

**Hochaufgelöste NMR-Bildgebung an
Mikrokapseln: Anwendungsorientierte
Charakterisierung der Struktur, Stabilität
und Permeabilität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.
der Fakultät Physik der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von
Diplom-Physiker

Stefan Henning

August 2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Dieter Suter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinz Rehage

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
I. Grundlagen	3
2. NMR-Mikroskopie	5
2.1. Kernmagnetische Resonanz	5
2.2. Bildgebende NMR	9
3. Mikrokapseln	15
3.1. Grundlegendes und Motivierendes zur Mikroverkapselung	15
3.2. Materialien der Kapseln	16
3.3. Präparation der Kapseln	19
II. Morphologie, Permeabilität und Stabilität der Mikrokapseln	23
4. Einfluss unterschiedlicher Präparationen auf makroskopische Strukturen der Mikrokapseln	25
4.1. Probenpräparation	25
4.2. Experimentelle Vorgehensweise zur NMR-Mikroskopie von Mikrokapseln	27
4.3. Membranwachstum von Pektinathohlkapseln	28
4.4. Einfluss von Glycerin auf die Gestalt von Alginat-Hohlkapseln	30
4.5. Kompositkapseln aus Pektinat und Schellack	31
4.6. Schellack-beschichtete Pektinatkapseln	32
4.7. Alginat-Matrixkapseln mit externer Schellack-Beschichtung	36
4.8. Kapitelzusammenfassung	36
5. Membranpermeabilitätsbestimmung mit paramagnetischen Kontrastmitteln	39
5.1. Paramagnetische Kontrastmittel: Gd-DTPA und Kupferionen	40
5.2. Experimentelle Durchführung	41
5.3. Bestimmung der Kapselgeometrie und radialsymmetrischer Amplituden	43
5.4. Ortsaufgelöste Ermittlung der Kontrastmittel-Konzentration	44
5.5. Simulation des Diffusionsvorgangs	47
5.6. Ergebnisse	52
5.7. Diskussion	58
5.8. Zwischenfazit	60
6. Freisetzungen von Anthocyanen aus beschichteten und unbeschichteten Pektinat-kapseln	63
6.1. Grundlegendes zu Anthocyanen	63
6.2. Selbstdiffusionskonstante der Anthocyane	64
6.3. Ermittlung der Anthocyan-Freisetzung durch die UV/Vis-Spektroskopie	67
6.4. Ergebnisse und Diskussion	68

6.5. Kapitelzusammenfassung	73
7. Visualisierung der Kapselauflösung	75
7.1. Experimentelle Vorgehensweise	75
7.2. Ergebnisse und Diskussion	76
7.3. Kapitelzusammenfassung	78
III. Charakterisierung mikroskopischer Membranstrukturen durch die bildgebende Messung von Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten	81
8. Charakterisierung der mikroskopischen Hydrogelstruktur mittels ortsaufgelöster Relaxometrie	83
8.1. Quantitative Bildgebung der Relaxationszeiten	83
8.2. Charakterisierung der porösen Hydrogel-Struktur anhand der Relaxationszeiten	93
8.3. Diskussion und Zusammenfassung	100
9. Bildgebende Messung der Diffusionskonstanten und -Tensoren in Kapselwänden	103
10. Zusammenfassung und Ausblick	107
Literaturverzeichnis	109

1. Einleitung

In dieser Arbeit werden biofunktionale Mikrokapseln bezüglich ihrer mikro- und makroskopischen Struktur, ihrer Stabilität sowie ihrer Durchlässigkeit für Wirk- und Schadstoffe mit Hilfe der bildgebenden NMR charakterisiert. Mikrokapseln, die hier im Wesentlichen aus Hydrogelen der natürlichen Biopolymere Alginat und Pektin und der ebenfalls natürlichen Beschichtung Schellack bestehen, werden in der Lebensmitteltechnik, Pharmazie, Medizin und Biotechnologie zur Verkapselung, zum Schutz und zur verzögerten Freisetzung von empfindlichen Inhaltsstoffen eingesetzt [1,2]. Beispielhafte Inhaltsstoffe sind dabei Medikamente, Nahrungsergänzungsmittel und biologische Zellen. Die Eignung der Mikrokapseln für die jeweilige Verwendung steht in engem Zusammenhang mit der Stabilität, Permeabilität und Morphologie der Kapseln, welche die Freisetzung von Inhaltsstoffen sowie das Eindringen von den Inhaltsstoff gefährdenden Substanzen ermöglichen oder verhindern. Durch eine systematische Untersuchung der mikro- und makroskopischen Struktur, der Permeabilität sowie der Stabilität unterschiedlich präparierter und modifizierter Mikrokapseln in verschiedenen chemischen Umgebungen, und dem Zusammenhang zur Freisetzung und Invasion von verschiedenen Substanzen, werden Aussagen über die Eignung für die gewünschte Anwendung getroffen.

Als konkrete Fragestellung wird hier aufgeklärt, ob in Kooperation mit dem Lehrstuhl Physikalische Chemie II der TU Dortmund präparierte Kapseln zur gezielten Freisetzung eines Extraktes aus Wildheidelbeeren im menschlichen Darm geeignet sind. Wildheidelbeeren enthalten Anthocyane, welche nachweislich kanzerogen-präventive und anti-oxidative Eigenschaften besitzen [3]. Diese Anthocyane werden im Magen allerdings metabolisiert, so dass bei einer natürlichen Zufuhr die gesundheitsförderlichen Wirkungen nicht zur Geltung kommen können. Durch die Entwicklung eines auf Naturprodukten basierenden Kapselsystems, welches die Freisetzung der Anthocyane im Magen verhindert, wohingegen die Freisetzung im Darmtrakt ermöglicht wird, wäre eine Möglichkeit zum wirkungsvollen Einsatz des Wildheidelbeerextrakts oder anderer Wirkstoffe als Medikament oder Nahrungsergänzungsmittel gegeben.

Für die Charakterisierung der genannten Kapsel Eigenschaften wird hauptsächlich die bildgebende NMR verwendet, die aus der klinischen Bildgebung bekannt ist und dort als Magnetresonanztomographie (MRT) bezeichnet wird. Da die Methoden der bildgebenden NMR hier an einem Hochfeld NMR-Spektrometer mit starken Magnetfeldgradienten verwendet werden, liegen die räumlichen Auflösungen der NMR-Bilder bei etwa 10 μm , weshalb die Methodik auch als NMR-Mikroskopie [4] bezeichnet wird und sie letztendlich erst zum Studium der Mikrokapseln geeignet macht.

Die elementarste Möglichkeit der NMR-Mikroskopie zur Charakterisierung von Mikrokapseln

besteht in der nicht-invasiven Visualisierung der Kapselmorphologie mit einer großen Anzahl an kontrastbestimmenden Parametern. Das wird hier genutzt, um die geometrischen Strukturen von unterschiedlich präparierten Mikrokapseln zu charakterisieren, woraus anschließend Rückschlüsse auf die bei der Kapselpräparation ablaufenden Mechanismen getroffen werden. So werden beispielsweise die Hüllen von flüssig gefüllten Pektinatkapseln im Hinblick auf ihre Wanddicken untersucht und der Einfluss von externen Beschichtungen mit dem natürlichen Harz Schellack auf die Kapselwände charakterisiert. Die mittels der bildgebenden NMR bestimmten Kapseleigenschaften werden auch mit Freisetzungseigenschaften von Anthocyanen in Verbindung gesetzt.

Weiterhin steht hier die Anwendung der NMR-Mikroskopie zur Beurteilung der Eignung der Kapseln für eine darmgezielte Freisetzung von Inhaltsstoffen im Vordergrund. Dazu wird einerseits visualisiert, wie sich verschiedene Kapseln unter simulierten Magen-Darm-Bedingungen verhalten. Andererseits wird ein neues Verfahren beschrieben, mit dem die Messung der Durchlässigkeiten von Kapselwänden durch die bildgebende NMR ermöglicht wird. Dieses Verfahren nutzt paramagnetische Moleküle, welche konzentrationsabhängig die Signalamplitude in NMR-Bildern beeinflussen. Das Eindringen oder die Freisetzung solcher Moleküle in und aus Kapseln kann durch dynamische NMR-Bildgebung quantitativ charakterisiert werden, was Ermittlungen von Wandpermeabilitäten ermöglicht.

Die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den Kapseln steht mit den mikroskopischen Strukturen der Kapselwände im Zusammenhang. Diese Strukturen werden hier durch bildgebende Messungen von Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten der in den Kapselwänden vorliegenden Wassermoleküle charakterisiert. Aus diesen Informationen werden weiterhin Rückschlüsse auf die porösen Strukturen der Wandmaterialien gezogen.

Teil I.

Grundlagen

2. NMR-Mikroskopie

Das hauptsächliche experimentelle Verfahren, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung von Mikrokapseln dient, ist die bildgebende NMR. Sie ist bekannt aus dem klinischen Einsatz in Magnetresonanztomographen (auch Kernspintomographen oder kurz MRT/MRI genannt), wo sie zur Bildgebung in fast allen Bereichen des menschlichen Körpers eingesetzt wird. Die Anwendung der aus der klinischen NMR-Bildgebung bekannten Techniken an NMR-Spektrometern mit hohen Feldstärken wird üblicherweise als NMR-Mikroskopie (auch NMR-Mikrobildgebung) bezeichnet, wobei die ersten Arbeiten dazu im Jahre 1986 von Aguayo et al. angefertigt wurden [5]. Die unterschiedlichen Bezeichnungen sind dabei darauf zurückzuführen, dass mit der NMR-Mikroskopie räumliche Auflösungen in der Größenordnung von wenigen μm erreicht werden, wohingegen übliche Auflösungen in der klinischen Magnetresonanztomographie in der Größenordnung von 1 mm liegen.

Mit der bildgebenden NMR ist es allgemein möglich, Informationen über die räumliche Verteilung von Atomkernen in einem Objekt zu erhalten. Im Vergleich zu anderen bildgebenden Methoden, wie der Lichtmikroskopie oder der Röntgentomographie, bietet die bildgebende NMR allerdings vielseitigere Möglichkeiten der Kontrasterzeugung. Mögliche kontrastbestimmende Parameter sind dabei z.B. Spindichten, Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten. Da diese Parameter eng mit physikalischen und chemischen Eigenschaften verknüpft sind, ist die bildgebende NMR ein hervorragend geeignetes Werkzeug zur Untersuchung verschiedenster Proben im Hinblick auf ein großes Spektrum an Fragestellungen.

Die bildgebende NMR hat sich in den 70er Jahren aus der NMR-Spektroskopie entwickelt. Sie basiert darauf, dass die Zeeman-Aufspaltungen von Atomkernen durch ortsabhängige Magnetfelder eine Funktion des Ortes werden. Die grundlegenden Arbeiten dazu wurden unabhängig voneinander von Damadian [6] und Lauterbur [7] angefertigt. Im Folgenden werden die wichtigsten physikalischen Grundlagen der NMR-Bildgebung dargestellt. Die hier dargebotene Darstellung fundiert dabei auf der sehr viel umfassenderen Beschreibung der NMR-Mikroskopie von Callaghan [4] und wurde in ähnlicher Form bereits in meiner Diplomarbeit [8] dargeboten.

2.1. Kernmagnetische Resonanz

Grundlegendes

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) wurde 1946 von Bloch und Purcell [9, 10] entdeckt und hat sich seitdem zu einem der wichtigsten experimentellen Hilfsmittel für Physiker, Chemiker, Biologen und Mediziner entwickelt. Die NMR basiert auf der sogenannten Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus von Atomkernen mit Spinquantenzahl $I > 0$ in einem externen Magnetfeld in $2I + 1$ Niveaus [11]. Im Rahmen

dieser Arbeit wird ausschließlich die Zeeman-Aufspaltung von Wasserstoffkernen mit der Spinquantenzahl $I = 1/2$ betrachtet. Ihre Energiezustände spalten im Magnetfeld der Stärke B_0 in zwei Niveaus auf, wobei die Energiedifferenz der Niveaus mit dem kernspezifischen gyromagnetischen Verhältnis γ und dem Planck'schen Wirkungsquantum \hbar gegeben ist durch

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 . \quad (2.1)$$

Der Spin eines Kerns ist an ein magnetisches Moment $\vec{\mu} = \gamma\vec{I}$ gekoppelt. Auf dieses magnetische Moment $\vec{\mu}$ wirkt im Magnetfeld ein Drehmoment, wodurch das magnetische Moment eine Präzessionsbewegung mit der Larmorfrequenz

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (2.2)$$

um die z-Achse des Magnetfeldes ausführt. Die z-Achse des verwendeten Koordinatensystems ist dabei i.A. so orientiert, dass sie parallel zu den Feldlinien des B_0 -Feldes liegt. Die Summe aller magnetischen Momente $\vec{\mu}$ pro Volumen wird als Magnetisierung \vec{M} bezeichnet. Im Gleichgewichtszustand zur Zeit $t = 0$ im magnetischen Feld $B_0 = (0, 0, B_z)$ besitzt dieser Vektor nur eine longitudinale Komponente $M_z(t = 0) = M_0$.

