012;53(11):2205-2210.
113. Thiermann. *Physikalische Chemie*, vol. Diplom. Mainz: Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2009.
114. Kelley EG, Smart TP, Jackson AJ, Sullivan MO, and Epps TH. *Soft Matter* 2011;7(15):7094-7102.
115. Müller W. *Diplomarbeit*. vol. Diploma. Mainz: Johannes-Gutenberg Universität, 2006.
116. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.
117. Glew DN and Watts H. *Canadian Journal of Chemistry* 1973;51(12):1933-1940.