Durch Einstrahlung von Radiofrequenz(RF)-Strahlung der Amplitude B_1 und Frequenz ω_{rf} können Übergänge zwischen den Zeeman-Niveaus angeregt werden, wenn das Radiofrequenzfeld longitudinale Komponenten enthält. Für die Zeit der RF-Einstrahlung präzidiert die Magnetisierung dadurch im rotierenden Koordinatensystem¹ mit der Kreisfrequenz $\omega_1 = \gamma B_1$ um eine effektive Feldrichtung, die nicht mehr parallel zu B_0 ist. Der Magnetisierungsvektor erhält dadurch transversale Komponenten, die auch nach einem Ausschalten der RF-Strahlung erhalten bleiben. Die Größe der transversalen Komponenten hängt dabei von der Pulsdauer, der Pulsleistung und der Frequenzdifferenz $\omega_{rf} - \omega_0$ ab. Die transversalen Komponenten werden maximal, wenn der Magnetisierungsvektor vollständig in die Transversalebene gedreht wird. Ein Puls, der dies erreicht, wird dementsprechend als 90° - bzw. $\pi/2$ -Puls bezeichnet. In analoger Weise kann die Magnetisierung auch invertiert werden, das heißt man erhält die Magnetisierung $M_z = -M_0$ bei verschwindenden Transversalkomponenten. Ein RF-Puls, der dies erreicht, wird als 180° - bzw. π -Puls bezeichnet. Der Winkel, um den die Magnetisierung von der Ausrichtung entlang der z-Achse durch einen RF-Puls ausgelenkt wird, wird allgemein als Flipwinkel bezeichnet.

Sobald der Magnetisierungsvektor nach Auslenkung durch einen RF-Puls kohärente transversale Komponenten enthält, induziert der vom präzedierenden Magnetisierungsvektor resultierende Kreisstrom eine Wechselspannung mit der Larmorfrequenz in einer Spule, die meistens auch zum Senden des RF-Pulses verwendet wird. Die induzierte Spannung zerfällt exponentiell, da die transversalen Magnetisierungskomponenten ihre Kohärenz verlieren. Diese exponentiell abklingende Induktionsspannung in der Spule wird FID (*Free Induction Decay*) genannt. Die Spannung ist sehr klein (Größenordnung $\approx 1 \mu\text{V}$) und verschwindet unter

¹Das rotierende Koordinatensystem vereinfacht die Beschreibung der zeitlichen Entwicklung der Magnetisierung unter dem Einfluss zeitabhängiger Magnetfelder, da es mit der Frequenz der RF-Strahlung um die z-Achse rotiert.

Umständen im thermischen Rauschen. Daher ist es oft notwendig, Experimente mehrfach zu wiederholen und die Signale zu addieren. Da die Stärke des FIDs linear mit der Anzahl an Einzelmessungen (n) anwächst, wohingegen das Rauschen nur proportional zu \sqrt{n} anwächst, ist so eine Verbesserung des Signal zu Rausch Verhältnisses (SNR) möglich.

Mit einer Fouriertransformation des FIDs erhält man ein Spektrum aller in ihm vorhandenen Frequenzen. Kerne in unterschiedlicher molekularer Umgebung besitzen aufgrund der Abschirmung des B_0 -Feldes durch die Elektronen eine leicht unterschiedliche Larmorfrequenz. Dieser Effekt wird chemische Verschiebung genannt. Anhand der chemischen Verschiebung lassen sich im Frequenzspektrum also verschiedene Substanzen, Moleküle oder Atompositionen unterscheiden, was die NMR für die chemische Strukturaufklärung interessant macht.

Relaxation und Spin-Echos

Nachdem die Magnetisierung durch einen RF-Puls aus ihrer Gleichgewichtslage ausgelenkt wurde, relaxiert sie in diese zurück. Dabei werden zwei Relaxationsmechanismen unterschieden, die im Folgenden beschrieben werden.

Bringt man eine Probe mit Spin $I = 1/2$ in ein Magnetfeld oder erzeugt man aus dem Gleichgewichtszustand mit einem idealen 90° -Puls transversale Magnetisierung, dann sind anfangs beide Energiezustände gleich stark besetzt und $M_z = 0$. Dies ist allerdings nicht der Gleichgewichtszustand $M_z = M_0$. Die Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 ist proportional zu dem Boltzmannfaktor:

$$M_0 \propto \exp\left(-\frac{\hbar\gamma B_0}{k_B T}\right) = \frac{N_\beta}{N_\alpha}. \quad (2.3)$$

Dabei sind N_α und N_β die Besetzungszahlen des energetisch niedrigeren bzw. höheren Niveaus im Gleichgewicht, k_B ist die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Für ein Magnetfeld von 14,1 T bei Zimmertemperatur ergibt sich ein Besetzungszahlenverhältnis von 0,9999. Die Tatsache, dass dieses Verhältnis sehr nahe bei 1 liegt, erklärt auch die geringe Empfindlichkeit der NMR. Das Besetzungszahlenverhältnis nähert sich exponentiell dem Gleichgewichtswert, wodurch M_z nach Einbringen der Probe in ein Magnetfeld oder nach Auslenkung der Magnetisierung aus der Gleichgewichtslage ebenfalls exponentiell anwächst und für $t \rightarrow \infty$ die Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 erreicht. Dieser Prozess wird durch die Zeitkonstante T_1 beschrieben. Für die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung ergibt sich empirisch:

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right). \quad (2.4)$$

Die Energie in Form von Wärme zur Erlangung der Gleichgewichtsmagnetisierung stammt aus der Umgebung bzw. dem Gitter bei Festkörpern, weshalb dieser Prozess Spin-Gitter Relaxation genannt wird. Andere gebräuchliche Namen sind longitudinale Relaxation oder T_1 -Relaxation.

Nach Auslenkung aus der Gleichgewichtslage besitzt der Magnetisierungsvektor wie zuvor beschrieben transversale Komponenten und präzediert um die z-Achse. Diese transversalen Komponenten der Magnetisierung zerfallen ebenfalls exponentiell mit der Zeitkonstanten T_2

nach dem empirischen Gesetz

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0)e^{-t/T_2} . \quad (2.5)$$

Dieser Relaxationsprozess wird als Spin-Spin-Relaxation, transversale Relaxation oder T_2 -Relaxation bezeichnet. Es gibt verschiedene Ursachen für diesen Relaxationsprozess, wobei zwischen homogenen und inhomogenen Beiträgen unterschieden wird. Zu den inhomogenen Beiträgen zählen die Magnetfeldinhomogenitäten und die chemische Verschiebung. Ihr Beitrag wird als T_2' bezeichnet. Homogene Beiträge sind hauptsächlich die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen benachbarter Kerne, welche auch als natürliche Beiträge (T_2) bezeichnet werden. Im Allgemeinen verläuft die (natürliche) transversale Relaxation schneller als die longitudinale Relaxation. Dies ist bei Protonen hauptsächlich auf die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zurückzuführen. Ein Spin kann seine Polarisation auf einen anderen Spin in seiner Umgebung übertragen. Da hierbei die Phaseninformation nicht erhalten bleibt, führt dies zu einer Dephasierung der Magnetisierung. In Abschnitt 8.2.1 findet sich eine genauere quantitative Beschreibung der Relaxation.

Die homogenen und inhomogenen Beiträge der Relaxationsraten addieren sich zu einem sogenannten T_2^* , welches charakteristisch für den Zerfall des FIDs und somit für die Linienbreite im Spektrum ist:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2'} + \frac{1}{T_2} . \quad (2.6)$$

Die inhomogenen Beiträge, welche meistens den größten Einfluss auf den Zerfall der Magnetisierung haben, können durch einen 180° -Puls refokussiert werden [12]: Unmittelbar nach Auslenkung der Magnetisierung aus der Gleichgewichtslage präzedieren alle Spins mit der gleichen Phase um die z-Achse. Aufgrund der Magnetfeldinhomogenitäten besitzen Spins an verschiedenen Orten innerhalb der Probe unterschiedliche Larmorfrequenzen. Sie präzedieren also mit verschiedenen Geschwindigkeiten um die z-Achse und geraten so nach und nach außer Phase. Diese Dephasierung führt zu einer Auffächerung der transversalen Komponenten des Magnetisierungsvektors bzw. steigender Dekohärenz und damit zum Zerfall der transversalen Gesamtmagnetisierung. Durch einen π -Puls, der nach einer Zeitdauer τ nach der Anregung auf die Probe wirkt, wird effektiv die Umlaufrichtung der einzelnen Magnetisierungsvektoren umgedreht. Dadurch laufen die zuvor auseinander gedrifteten Magnetisierungsvektoren wieder zusammen und geraten nach der Echozeit $T_E = 2\tau$ wieder in Phase. Dadurch bildet sich ein Spin-Echo (auch Hahn-Echo genannt). Die Amplitude dieses Echos hängt in der Form

$$S(T_E) = S(0)e^{-T_E/T_2} \quad (2.7)$$

von der Echozeit und dem natürlichen T_2 ab und bildet dadurch die Grundlage für Experimente zur Messung der transversalen Relaxationszeit. Weiterhin bilden die Spin-Echos auch die Grundlage für Messungen der Diffusionskonstanten und vieler Verfahren in der bildgebenden NMR.

2.2. Bildgebende NMR

Zur Erreichung einer räumlichen Auflösung in der NMR kann nach Lauterbur die Magnetfeldabhängigkeit der Larmorfrequenz genutzt werden [7]. Überlagert man das statische Magnetfeld B_0 mit einem Magnetfeldgradienten \vec{G} , so wird die Larmorfrequenz ortsabhängig und das resultierende NMR-Spektrum entspricht der Projektion der Magnetisierung $M(\vec{r})$ auf die der Richtung des Gradienten entsprechende Ortsachse [13].

Der Magnetfeldgradient ist im Allgemeinen ein Tensor 2. Stufe, wobei die Tensorelemente die räumliche Abweichung vom statischen Magnetfeld B_0 beschreiben. Wenn man davon ausgeht, dass das zusätzliche Feld des Gradienten klein gegenüber dem statischen Feld ist, kann der Tensor zu einem Vektor vereinfacht werden, der nur die Elemente des Tensors beinhaltet, die entlang von B_0 wirken:

$$\vec{G} = \left(\frac{\partial B_z}{\partial x}, \frac{\partial B_z}{\partial y}, \frac{\partial B_z}{\partial z} \right) = (G_x, G_y, G_z). \quad (2.8)$$

Für die Larmorfrequenz eines Spins am Ort \vec{r} bei Anwesenheit eines Gradienten gilt folgender Zusammenhang:

$$\omega_0(\vec{r}) = -\gamma(B_0 + \vec{G} \cdot \vec{r}). \quad (2.9)$$

Betrachtet man das Zeitsignal $S(\vec{G}, t)$ aus einem Volumen V der Probe mit der ortsabhängigen Magnetisierung $M(\vec{r})$ in Abhängigkeit von der Gradientenstärke im rotierenden Koordinatensystem, so gilt

$$\begin{aligned} S(\vec{G}, t) &= \int_V M(\vec{r}) e^{-i\omega t} dV \\ &= \int_V M(\vec{r}) e^{i\gamma \vec{G} \cdot \vec{r} t} dV. \end{aligned} \quad (2.10)$$

Führt man nun den Wellenvektor $\vec{k} = \gamma \vec{G} t$ ein, so gelangt man zu

$$S(\vec{k}) = \int_V M(\vec{r}) e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} dV. \quad (2.11)$$

Hier erkennt man, dass das Zeitsignal im \vec{k} -Raum der (inversen) Fouriertransformation der ortsabhängigen Magnetisierung entspricht. Durch eine Fourier-Rücktransformation des Zeitsignals erhält man somit eine Projektion der Magnetisierung auf die Ortsachse \vec{r} .

2.2.1. Zweidimensionale Ortskodierung

Um ein zweidimensionales NMR-Bild zu erhalten ist es nötig, verschiedene Verfahren der Ortskodierung zu kombinieren. Erfolgt die Datenaufnahme eines Echos bei einem aktiven Gradienten, so erhält man als Zeitsignal nach Glg. 2.11 die Projektion der fouriertransformierten Magnetisierung entlang der Raumrichtung des Gradienten. Man spricht hierbei

von Frequenzkodierung. Eine andere Möglichkeit zur Ortskodierung bietet die Phasenkodierung. Dabei wird vor der Datenaufnahme während der Evolution der Magnetisierung ein zum Frequenzkodiergradienten (welcher auch als Lesegradient bezeichnet wird) orthogonaler Phasenkodiergradient der Dauer τ_{phase} und Stärke G_{phase} geschaltet. Durch diesen Phasenkodiergradienten erhält die Magnetisierung den Phasenfaktor

$$\varphi(\vec{r}) = \gamma \vec{r} \vec{G}_{phase} \tau_{phase} , \quad (2.12)$$

wodurch sich das Zeitsignal des Echos im \vec{k} -Raum verändert zu:

$$S(\vec{k}) = \int_V M(\vec{r}) e^{i(\vec{k}\vec{r} + \varphi(\vec{r}))} dV . \quad (2.13)$$

Die Rekonstruktion eines zweidimensionalen Bildes wird dadurch ermöglicht, dass eine Reihe von Echos in Anwesenheit von Lesegradienten aufgenommen wird, wobei die Stärke des Phasenkodiergradienten bei konstantem Frequenzkodiergradienten 2^n mal inkrementiert wird. Diese Methode wird als Spinwarp- oder Spin-Echo-Bildgebung bezeichnet. Durch eine zweidimensionale Fouriertransformation des \vec{k} -Raums wird so ein zweidimensionales Abbild der Magnetisierung erhalten.

2.2.2. Schichtselektion

Zur Erlangung einer Ortsauflösung in einer dritten Dimension kann eine Schichtselektion verwendet werden. Durch die Anregung mit einem selektiven Puls in Anwesenheit eines Schichtselektionsgradienten G_{slice} können gezielt Spins in bestimmten räumlichen Bereichen angeregt werden. Zur selektiven Anregung werden die Pulse meistens mit einer sinc-Funktion moduliert. Die sinc-Funktion ist definiert über

$$\text{sinc}(t) = \frac{\sin(t)}{t} \quad (2.14)$$

und ist sehr gut für eine selektive Anregung geeignet, da ihre Fouriertransformierte eine Rechteckfunktion ist. Durch einen sinc-Puls werden also nur die Spins angeregt, deren Larmorfrequenz in das Frequenzfenster $\omega_L = \omega_0 \pm \frac{2\pi\Delta\nu}{2}$ fällt. Dabei bezeichnet $\Delta\nu$ die Bandbreite des sinc-Pulses, welche proportional zu der inversen Zeitdauer des Pulses ist. Wird ein solcher sinc-Puls gleichzeitig mit einem Gradienten der Stärke G_{slice} geschaltet, so ergibt sich für die angeregte Schichtdicke entlang der Gradientenrichtung

$$\Delta z \approx \frac{2\pi\Delta\nu}{\gamma G_{slice}} . \quad (2.15)$$

Die Lage der Schicht entlang der Gradientenachse wird durch Variation der Pulsträgerfrequenz ω_0 eingestellt.

2.2.3. Die Spin-Echo-Bildgebungssequenz

Kombiniert man die Schichtselektion mit der zweidimensionalen Ortskodierung, ergibt sich die in Abb. 2.1 dargestellte typische Spin-Echo-Bildgebungssequenz (auch Spinwarp-Sequenz genannt). Da diese Sequenz in der Regel die beste Bildqualität liefert ist sie eine der am

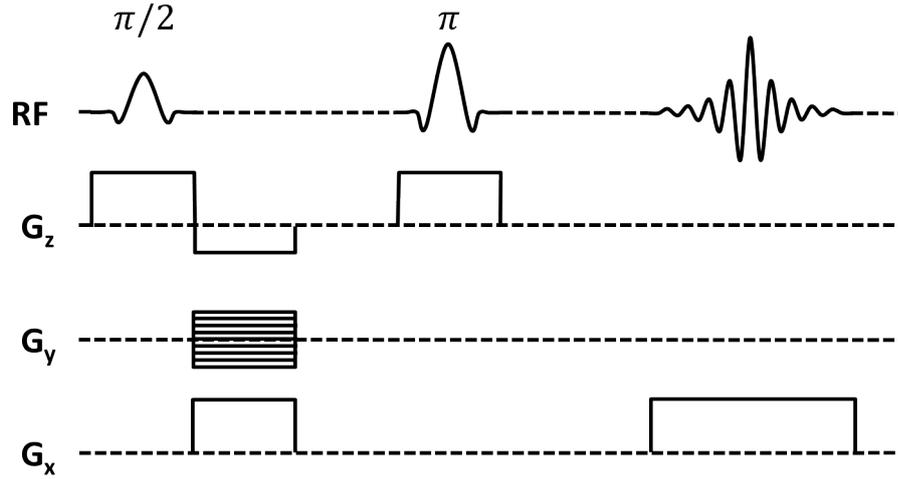


Abbildung 2.1.: Spin-Echo-Pulssequenz zur Durchführung der bildgebenden NMR.

häufigsten verwendeten Bildgebungssequenzen in der klinischen MRT und wurde mit kleinen Modifikationen auch im Rahmen dieser Arbeit für viele Messungen verwendet. Hier erzeugt ein initialer 90° -sinc-Puls in Anwesenheit eines Schichtselektionsgradienten transversale Magnetisierung in einer bestimmten Schicht entlang der z-Achse. Nach der selektiven Anregung wird ein Kompensationsgradient mit umgekehrtem Vorzeichen gegenüber dem Schichtselektionsgradienten geschaltet. Dieser hat die Funktion, die während der selektiven Anregung durch den Schichtselektionsgradienten dephasierete Magnetisierung zu rephasieren. Da die Dephasierung in erster Näherung erst einsetzt, wenn der sinc-Puls seine maximale Amplitude erreicht, muss das Integral des Kompensationsgradienten der Hälfte des Integrals des Schichtselektionsgradienten entsprechen. Gleichzeitig mit dem Kompensationsgradienten wird auch ein Gradient in x-Richtung geschaltet. Dieser dient als Rephasierungsgradient für die erste Hälfte des Lesegradienten, der während der Datenaufnahme des Echos geschaltet wird, um eine Ortsauflösung in x-Richtung zu erhalten. Aufgrund der Trennung der De- und Rephasierung durch einen 180° -Puls besitzen die Gradienten hier das gleiche Vorzeichen. Der zusätzlich auch noch aktive y-Gradient dient als Phasenkodiergradient. Die transversale Magnetisierung wird im Abstand $T_E/2$ zum 90° -Puls durch einen schichtselektiven 180° -Puls refokussiert, so dass sich im Abstand T_E zum 90° -Puls ein Echo bildet. Dieses Echo wird bei einem aktiven Lesegradienten detektiert. Für die Ortskodierung in y-Richtung ist es notwendig, dass die Pulssequenz mehrfach mit unterschiedlich starken Phasenkodiergradienten durchlaufen wird, wodurch jedes Echo einen anderen Phasenfaktor erhält. Die Zeitdauer zwischen den Anregungen durch $\pi/2$ -Pulse wird dabei als Repetitionszeit T_R bezeichnet (siehe Abbildung 2.2).

In den mit einer Spinwarp-Sequenz aufgenommenen NMR-Bildern gilt für die Signalamplitude $S(\vec{r})$ in erster Näherung der Zusammenhang

$$S(\vec{r}) = S_0(\rho(\vec{r})) \cdot e^{-\frac{T_E}{T_2(\vec{r})}} \cdot \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1(\vec{r})}}\right) \cdot f(D(\vec{r})) . \quad (2.16)$$

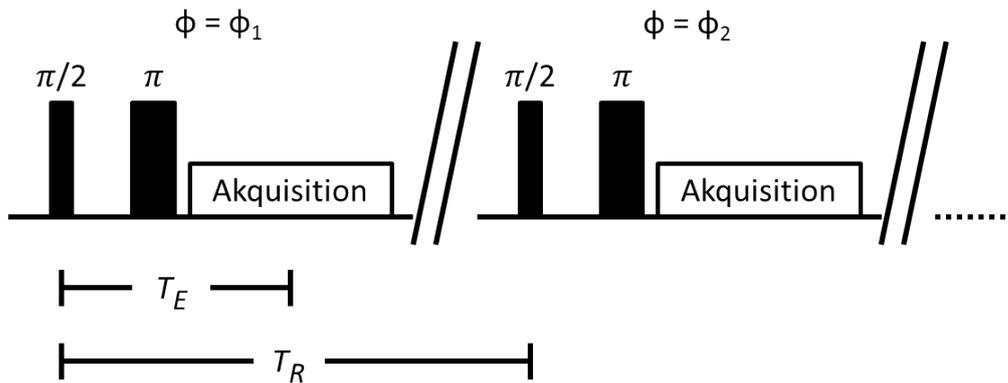


Abbildung 2.2.: Schemenhafte Darstellung zum Timing von Spin-Echo Bildgebungs-Experimenten (ohne Gradienten).

Dabei stellen $\rho(\vec{r})$ und $D(\vec{r})$ die ortsabhängigen Spindichten bzw. Diffusionskonstanten dar. Durch eine geeignete Wahl der Bildgebungs-Parameter T_E und T_R lassen sich somit Kontraste in den NMR-Bildern erzeugen, die mit den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Probe zusammenhängen. Wenn es erwünscht ist, ein reines Abbild der Spindichte zu erhalten, wählt man beispielsweise $T_R \gg T_1$ und $T_E \ll T_2$. Will man ein Bild aufnehmen, das Kontrast zwischen Bereichen mit unterschiedlichen Relaxationszeiten aufzeigt, so wählt man $T_R \approx T_1$ (T_1 -Gewichtung) bzw. $T_E \approx T_2$ (T_2 -Gewichtung).

2.2.4. Auflösung und „field of view“

Der nach einer zweidimensionalen Fouriertransformation des Datensatzes abgebildete Bildausschnitt wird als *FOV* (*field of view*) bezeichnet. Für die Frequenzkodierung ergibt sich das *FOV* folgendermaßen:

$$FOV_{freq} = \frac{2\pi}{\gamma G_{read} \Delta t} . \quad (2.17)$$

Dabei bezeichnet Δt die Abtastrate, also den Zeitabstand zwischen zwei digitalen Datenpunkten der Echoaufnahme. Bei der Phasenkodierung ergibt sich das *FOV* zu

$$FOV_{phase} = \frac{2\pi}{\gamma \Delta G_{phase} \tau_{phase}} . \quad (2.18)$$

ΔG_{phase} ist hier die Schrittweite der Gradienteninkrementierung, und somit maßgebend für das *FOV*, da τ_{phase} meistens konstant ist.

Die digitale Auflösung des Bildes ist definiert als

$$\Delta x = \frac{FOV}{N} . \quad (2.19)$$

Im Falle der Phasenkodierung entspricht N hier der Anzahl an Gradienteninkrementen. Bei der Frequenzkodierung entspricht N der Akquisitionslänge. Eine Verbesserung der Auflösung in der Dimension der Phasenkodierung bei konstantem *FOV* geht also immer mit einer Erhöhung der Messzeit einher. So benötigt man beispielsweise für eine Verdoppelung der

transversalen Auflösung in der Ebene eine 16-fach höhere Anzahl an Akkumulationen, um ein identisches SNR zu erhalten. Durch ein *zero-filling*, d. h. eine Vergrößerung des \vec{k} -Raums durch symmetrische Addition von Nullen am Rand, kann die digitale Auflösung ohne den Nachteil einer längeren Messzeit verbessert werden, was in gewissen Grenzen zu einer Steigerung der Bildqualität führt [14].

Neben der digitalen Auflösung spielt die physikalische Auflösung eine wichtige Rolle. Die physikalische Auflösung wird einerseits durch Eigenschaften der Probe wie die T_2 -bedingte Linienbreite, der chemischen Verschiebung, den Diffusionsprozessen oder Suszeptibilitätsunterschieden begrenzt. Andererseits haben auch instrumentelle Faktoren wie Magnetfeldinhomogenitäten, RF-Inhomogenitäten, Nichtlinearitäten der Gradienten und das Signal/Rausch-Verhältnis einen begrenzenden Einfluss auf die Auflösung. Liegen die digitalen Auflösungen in der Größenordnung von $10\ \mu\text{m}$, dann ist hauptsächlich das Signal zu Rausch Verhältnis (SNR) der begrenzende Faktor für die physikalische Auflösung [15]. Das SNR lässt sich jedoch durch eine Akkumulation vieler Messungen pro Phasenkodierschritt erhöhen. Daher wird die physikalische Auflösung im Folgenden vernachlässigt und stets die digitale Auflösung der Bilder angegeben.

2.2.5. Hier verwendete Verfahren zur schnellen Bildgebung

Die Aufnahme von NMR-Bildern mit Spin-Echo-Sequenzen benötigt meistens relativ lange Messzeiten. Um beispielsweise ein Bild der Auflösung $10\ \mu\text{m}$ bei einem FOV von $6\ \text{mm}$ aufzunehmen, sind bei einer 4-fachen Signalakkumulation und einer Repetitionszeit von $5\ \text{s}$ fast 3 Stunden nötig. Zur Ermöglichung schnellerer Bildaufnahmen und zur Vermeidung von Bewegungsartefakten sowie der Erhöhung der zeitlichen Auflösung sind daher Verfahren zur schnellen Bildgebung notwendig.

Mehrschichtbildgebung

Die Maximierung der Signalamplitude in NMR-Bildern erfordert, dass meistens Repetitionszeiten verwendet werden, die der drei- bis fünffachen longitudinalen Relaxationszeit entsprechen. Da T_1 oft in der Größenordnung von einer Sekunde liegt, wird die Aufnahme eines Bildes bei hoher Auflösung entsprechend zeitaufwendig. Wenn es erwünscht ist, dass die Bildaufnahme in mehreren parallelen Schichten einer Probe erfolgen soll, bietet die Mehrschichtbildgebung eine Möglichkeit zur Reduzierung der Gesamtmesszeit. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Repetitionszeiten meistens sehr viel länger sind als die Echozeiten. Da die Magnetisierungen nur in den angeregten Schichten relaxieren, können innerhalb der Repetitionszeit weitere Schichten angeregt werden und von ihnen Bilder aufgenommen werden. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass sich benachbarte Schichten nicht überlappen. Dies ist allerdings aufgrund der Pulsimperfectionen nicht zu erreichen. Mit einer durchdachten Abfolge der Schichtanregungen, bei der benachbarte Schichten mit maximalem zeitlichen Abstand angeregt werden, lassen sich die Überlappungen jedoch minimieren.

FLASH-Bildgebung

Eine weitere Methode zur Minimierung der Aufnahmedauer ist die Verwendung von kleinen Flipwinkeln zur Anregung der Magnetisierung [16]. Diese Methode wird auch häufig in der

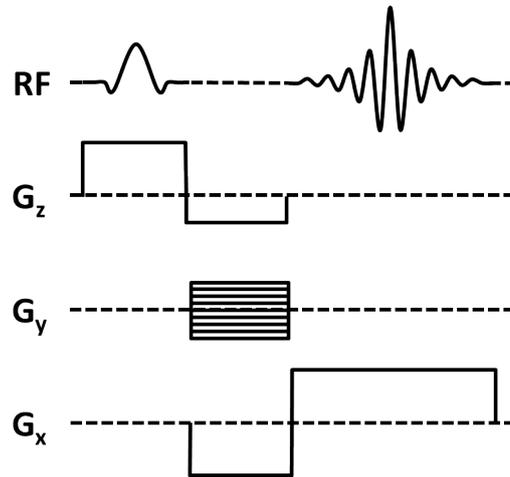


Abbildung 2.3.: FLASH-Pulssequenz zur schnellen Durchführung der NMR-Bildgebung.

klinischen NMR-Bildgebung verwendet und als FLASH (*Fast Low Angle Shot*) bezeichnet. Hier wird die Reduzierung der Messzeit dadurch erreicht, dass sehr kurze Repetitionszeiten verwendet werden. Wie schon erwähnt, führen kurze Repetitionszeiten zu einer Abschwächung der Signalamplitude, da die Magnetisierungen nicht vollständig relaxieren können. Diese unvollständige Relaxation kann jedoch dadurch umgangen werden, dass die Magnetisierungen bei der Anregung mit Flipwinkeln $\theta < 90^\circ$ angeregt werden. Da die longitudinale Magnetisierung in diesem Fall nach der Auslenkung nicht verschwindet, verläuft ihr Wiederaufbau entsprechend schneller. Für beliebige Flipwinkel ergibt sich für die Signalamplitude in Abhängigkeit von der Repetitionszeit und der longitudinalen Relaxationszeit unter Vernachlässigung der transversalen Relaxation die sogenannte Ernstformel [17]:

$$S = S_0 \cdot \frac{1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}}{1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}} \cos \theta} \sin \theta . \quad (2.20)$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich der Flipwinkel, für den die Signalamplitude bei gegebener Repetitionszeit maximal wird:

$$\cos \theta = e^{-\frac{T_R}{T_1}} . \quad (2.21)$$

Um möglichst kurze Repetitionszeiten erreichen zu können, wird bei der FLASH-Bildgebung auf die Erzeugung von Spin-Echos verzichtet. Stattdessen werden Gradientenechos erzeugt, wodurch sich eine hohe Sensitivität der Bildgebung gegenüber Magnetfeldinhomogenitäten ergibt und die Bilder somit T_2^* -gewichtet sind. Die vollständige FLASH-Bildgebungssequenz ist in Abb. 2.3 dargestellt.

3. Mikrokapseln

Dieses Kapitel dient dazu, die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben vorzustellen. Dazu werden die Gründe für das Studium der hier verwendeten Art von Mikrokapseln motiviert und weiterhin wird eine Beschreibung der Kapselmaterialien und -Herstellung dargeboten. Diese Darstellungen basieren dabei zum Teil auf früheren Ausführungen in meiner Diplomarbeit [8] und auf der sehr viel ausführlicheren Beschreibung der Mikrokapseln in der Dissertation von Dr. Sabine Leick [18].

3.1. Grundlegendes und Motivierendes zur Mikroverkapselung

Unter Mikroverkapselung versteht man die Technologie des Verpackens von flüssigen, festen oder gasförmigen Materialien in kleine, abgedichtete Kapseln, die ihren Inhalt kontrolliert und unter Einfluss spezifischer Voraussetzungen freisetzen [2]. Die dazu verwendeten Mikrokapseln bestehen im Allgemeinen aus einer semipermeablen, sphärischen, dünnen und festen Membran, die einen festen (Matrixkapsel, Vollkapsel oder Bead) oder flüssigen Kern (Hohlkapsel) umschließt [1]. Die Durchmesser dieser Kapseln umfassen die Größenordnungen von einigen Mikrometern bis hin zu wenigen Millimetern. Um den Einsatz in der Lebensmitteltechnik oder in der Pharmazie zu ermöglichen, müssen die Kapselmaterialien verschiedene Anforderungen erfüllen. Dazu zählen die biologische Abbaubarkeit, Ungiftigkeit, Biokompatibilität, Genießbarkeit und die Basierung auf natürlichen Rohstoffen [19]. Zusätzlich wären zur Herstellung der Kapseln milde Reaktionsbedingungen und niedrige Temperaturen von Vorteil. Diese Anforderungen werden beispielsweise von den hier verwendeten Biopolymeren Pektinat und Alginat erfüllt.

Mikrokapseln besitzen vielseitige Anwendungsmöglichkeiten. Sie dienen unter anderem in der pharmazeutischen Industrie und der Lebensmitteltechnik als „Drug-Delivery-Systeme“ zur Speicherung und dem Schutz von empfindlichen Stoffen, übernehmen den Transport von speziellen Substanzen zu bestimmten Wirkorten und werden für die dosierte Freigabe von Medikamenten eingesetzt [20]. Der Schutz und die Freisetzung des Wirkstoffes hängen dabei von der chemischen und mechanischen Stabilität der Membran und ihrer Durchlässigkeit für Wirk- und Schadstoffe ab [21]. Des Weiteren bieten Mikrokapseln eine vielversprechende Möglichkeit zur immunoisolierten Transplantation menschlicher Zellen bei der Behandlung von Krankheiten wie Diabetes und Parkinson [22].

Die hier verwendeten Kapseln sollen dem Zweck dienen, Wirkstoffe gezielt zum Darm zu transportieren und sie dort freizusetzen. Zur Freisetzung aus Mikrokapseln existieren verschiedene Wege, wie beispielsweise das mechanische Zerbrechen, die Diffusion durch die Kapselhülle, das Auflösen der Membran unter Einwirkung von Enzymen oder Säuren/Basen und der osmotische Druck [1, 23]. Von den genannten Mechanismen wird hier die pH-gesteuerte Freisetzung

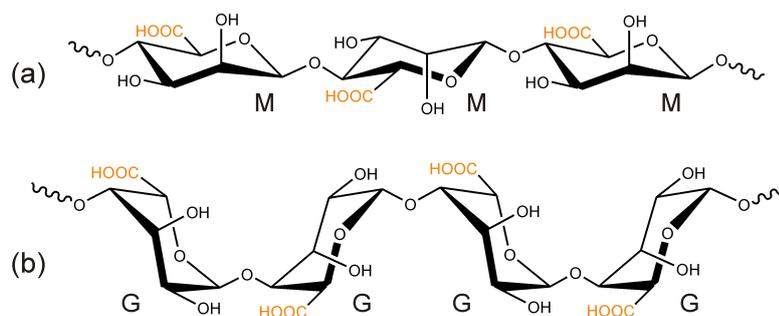


Abbildung 3.1.: Chemische Struktur der Mannuronsäure-Blöcke (a) und Guronsäure-Blöcke (b) der Alginsäure [18].

verwendet, da im Magen-Darm-Trakt ein großer Gradient des pH-Werts von $\text{pH} = 1$ im Magen bis $\text{pH} = 7,5$ im Enddarm vorliegt. In pharmazeutischen Produkten werden für diesen Zweck häufig magensaftresistente Acrylpolymere verwendet. Da die hier verwendeten Kapseln für den Einsatz im Lebensmittelbereich angedacht sind, können die für die Anwendung in Lebensmitteln nicht zugelassenen Acrylpolymere jedoch nicht verwendet werden [24].

Für den Einsatz der Kapseln in Lebensmitteln wird hier daher auf natürliche Polysaccharide als Grundstoff der Kapseln zurückgegriffen. Im speziellen werden die Polysaccharide Pektin und Alginat verwendet, da sie ein ausgezeichnetes Geliervermögen besitzen und unter sehr milden chemischen Bedingungen zu verarbeiten sind. Da gelierte Polysaccharide jedoch eine hohe Durchlässigkeit für kleine bis mittelgroße Moleküle aufweisen [25], müssen die Kapseln mit zusätzlichen Materialien beschichtet werden, um so ihre Durchlässigkeit zu vermindern. Typische Beschichtungsmaterialien sind beispielsweise Eudragite, Chitosan oder Poly-L-Lysin [24, 26, 27]. Hier wird allerdings auf das natürliche Polymer Schellack zurückgegriffen, welches bereits als Beschichtungsmaterial für die darmspezifische Freisetzung in der Medizin- und Lebensmitteltechnik eingesetzt wird [28, 29]. Die Anwendbarkeit des Schellacks zur Beschichtung basiert hier auf seiner Eigenschaft der pH-abhängigen Präzipitation, wodurch er im sauren Milieu des Magens eine feste Ummantelung bildet und sich im basischen Bereich des Darms auflöst.

3.2. Materialien der Kapseln

Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Kapseln besitzen meistens einen flüssigen Kern, der von einer Hülle (Kapselwand, Membran) aus den gelierten Polysacchariden Pektin oder Alginat umgeben ist. Weiterhin findet sich auf vielen der hier verwendeten Kapseln eine weitere externe Schicht aus dem Beschichtungsmaterial Schellack. Auf die Eigenschaften der verwendeten Materialien wird im Folgenden eingegangen.

3.2.1. Alginat

Alginat, die Salze der Alginsäure, sind Hauptbestandteile der Zellwände von Braunalgen und werden auch aus diesen für industrielle Zwecke gewonnen. Alginat ist ein lineares Copolymer von 1,4-verlinkter β -D-Mannuronsäure (M) und 1,4-verlinkter α -L-Guronsäure (G) [30].

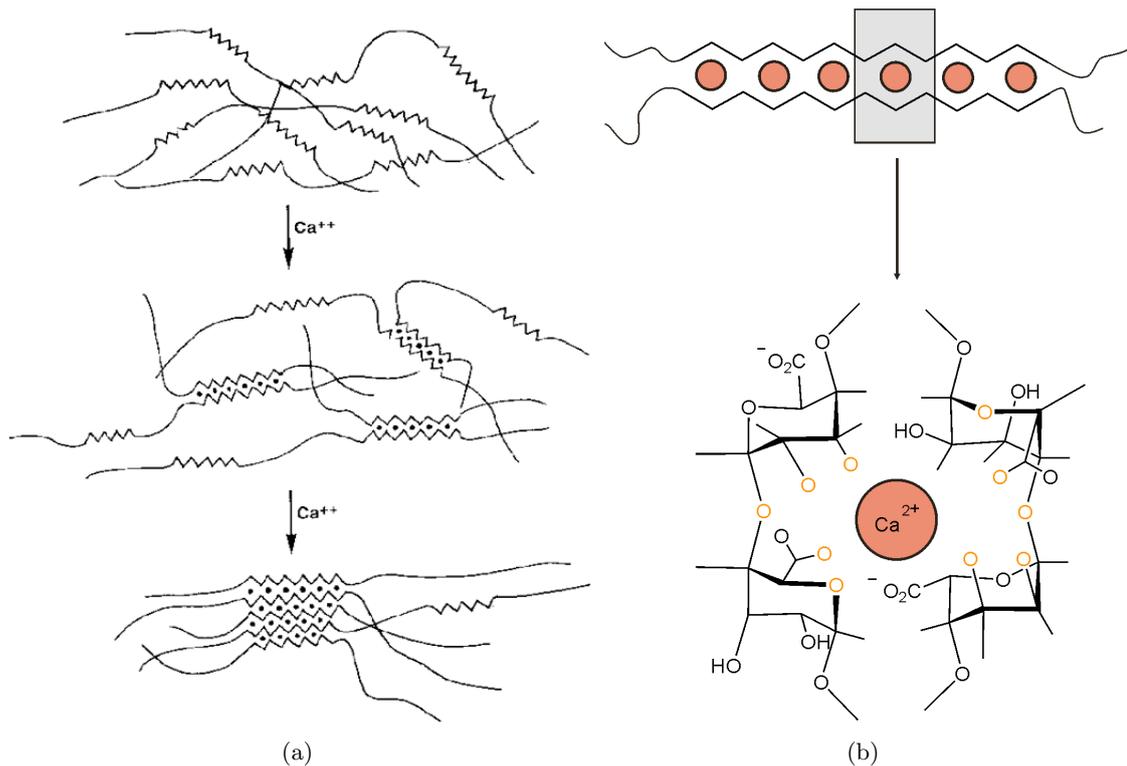


Abbildung 3.2.: Vereinfachte Darstellung der Calciumalginat-Gelbildung [32] (a) sowie schematische Darstellung der Calcium-Koordination nach dem „egg-box“-Modell [18](b).

Diese beiden Uronsäuren sind in heteropolymeren (MG) und homopolymeren Blöcken (MM oder GG) angeordnet. Die GG-Blöcke bilden eine Zick-Zack-Struktur, wohingegen die MM- und MG-Blöcke linear angeordnet sind (siehe Abb. 3.1). Als Salz mit einwertigen Kationen wie z.B. Na^+ ist Alginat wasserlöslich. Diese Lösungen sind hochviskos und werden daher als Verdickungsmittel in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt. In Verbindung mit zweiwertigen Kationen wie z.B. Ca^{2+} geliert Alginat zu einem ionotropen Hydrogel.

Diese Gelierung, das heißt die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes, beruht auf der Einlagerung der zweiwertigen Kationen in die Zick-Zack-Struktur der GG-Blöcke. Kommt Alginat in Kontakt mit gelösten Calcium-Kationen, so diffundieren diese in die Zwischenräume der Alginatmakromoleküle und verdrängen dort die vorhandenen einwertigen Kationen. Die zweifache positive Ladung der Ionen ermöglicht eine Vernetzung benachbarter GG-Blöcke durch die Bildung eines Chelat-Komplexes zwischen den Sauerstoffatomen des Alginats und den Kationen, was zur Ausbildung sogenannter „egg-box“-Strukturen führt [31] (vgl. Abb. 3.2). Der Guronsäure-Anteil ist also maßgebend für die Stabilität des Gels.

Die Struktur des Gels hängt von vielen Faktoren ab, wie der Konzentration des Alginats, dem Guronsäureanteil und dem Molekulargewicht des Alginats, der Ca^{2+} -Konzentration, der Temperatur, dem pH-Wert und dem Druck [33]. Das Hydrogel hat keine homogene Struktur, sondern besitzt eine Vielzahl von Bereichen mit unterschiedlich organisierten Strukturen, deren Poren- bzw. Kapillargrößen in einem Bereich von 5 bis 200 nm variieren [34]. An der

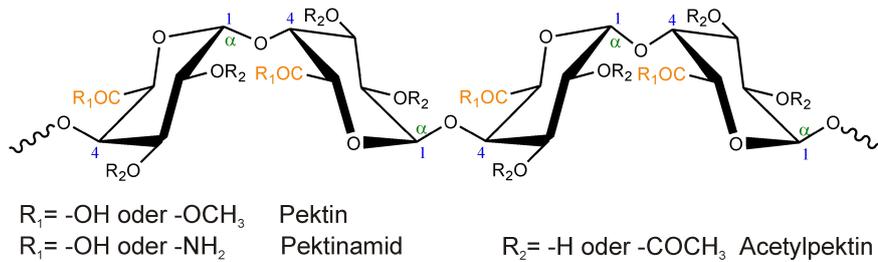


Abbildung 3.3.: Chemische Struktur des Pektins [18].

Phasengrenze zwischen der Alginatlösung und dem Elektrolyt ist die Membran am dichtesten und weist eine einheitliche Porengröße auf. In größerer Entfernung zur Phasengrenze ändert sich die Anordnung der Alginatmoleküle, womit eine Zunahme der Porengröße einhergeht und der Wassergehalt im Gel steigt. Durch die poröse Gelstruktur wird die Diffusion von Molekülen durch das Gel eingeschränkt bzw. verhindert, wobei die Stärke der Einschränkung von der Größe der diffundierenden Moleküle abhängt.

Aufgrund seiner biologischen Abbaubarkeit findet Alginat vor allem in der Kosmetik-, Pharma- und Lebensmittelindustrie Verwendung [34]. So wird Alginat in der Medizin beispielsweise zur Herstellung von Wundauflagen, chirurgischen Nahtfäden und Gebissabdrücken sowie als Hüllmaterial für Mikrokapseln verwendet. Neben der Anwendung zur kontrollierten und verzögerten Freisetzung von Wirkstoffen werden Mikrokapseln aus Alginat in der Biotechnologie zur Immobilisierung von Zellen und Enzymen eingesetzt, um Untersuchungen und Manipulationen zu vereinfachen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Möglichkeit der immunoisolierten Transplantation von Zellen und Gewebeteilen, insbesondere von Langerhans'schen Zellen bei Diabetes-Patienten oder Dopamin produzierenden Zellen bei Parkinson-Patienten [35].

3.2.2. Pektin

Pektin ist ein lineares, heterogenes Polysaccharid und ist hauptsächlich aus 1,4-glykosidisch verknüpften α -D-Galacturonsäure-Einheiten aufgebaut [36]. Wie in Abb. 3.3 zu erkennen ist, können die Carboxylgruppen des Pektins als Methylester oder Carboxamidgruppen vorliegen [37]. Je nach Grad der Veresterung unterteilt man Pektine daher in hoch- und niederveresterte Pektine. Zu finden ist Pektin in Zellwänden pflanzlicher Zellen, wo sie den Wasserhaushalt regulieren und wichtige Stütz- und Festigungsfunktionen übernehmen [38]. Ebenso wie Alginate bilden die Pektine mit zweiwertigen Kationen oder durch die Zugabe von Säure nach dem „egg-box“-Modell Hydrogele, wobei das Gelbildungsvermögen mit steigendem Molekulargewicht zunimmt und mit steigendem Veresterungsgrad abnimmt [39]. Das Gelbildungsvermögen kann weiterhin durch die Einführung von Amidgruppen gesteigert werden. Aufgrund der einfachen Gelierung des Pektins findet es als Gelier- und Stabilisationsmittel Anwendung in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie, z.B. für die Herstellung von Marmeladen und Gelees.

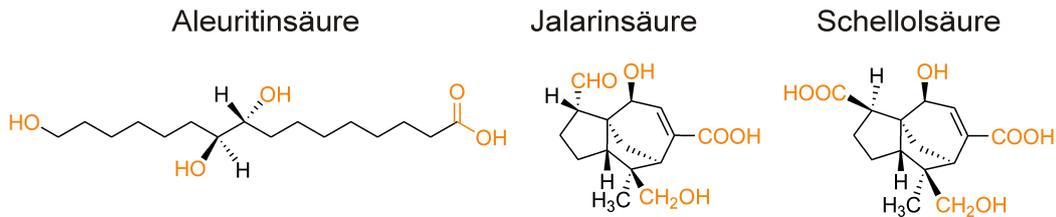


Abbildung 3.4.: Chemische Strukturen der am häufigsten in Schellack vorkommenden Carbonsäuren [18].

3.2.3. Schellack

Schellack ist ein Naturharz und besteht aus einer Mischung von aliphatischen und alizyklischen Säuren sowie ihren Polyestern [40]. Die Hauptbestandteile sind dabei die in Abb. 3.4 dargestellten Carbonsäuren Aleuritinsäure, Jalarinsäure und Schellolsäure [41]. Gewonnen wird Schellack aus den Exkrementen der in Asien vorkommenden Lackschildlaus *Kerria Lacca* [42].

Schellack löst sich sehr gut in Alkoholen, Glykolen, organischen Säuren und Aminen, wohingegen es in Wasser und Ölen üblicherweise nicht löslich ist. Durch eine Alkalizugabe oder ein Erwärmen kann die Wasserlöslichkeit jedoch deutlich erhöht werden [42]. Darauf basiert auch der Einsatz von Schellack als magensaftresistentes Überzugsmittel in der Pharmazie [29]. Im sauren Milieu des Magens löst sich der Schellack nicht auf und bleibt fest, wohingegen er sich im schwach basischen Milieu des Darms jedoch auflöst.

Da Schellack physiologisch unbedenklich sowie geruchs- und geschmacklos ist, wird es häufig als Beschichtungsmittel (beispielsweise für Kaugummis und Dragees) oder Verdunstungsschutz für Früchte in der Lebensmittelindustrie eingesetzt [43]. Neben der Anwendung im Lebensmittel- und Pharmaziesektor ist Schellack außerdem durch den Einsatz als Bindemittel in Schallplatten bekannt.

3.3. Präparation der Kapseln

3.3.1. Reine Hydrogel-Kapseln

Durch die Gelierung mit zweiwertigen Kationen lassen sich zwei verschiedene Arten von Kapseln aus den Polysacchariden Pektin und Alginat herstellen. Dies sind zum einen Matrixkapseln (auch Beads oder Vollkapseln genannt), bei denen die gesamte Kapsel aus dem gelierten Polysaccharid besteht, und zum anderen flüssig gefüllte Hohlkapseln, bei denen nur die Kapselwand aus festem Hydrogel besteht. Obwohl Matrixkapseln eine bessere mechanische Festigkeit sowie eine längere Haltbarkeit aufweisen, eignen sich flüssig gefüllte Kapseln besser zum Transport von Wirkstoffen, da dort Wechselwirkungen der Füllstoffe mit dem Verkapselungsmaterial minimiert werden und zudem ein besserer Massetransfer der Inhaltsstoffe erreicht wird [44].

Das wesentliche Prinzip der Herstellung beider Kapselarten ist in Abb. 3.5 für Alginat als

Polysaccharid skizziert.¹ Zur Herstellung von Hohlkapseln wird eine Calciumchlorid-Lösung in eine Alginat-Lösung eingetropfet. Sobald die Oberfläche des Tropfens in Kontakt mit der Alginat-Lösung gerät, diffundieren die Calciumionen aus dem Tropfen in die Alginat-Lösung und initiieren sofort die Gelbildung. Die Membran der Kapsel wird also mit fortschreitender Zeit immer dicker, bis die Kapsel aus der Calciumchlorid-Lösung entfernt wird, oder das Tropfeninnere an Calciumionen soweit verarmt ist, dass keine weiteren Vernetzerionen mehr für die Gelbildung vorhanden sind. Das Innere der Kapsel bleibt flüssig, da das Alginat nicht durch die bereits gebildete Membran ins Kapselinnere diffundieren kann. Der Innendurchmesser der so hergestellten Kapseln entspricht dabei etwa dem Innendurchmesser des eingebrachten Tropfens. Matrixkapseln erhält man dahingegen, indem eine Alginat-Lösung in eine Calciumchlorid-Lösung getropft wird. Bei diesem Verfahren diffundieren die Calciumionen der äußeren Phase in den Alginat-Tropfen und sorgen dort für eine vollständige Gelierung, wodurch man Matrixkapseln mit einem festen Kern erhält.

In einem Herstellungsprozess werden ungefähr 10 Kapseln gleichzeitig hergestellt. Um deren Aggregation zu vermeiden, muss die Lösung ständig mit einem Magnetrührer gerührt werden. Die Fallhöhe der Tropfen beträgt etwa 2 cm, um zu gewährleisten, dass ein sphärischer Tropfen und somit auch eine sphärische Kapsel gebildet wird. Zur Vereinfachung der Bildung von sphärischen Kapseln werden der Vernetzerlösung weiterhin 50 % Glycerin zugesetzt. Nach einer bestimmten Zeit (Gelierzeit), die meistens zwischen 0,5 und 4 Minuten liegt, werden die Kapseln aus der Lösung mittels Filtration entfernt und anschließend mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Der Waschprozess sorgt für einen sofortigen Abbruch des Gelierungsprozesses, indem die Alginatlösung entfernt und ein Aneinanderhaften der Kapseln unmöglich wird. Zur Stabilisierung der Membranen durch Vervollständigung des Polymerisations-Prozesses werden die Kapseln anschließend in eine CaCl_2 -Lösung gegeben. Diese Lösung dient auch als Aufbewahrungs-Medium für die Kapseln.

Ist die Verkapselung eines bestimmten Inhaltsstoffs in flüssig gefüllten Kapseln erwünscht, so wird dieser einfach in der benötigten Konzentration in der Vernetzerlösung gelöst, wodurch er während der Gelierung im Kapselkern eingeschlossen wird. Bei einigen der hier studierten Kapseln wurde ein Heidelbeerextrakt (Kaden Biochemicals, Hamburg, Produkt-Nr.: 600761) verkapselt, der eine hohe Konzentration an pharmazeutisch interessanten Anthocyanen aufweist.

Die hier verwendeten Alginatkapseln wurden aus dem Natrium-Alginat *MANUGEL DMB (G63)*(ISP, Deutschland) hergestellt, welches einen Guronsäure-Anteil von 63 Prozent enthält. Die Pektinatkapseln wurden aus dem Pektinamid *Pectin amid AU-L 027/09* (Herbstreith & Fox, Deutschland) hergestellt.

3.3.2. Komposit-Kapseln

Da die Diffusion in Alginat- und Pektinatgelen für niedermolekulare Substanzen der freien Diffusion in Wasser entspricht [45], müssen die Kapselwände zur Ermöglichung einer verzögerten Freisetzung modifiziert werden. Dies kann wie hier beschrieben dadurch geschehen, dass dem Hydrogel der Kapselwände das Additiv Schellack hinzugesetzt wird, wodurch man Komposit-

¹Die Herstellung von Pektinatkapseln erfolgt analog.

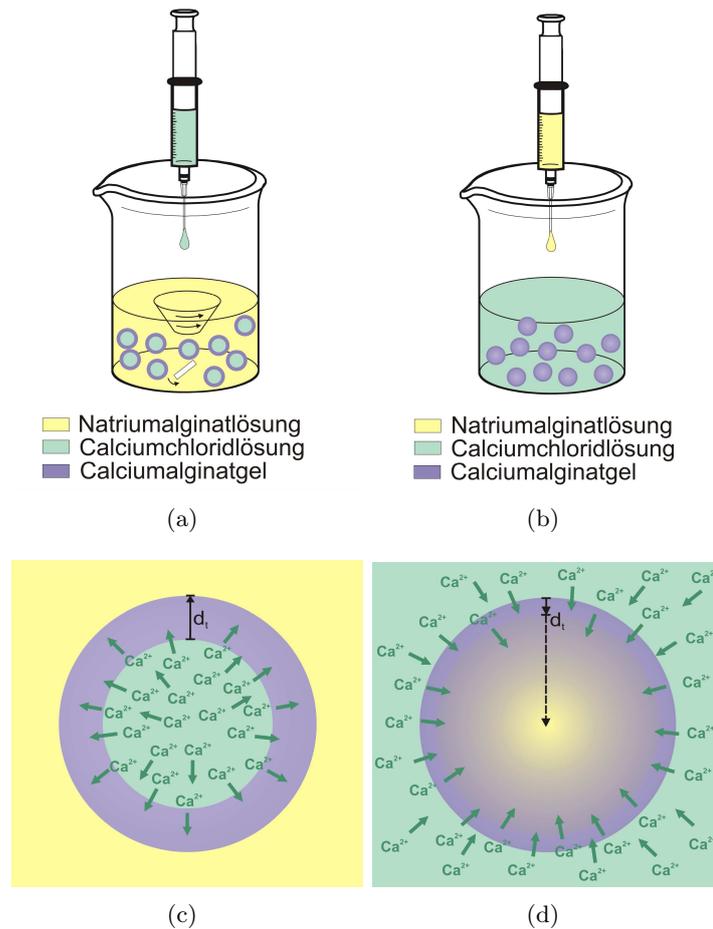


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung der Herstellung von Hohlkapseln (a und c) und Matrixkapseln (b und d) aus Calciumalginat [18].

kapseln erhält. Die Präparation der Kompositkapseln erfolgt größtenteils analog zum zuletzt beschriebenen Verfahren. Die Unterschiede liegen nur darin, dass der Polysaccharid-Lösung Schellack zugesetzt wird. Zudem muss die Vernetzlerlösung auf einen sauren pH-Wert eingestellt werden. Dadurch kommt es zu einer säureinduzierten Ausfällung von Schellack während der Membranbildung. Die festen Schellack-Partikel werden demnach in der Gelmembran eingeschlossen.

3.3.3. Extern beschichtete Kapseln

Eine weitere Möglichkeit zur Verzögerung der Freisetzung besteht darin, die Kapseln mit einer zusätzlichen Schicht aus Schellack zu versehen. Dazu werden die nach Abschnitt 3.3.1 hergestellten reinen Hydrogel-Kapseln in eine saure Calciumchlorid-Lösung gegeben, wodurch sich im flüssigen Kapselkern ein saurer pH-Wert ($\text{pH} = 1$ bis 3) einstellt. Diese Kapseln werden anschließend in eine Beschichtungs-Lösung gegeben, welche neben Wasser meistens 20 % ammoniakalische Schellack-Lösung und 5 bis 10 % Glycerin oder Polyvinylpyrrolidon (PVP) als Weichmacher enthält. Durch die Diffusion der Wasserstoffionen aus der Kapsel in die umgebende Beschichtungslösung fällt der Schellack am äußeren Rand der Kapseln aus und

bildet dort eine zusätzliche feste Schicht. Die Beschichtungszeit, das heißt die Verweildauer der Kapseln im Beschichtungs-Bad, beträgt zwischen 3 und 20 Minuten. Nach der Präparation werden die Kapseln in einer Calciumchlorid-Lösung gelagert, welche auf den selben pH-Wert eingestellt ist, der auch zuvor bei der Beschichtung verwendet wurde.

Als ammoniakalische Schellack-Lösung wurde *SSB Aquagold* der Firma SSB Stroever Schellack (Bremen) verwendet. Dieses besitzt einen Feststoffanteil von 25 % und einen pH-Wert von 7,5.

Teil II.

**Morphologie, Permeabilität und
Stabilität der Mikrokapseln**

4. Charakterisierung des Einflusses unterschiedlicher Präparationen auf die makroskopischen Strukturen der Mikrokapseln

Durch die Möglichkeit der NMR-Mikroskopie, Proben mit einer Vielzahl kontrastbestimmender Parameter bildgebend zu charakterisieren, bietet Sie ein großes Potential zur Untersuchung von Mikrokapseln. Die Materialien, aus denen die hier untersuchten Mikrokapseln bestehen, zeichnen sich in NMR-Bildern durch einen materialabhängigen Kontrast zum umgebenden wässrigen Medium aus. Daher ist es möglich, durch die bildgebende NMR Mikrokapseln hinsichtlich ihrer geometrischen Struktur zu charakterisieren. Dazu zählen unter anderem Eigenschaften wie die Membrandicke, der Kapseldurchmesser sowie die Dicke unterschiedlicher Membranschichten. Im Gegensatz zu experimentellen Techniken, die auf der Lichtmikroskopie basieren [46], können die Kapseln mit der NMR-Mikroskopie dabei zerstörungsfrei charakterisiert werden. In der Vergangenheit wurde die NMR-Mikroskopie daher schon vielfach zur Charakterisierung von Hydrogel-Mikrokapseln verwendet. Konkret wurden beispielsweise die interne Struktur von Alginat-Matrixkapseln studiert [47, 48] sowie mit Poly-L-Lysin beschichtete Alginatkapseln charakterisiert [49].

Hier wird nun die experimentelle Technik zur Charakterisierung von unterschiedlich präparierten und modifizierten Alginat- und Pektinatkapseln bezüglich ihres makroskopischen Aufbaus dargestellt. Dazu zählen hierbei hauptsächlich Experimente zur Bestimmung von Membran- und Schichtdicken beschichteter und unbeschichteter Pektinat- und Alginatkapseln. Durch die Ermittlung von Zusammenhängen zwischen konkreten Herstellungsprozessen der Kapseln und den daraus resultierenden Kapselgeometrien können dabei Rückschlüsse auf zugrunde liegende chemische Prozesse und Strukturen gezogen werden.

4.1. Probenpräparation

Bei den meisten der hier dargestellten Experimenten wurden die Kapseln in ein NMR-Probenröhrchen mit einem Außendurchmesser von 5 mm gegeben. Dieses beinhaltete neben der Kapsel im Regelfall die Aufbewahrungslösung der Kapseln, also eine wässrige Calciumchlorid-Lösung. Die einfachste Möglichkeit, Bildgebung an einer Kapsel durchzuführen, ist durch eine Präparation wie in Abbildung 4.1a gegeben. Hier liegt die Kapsel auf dem Boden des Röhrchens. Da das lokale Magnetfeld am Röhrchenboden durch die Krümmung des Glases und der großen Grenzfläche zur Luft stark verzerrt wird, wurde auf diese Form der Probenpräparation allerdings verzichtet. Stattdessen wurden viele Messungen mit der Probenpräparation wie in

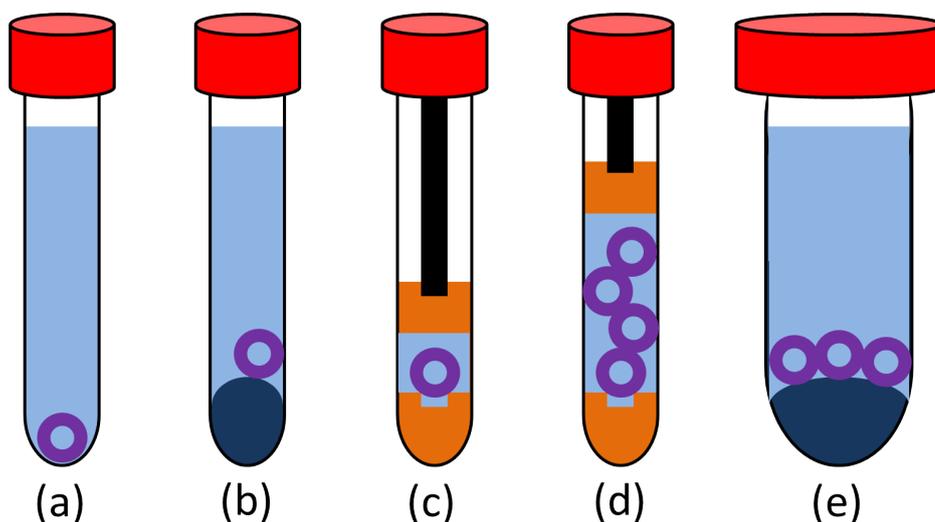


Abbildung 4.1.: *Verschiedene Verfahren zur Positionierung der Mikrokapseln in 5- und 10-mm Probenröhrchen (nicht maßstabsgetreu). Violett: Mikrokapseln; Hellblau: Wasser; Dunkelblau: Tetrachlorethen; Orange: Suszeptibilitäts-Plug.*

Abb. 4.1b dargestellt durchgeführt. Hier befindet sich unter dem Wasser eine weitere flüssige Phase bestehend aus dem organischen Lösungsmittel Tetrachlorethen (auch Perchlorethen genannt). Aufgrund der unterschiedlichen Polarität und des Dichteunterschieds der beiden Flüssigkeiten setzt sich das Tetrachlorethen unter der Wasserschicht ab und es bildet sich zwischen ihnen eine scharfe Phasengrenze. Diese Phasengrenze bildet einen Meniskus, der bezüglich der Tetrachlorethen-Phase konvex gekrümmt ist. Wird eine Kapsel in ein so präpariertes Röhrchen gegeben, setzt sie sich aufgrund ihrer im Vergleich zum Tetrachlorethen geringeren Dichte an der Grenzfläche ab. Durch die Krümmung der Grenzfläche wird die Kapsel dabei an den Rand des Probenröhrchens gedrückt. Diese Position der Kapsel hat sich für mittlere Messzeiten als hinreichend stabil erwiesen, was eine bewegungsartefaktfreie Bildgebung der Kapsel ermöglicht. Diese Probenpräparation bringt allerdings auch Nachteile mit sich. Besonders bei längeren Messungen ist die Stabilität der Kapselposition nicht ausreichend, woraus eine Bewegung der Kapsel während der Messung resultiert. Außerdem erschwert die Randlage teilweise automatische Auswerteprozeduren, da sich die Kapselmembran in NMR-Bildern nicht an allen Stellen von der Probenröhrchen-Wand unterscheiden lässt. Hinzu kommt, dass die unterschiedlichen magnetischen Suszeptibilitäten der beiden Flüssigkeiten zu Magnetfeldverzerrungen führen, was insbesondere bei der orts aufgelösten Messung von Relaxationszeiten ein Problem darstellt (vgl. Abschnitt 8.1). Weiterhin erfordert die Handhabung von so präparierten Proben aufgrund gesundheitsgefährdender Eigenschaften des Perchlorethens besondere Vorsicht.

Diese Nachteile werden durch die in Abbildung 4.1c skizzierte Probenpräparation vermieden. Hier werden kommerziell verfügbare Suszeptibilitäts-Plugs (kurz: Plugs) verwendet [50]. Diese bestehen aus dem Thermoplastik Polyetherimid (PEI), welches auch unter dem Handelsnamen Ultem bekannt ist. Die magnetische Suszeptibilität dieses Kunststoffes weicht nur sehr gering

von der des Wassers ab, wodurch Magnetfeldverzerrungen deutlich reduziert werden können. Der untere Plug besitzt zur Positionierung im NMR-Röhrchen eine Gewindebohrung, welche bei entsprechender Kapselgröße zur zentralen Fixierung der Kapseln verwendet werden kann. Die daraus resultierende Kapselposition ist weitaus stabiler als die am Rand der Phasengrenze zwischen Wasser und Perchlorethen. Ein weiterer Vorteil durch die Verwendung von Suszeptibilitäts-Plugs besteht darin, dass sich mit Hilfe des oberen Suszeptibilitäts-Plugs das innerhalb der RF-Spule des Probenkopfes befindliche Wasservolumen ohne Nachteile hinsichtlich der Magnetfeldhomogenität deutlich reduzieren lässt. Dadurch lassen sich störende Einflüsse infolge des sogenannten Radiation-Dampings [51] vermindern.

Bezüglich einer Verringerung der Messzeit bei der Charakterisierung von mehreren identisch präparierten Kapseln sind die Probenpräparationen gemäß Abb. 4.1d und e sinnvoll. Die Positionierung mehrerer Kapseln übereinander in einem 5-mm Röhrchen bietet die Möglichkeit, durch Verwendung der Mehrschicht-Bildgebung, die Bilder von mehreren Kapseln gleichzeitig aufzunehmen. Auch die Positionierung mehrerer Kapseln nebeneinander in einem 10-mm Röhrchen bringt eine Verringerung der Messzeit mit sich, denn damit reicht zur Charakterisierung mehrerer Kapseln ein Bild mit großem *FOV*.

4.2. Experimentelle Vorgehensweise zur NMR-Mikroskopie von Mikrokapseln

Die NMR-Mikroskopie von den gemäß Abschnitt 3.3 präparierten Proben erfolgte am 600 MHz NMR-Spektrometer des interdisziplinären Zentrums für magnetische Resonanz der TU-Dortmund. Hierbei handelt es sich um ein 14,1 T *Varian Chemagnetics Infinity Plus* Festkörper-Spektrometer. Dies ist mit dem Gradientenspulen-System *Resonance Research BFG-73/45-100 MK 2* ausgestattet, welches von Gradienten-Verstärkern des Typs *Techron 7700* bzw. *8300* angetrieben wird. Hiermit können Gradientenfelder in allen drei Raumdimensionen mit einer maximalen Stärke von etwa 1 T/m erzeugt werden. Als Schwingkreis zur Anregung und Detektion wird ein *Bruker Biospin Birdcage RF-Insert PH Micro 2.5 SAD600 1H* mit entweder 5 oder 10 mm Innendurchmesser verwendet.

Zur Aufnahme der NMR-Bilder wurde im Regelfall die in Abschnitt 8.1 dargestellte modifizierte Spinwarp-Sequenz verwendet¹. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde jeweils ein grob aufgelöstes Bild einer vertikalen Ebene durch die Probe aufgenommen. Anhand dieses Bildes konnten die Positionen ermittelt werden, an denen die hochaufgelösten Bilder einer horizontalen Schicht durch die Probe aufgenommen wurden. Die Positionen dieser Schichten wurden so gewählt, dass Sie möglichst genau durch das Kapselzentrum verlaufen.

Die Aufnahme der in diesem Abschnitt dargestellten NMR-Bilder erfolgte mit Repetitionszeiten zwischen 2 und 10 s und Echozeiten zwischen 10 und 100 ms. In Abhängigkeit vom gewünschten Signal-zu-Rausch-Verhältnis betrug die Anzahl der Signalakkumulationen zwischen 4 und 128. Dabei wurde ein Phasenzyklus durchlaufen, welcher die Empfänger- und Detektorphasen gemäß den bekannten CYCLOPS- und EXORCYCLE-Sequenzen [52] variiert, um so Artefakte infolge von Nichtidealitäten der RF- und Gradienten-Pulse zu verringern.

¹Modifizierte Spin-Echo-Bildgebungssequenz zur Messung von T_2 , welche prinzipiell wie die im Grundlagenkapitel vorgestellte Sequenz funktioniert und qualitativ vergleichbare NMR-Bilder liefert.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Experimente bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt.

Die Erstellung von NMR-Bildern aus den \vec{k} -Raum Daten erfolgte durch folgende Prozessierungen:

1. Basislinienkorrektur für jede \vec{k} -Raum-Zeile durch Subtraktion der mittleren Signalamplitude aus dem letzten Achtel der jeweiligen Zeile
2. Apodisierung durch Multiplikation jeder \vec{k} -Raum-Zeile mit \sin^2
3. Verdoppelung der Zeilenlänge durch symmetrische Auffüllung mit Nullen (*zero-filling*)
4. Fourier-Transformation der \vec{k} -Raum-Zeilen und anschließende Verschiebung der Frequenzreferenz zum Zentrum der erhaltenen Spektren
5. Wiederholung der Schritte 1 bis 4 für die Spalten des \vec{k} -Raums
6. Berechnung der Absolutwerte aus den komplexen Amplituden

Die Pixel der so erhaltenen NMR-Bilder besitzen im Regelfall eine Größe von $(11,5 \mu\text{m})^2$, da meistens ein *FOV* von 6 mm und 256 Phasenkodierschritte bzw. eine Akquisitionslänge von 256 Datenpunkten zur Bildaufnahme verwendet wurden. Die Schichtdicke der Bilder beträgt in der Regel etwa 150 μm .

4.3. Membranwachstum von Pektinathohlkapseln

Einer der wichtigsten Parameter bei der Präparation von Hohlkapseln durch die Eintropfmethode ist die sogenannte Gelierzeit. Dies ist in Anlehnung an den in Abschnitt 3.3 beschriebenen Herstellungsprozess die Zeit, die zwischen dem Eintauchen des Vernetzungslösungs-Tropfens in die Polysaccharid-Lösung und dem Separieren der aus dem Tropfen gebildeten Hohlkapsel aus

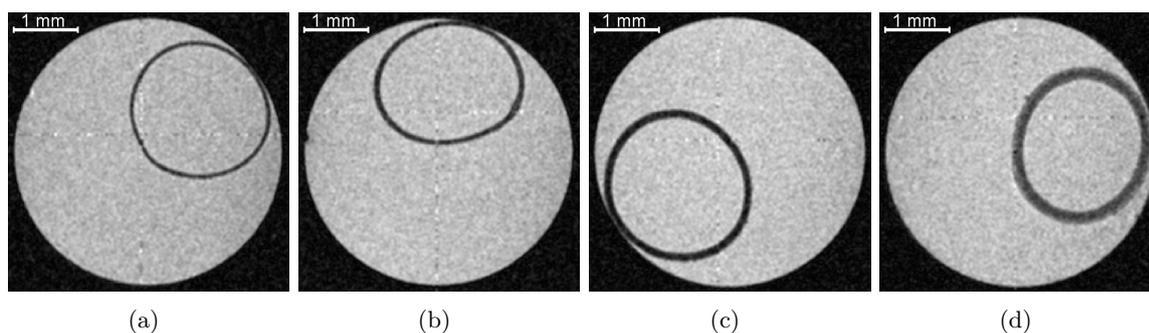


Abbildung 4.2.: NMR-Bilder von flüssig gefüllten Pektinathohlkapseln in einem NMR-Röhrchen mit 5 mm Außendurchmesser. Hohe Signalamplituden (helle Pixel) sind dem Wasser innerhalb des flüssigen Kapselkerns und der umgebenden Lösung zuzuordnen. Die Kapselmembranen und die Luft außerhalb des Röhrchens bzw. die Röhrchenwand liefern kein (oder nur ein schwaches) Signal und führen daher zu dunklen Pixeln. Die Gelierzeiten der Kapseln betragen 15, 30, 100 und 360 Sekunden.

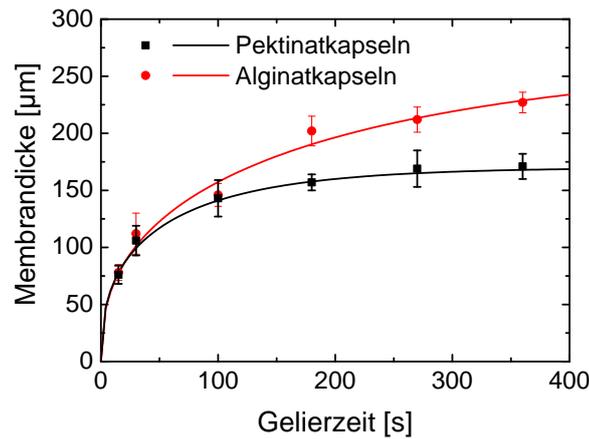


Abbildung 4.3.: Durch die NMR-Bildgebung ermittelte Membrandicke von Pektinat- und Alginatehohlkapseln als Funktion der Gelierzeit und angepasste binomiale Diffusionsgleichung 4.1.

der Lösung liegt. Mit der Gelierzeit kann die Membrandicke der resultierenden Hohlkapseln eingestellt werden. Um den genauen Zusammenhang zwischen der Gelierzeit und der Membrandicke aufzuklären und daraus Rückschlüsse auf die membranbildenden Mechanismen zu ziehen, wurden durch die NMR-Mikroskopie Membrandicken von Pektinatkapseln bestimmt, die mit unterschiedlichen Gelierzeiten hergestellt wurden.

Abbildung 4.2 stellt NMR-Bilder von Pektinathohlkapseln mit unterschiedlichen Gelierzeiten dar. Aufgrund der Probenpräparation nach Abb. 4.1b wurden die Kapseln durch die Flüssig/Flüssig Phasengrenze an den Rand des NMR-Röhrchens gedrückt. In den NMR-Bildern stellt die Helligkeit ein Maß für die Signalamplitude im jeweiligen Pixel dar. Hohe Signalamplituden führen dabei zu hellen (weißen) Pixeln. Daher sind die hellen Bereiche der hier dargestellten NMR-Bilder dem Wasser außerhalb oder innerhalb der flüssig gefüllten Hohlkapseln zuzuweisen. Obwohl die Kapselmembranen aus Hydrogelen bestehen, deren Hauptbestandteil Wasser ist, weisen sie im Vergleich zum Wasser deutlich geringere Signalamplituden auf. Wie später in Kapitel 8.1 gezeigt wird, ist dies auf stark verkürzte transversale Relaxationszeiten innerhalb der Hydrogele zurückzuführen.

Anhand der NMR-Bilder wird schon deutlich, dass die Kapselwände (Membranen) unterschiedliche Dicken aufweisen. Für eine genauere Betrachtung wurden jeweils Bilder von 5 unterschiedlichen Kapseln des gleichen Herstellungsprozesses aufgenommen und die Membrandicke ermittelt. Abbildung 4.3 stellt die Mittelwerte der Membrandicken als Funktion der Gelierzeit dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Membranen mit ansteigender Gelierzeit dicker werden. Das Dickenwachstum verläuft bei kleinen Gelierzeiten schnell und wird bei langen Gelierzeiten langsamer. Nach ausreichender Zeit (hier etwa 5 Minuten) setzt das Membranwachstum aus und die Membrandicke erreicht einen Plateauwert, der hier bei etwa 170 µm liegt.

Das anfangs schnelle Wachstum der Kapselmembran ist durch den großen Gradienten der Calciumionen-Konzentration zwischen der Vernetzerlösung innerhalb der Kapsel und der Polysaccharid-Lösung außerhalb zu erklären. Durch die Vernetzung des Hydrogels nimmt

die Konzentration an Calciumionen im flüssigen Kern mit der Zeit immer weiter ab. Der somit geringer werdende Konzentrationsgradient resultiert in einer Abbremsung des Membranwachstums. Ein weiterer Faktor, der die Abbremsung des Wachstums bewirkt, ist der durch das Hydrogel verursachte Widerstand für die Diffusion der Calciumionen.

Nach Blandino et al. [46] gilt für das Wachstum des Membranvolumens V_{mem} der Zusammenhang

$$V_{mem} = V_{mem,max} \left(1 - e^{-kt}\right)^n. \quad (4.1)$$

Diese Gleichung ist auch als binomiale Diffusionsgleichung bekannt. Dabei ist k die Geschwindigkeitskonstante der Gelbildungsreaktion und n die sogenannte heterogene strukturelle Widerstandskonstante, welche antiproportional zum diffusiven Widerstand im Hydrogel ist und bei verschwindendem Widerstand den Wert 1 annimmt. Gleichung 4.1 wurde an die aus den Membrandicken ermittelten Membranvolumina angefitet, wobei der Fit die Parameter $V_{max} = 170 \mu\text{m}$, $k = 0,009 \text{ s}^{-1}$ und $n = 0,4$ ergab.

In einer vorangegangenen Arbeit wurden entsprechende Untersuchungen zur Membranbildungskinetik von Alginatkapseln unter vergleichbaren experimentellen und präparativen Bedingungen durchgeführt [8, 53]. Diese ergaben die Membranwachstumsparameter $V_{max} = 270 \mu\text{m}$, $k = 0,003 \text{ s}^{-1}$ und $n = 0,4$. Im Vergleich zu Alginatkapseln verläuft die Membranbildung bei Pektinat-kapseln also deutlich schneller. Allerdings werden hier geringere maximale Membrandicken erreicht. Diese Unterschiede können dadurch erklärt werden, dass im Pektinatgel mehr Calciumionen von den Polysaccharid-Ketten gebunden werden, ohne dabei die Ketten zu vernetzen [18, S.145]. Dadurch wird der Vorrat an Calciumionen schneller aufgebraucht und somit bei gleichen Gelierzeiten dünnere Membranen gebildet.

Da die Strukturkonstante mit $n = 0,4$ deutlich kleiner als 1 ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Geschwindigkeit der Diffusion der Calciumionen im Hydrogel nicht nur durch den Konzentrationsgradienten bestimmt wird. Vielmehr erfahren die Calciumionen auch eine deutliche Abbremsung durch einen diffusiven Widerstand im Hydrogel der Membran. Dieser Widerstand ist vermutlich hauptsächlich auf einen positiven Ladungsüberschuss durch gebundene Calciumionen zurückzuführen.

4.4. Einfluss von Glycerin auf die Gestalt von Alginat-Hohlkapseln

Beim Herstellungsprozess der Kapseln ist es erwünscht, möglichst sphärisch geformte Kapseln zu erhalten. Dies kann durch die Zugabe von Glycerin zur Vernetzerlösung erreicht werden, da dadurch eine Erhöhung der Dichte erreicht wird und somit das Eintropfverhalten und das Strömungsverhalten in der Polymerlösung beeinflusst wird. Um diesen Einfluss genauer beschreiben zu können, wurden NMR-Bilder von Alginat-Hohlkapseln aufgenommen, welche mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen in der Vernetzerlösung hergestellt wurden. Wie in Abbildung 4.4 deutlich wird, werden die sphärischsten Kapselformen bei einem Glycerinanteil von 50 % erreicht.

Neben der Form der Kapseln wurde hier auch die Dicke der Kapselwände bestimmt. Wie in Tabelle 4.1 erkenntlich wird, führen höhere Glycerinkonzentrationen zu dünneren Membranen.

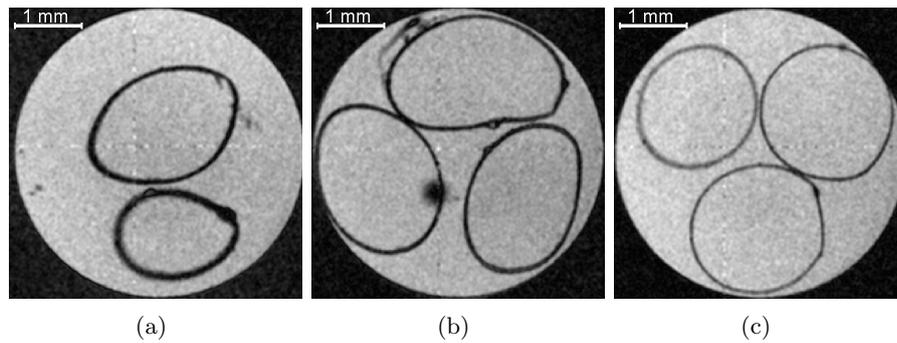


Abbildung 4.4.: NMR-Bilder von Alginat-Hohlkapseln, welche nebeneinander in einem 5-mm Röhrchen liegen. Die Kapseln wurden mit verschiedenen Glycerinanteilen in der Vernetzlerlösung hergestellt (0 % (a), 25 % (b) und 50 % (c)).

Glycerinanteil [%]	Membrandicke [μm]
0	80 ± 9
25	62 ± 6
50	47 ± 7

Tabelle 4.1.: Membrandicken von Alginat-Hohlkapseln in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration. Die Gelierzeit der Kapseln beträgt 15 s.

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Calciumionen in den höher viskosen Lösungen langsamer diffundieren.

4.5. Kompositkapseln aus Pektinat und Schellack

Eine Variation der Eigenschaften von den hier untersuchten Alginat- und Pektinatkapseln kann durch eine Modifikation mit dem Naturharz Schellack erfolgen. Neben der im nächsten Abschnitt untersuchten Aufbringung einer zusätzlichen Schicht, kann der Schellack auch direkt in die Membran eingebaut werden. Dazu wird beim Herstellungsprozess der Kapseln der Polysaccharidlösung Schellack zugesetzt (vgl. Herstellungsprozedur in Abschnitt 3.3). Hier wird nun der Einfluss des Einbaus von Schellack auf die Membrandicken betrachtet.

In Abbildung 4.5 sind NMR-Bilder einer reinen Pektinatkapsel (a) und einer Pektinat-Schellack Kompositkapsel (b) dargestellt. Bis auf die Beigabe von Schellack zur Polysaccharidlösung wurden beide Kapseln unter identischen Bedingungen hergestellt. Anhand der Bilder fällt auf, dass die reine Pektinatkapsel eine deutlich dickere Membran aufweist als die Kompositkapsel. Des Weiteren erkennt man, dass die reine Pektinatmembran eine höhere Signalamplitude als die Kompositmembran liefert. Da beide NMR-Bilder mit identischen Bildgebungsparametern aufgenommen wurden, ist die unterschiedliche Signalamplitude vermutlich auf durch den Schellackeinbau verursachte Änderungen der Spindichten oder der Relaxationszeiten zurückzuführen.

Die Löslichkeit von Schellack weist eine Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Daher wurde hier untersucht, wie sich unterschiedliche pH-Werte der Vernetzlerlösung auf die Membrandicke

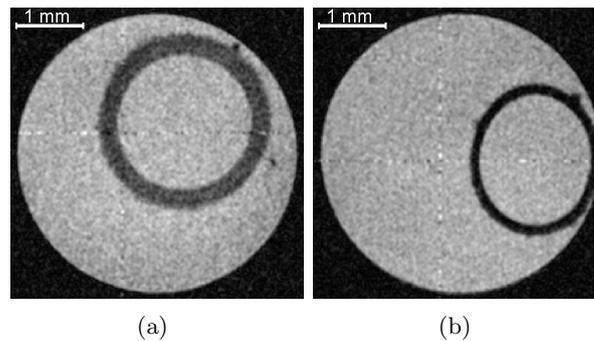


Abbildung 4.5.: NMR-Bilder einer reinen Pektinatkapsel (a) und einer Pektinat/Schellack-Kompositkapsel (b) bei $\text{pH} = 2$. Außer der Schellack-Zugabe wurden beide Kapseln unter identischen Bedingungen hergestellt.

von Kompositkapseln, und zum Vergleich auf reine Pektinatkapseln, auswirken. Die mittleren Membrandicken von jeweils 5 Kapseln einer Herstellungsreihe sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Die reinen Pektinatkapseln weisen unabhängig vom pH-Wert eine Membrandicke von etwa $320\ \mu\text{m}$ auf. Dahingegen besitzen die Kompositkapseln deutlich dünnere Membranen im Bereich von 170 bis $200\ \mu\text{m}$. Hier lässt sich auch eine leichte Tendenz erkennen, dass höhere pH-Werte zu dickeren Membranen führen.

Die unterschiedlichen Dicken von reinen Pektinatmembranen und Kompositmembranen lassen sich dadurch erklären, dass schnell diffundierende H^+ -Ionen während der Gelierung zu einer Ausfällung von Schellack unter gleichzeitiger Vernetzung des Pektinatgels führen, wodurch die Diffusion der vernetzenden Calciumionen verlangsamt wird und bei gleichen Gelierzeiten dünnere Membranen gebildet werden. Die Korrelation zwischen dem pH-Wert und der Dicke von Kompositmembranen lässt sich dadurch erklären, dass bei höheren pH-Werten weniger Schellack ausfällt und der diffusive Widerstand somit nicht so stark zunimmt wie bei kleineren pH-Werten.

Nach [18, S.117] zeigen Pektinamid-Hydrogele im pH-Bereich zwischen 2 und 4 ein deutliches Quellungsverhalten. Dies konnte hier allerdings nicht beobachtet werden und ist möglicherweise auf durch den Herstellungsprozess bedingte veränderte Geleigenschaften in Hohlkapselmembranen zurückzuführen.

4.6. Schellack-beschichtete Pektinatkapseln

Neben dem zuvor untersuchten direkten Einbau von Schellack in die Kapselmembran kann der Schellack auch extern durch einen extra Beschichtungsprozess auf die Hydrogelmembran aufgebracht werden. Dies erfolgt dadurch, dass zuvor präparierten unbeschichteten Pektinatkapseln Salzsäure zugesetzt wird. Die säurehaltigen Kapseln werden anschließend in eine Schellack-Lösung gegeben. Durch die hinausdiffundierenden H^+ -Ionen wird eine säureinduzierte Ausfällung des Schellacks bewirkt, wodurch sich um die Hydrogelkapsel eine Schicht aus festem Schellack bildet. In diesem Abschnitt werden die Auswirkungen verschiedener Kapselpräparationen auf das Erscheinungsbild solcher beschichteter Kapseln betrachtet. In

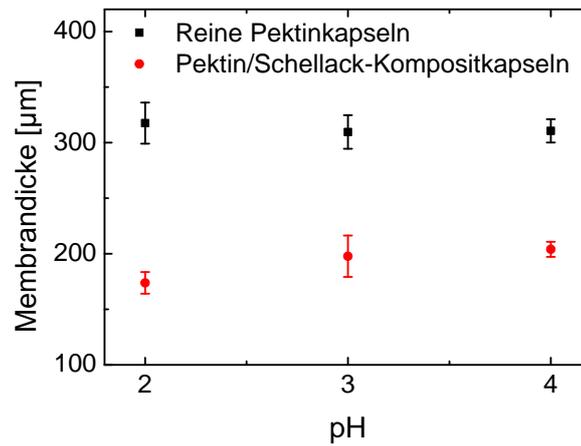


Abbildung 4.6.: Membrandicken von reinen Pektinatkapseln und Pektinat-Schellack-Kompositkapseln als Funktion des pH-Wertes der Vernetzerlösung.

Abbildung 4.7 sind beispielhafte NMR-Bilder von unterschiedlich präparierten beschichteten Pektinatkapseln dargestellt. An diesen Bildern lassen sich deutlich zwei unterschiedliche Schichten der Membran erkennen. Der innere heller erscheinende Bereich der Membran ist dem Pektinat-Hydrogel zuzuordnen, wohingegen der äußere dunkle Bereich vom Schellack stammt. Die stark unterschiedlichen Signalamplituden aus den beiden Membranschichten sind darauf zurückzuführen, dass der feste Schellack eine geringere Protonendichte bzw. hauptsächlich schnell relaxierende Protonen enthält. Die Repetitions- und Echozeiten der Bildgebungssequenzen konnten daher so gewählt werden, dass die drei Bereiche Wasser (im Kapselkern und außerhalb der Kapsel), Pektinat-Hydrogel und Schellack-Beschichtung deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Damit ist es möglich, die Dicken der einzelnen Schichten zu messen.

Anhand der in Abb. 4.7 dargestellten Bilder fällt bereits auf, dass sowohl die Dicken der Schellackbeschichtungen als auch die Dicken der Pektinatschichten starke Unterschiede aufweisen. Weiterhin ist auch deutlich zu erkennen, dass die Schellackbeschichtungen teilweise Defekte aufweisen. Hier ist der Schellack an einigen Stellen dünner oder sogar abgebrochen. Auf diese Defekte wird zur Erklärung der Membranpermeabilitäten in Abschnitt 5.7 ausführlicher eingegangen.

Wie schon erwähnt wurde, zeigt die säureinduzierte Ausfällung von Schellack eine Abhängigkeit vom pH-Wert. Daher wurden die Schichtdicken von Kapseln gemessen, die mit unterschiedlichen pH-Werten der zur Schellack-Ausfällung verwendeten Salzsäure präpariert worden sind. Neben dem pH-Wert wurde auch die Gelierzeit der Pektinatschichten variiert, um den Einfluss der Pektinatschicht-Dicke auf die Bildung der Schellackschicht zu bestimmen. Zu Vergleichszwecken wurden auch die Wanddicken von unbeschichteten Pektinatkapseln gemessen, welche nach der Herstellung und während der Messung bei identischen pH-Werten gelagert wurden wie die beschichteten Kapseln. In Abb. 4.8 sind die anhand von jeweils fünf Kapseln identischer Herstellung ermittelten mittleren Schichtdicken für Kapseln mit Gelierzeiten der Pektinatschicht von 30 s (a) und 180 s (b) als Funktion des pH-Wertes dargestellt.

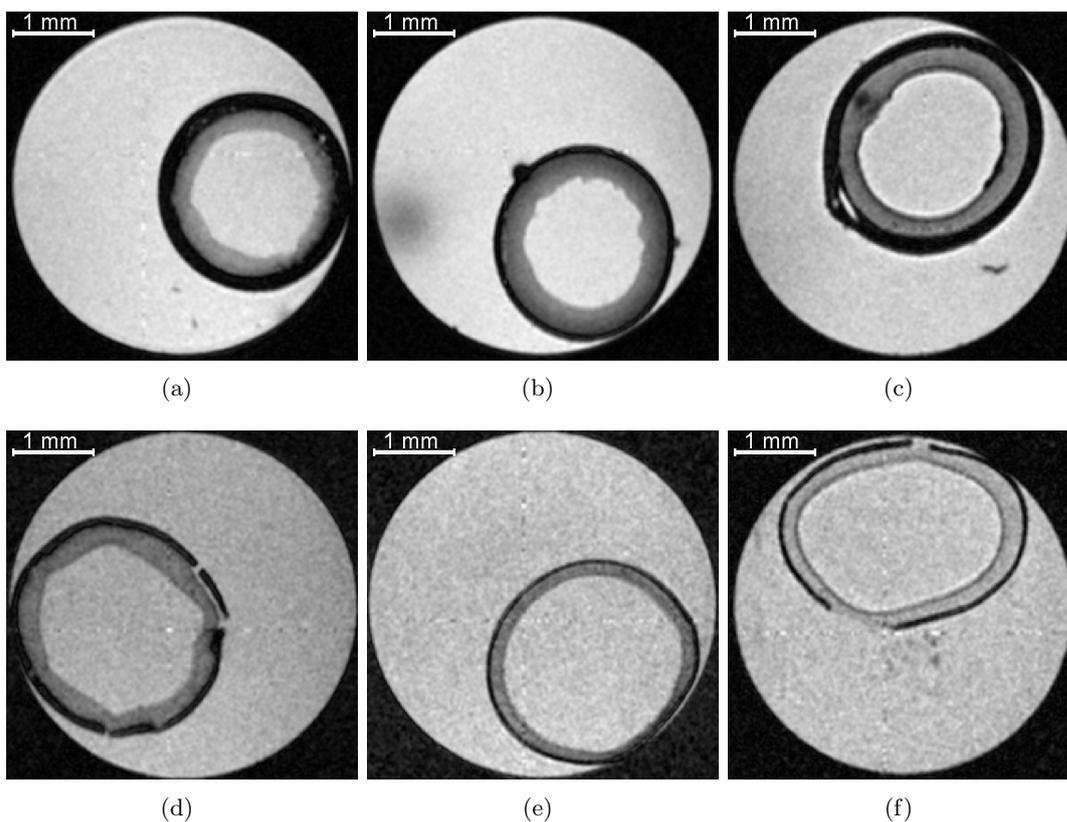


Abbildung 4.7.: NMR-Bilder von Schellack-beschichteten Pektinat-Hohlkapseln, welche unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert, Gelier- und Beschichtungszeit) präpariert wurden. Die Schellack-Beschichtungen liefern hier kein Signal, weshalb sie gut von den Pektinatschichten mit einer mittleren Signalamplitude zu unterscheiden sind.

Die Dicken von Pektinatmembranen unbeschichteter Kapseln liegen bei Gelierzeiten von 30 s im Bereich von etwa 180 bis 210 μm , wohingegen sie mit Dicken im Bereich von 360 bis 420 μm bei der längeren Gelierzeit deutlich dicker sind. Dies ist analog zu den Ergebnissen der Membranwachstumscharakterisierungen in Abschnitt 4.3 ein Resultat des diffusionsbedingten Gelierungsprozesses. Sowohl die Pektinatmembranen der unbeschichteten Kapseln als auch die Pektinatschichten der beschichteten Kapseln weisen außerdem die Tendenz auf, mit höheren pH-Werten dicker zu werden. Dies kann mit einem pH-abhängigen Quellungsverhalten erklärt werden [18, S.117].

Interessanterweise sind alle Pektinatschichten der beschichteten Kapseln dünner als die Pektinatmembranen der unbeschichteten Kapseln, obwohl sie aus dem selben Herstellungsprozess stammen. Die Beschichtung mit Schellack führt also zu einer Verringerung des Pektinatvolumens. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass chemische Reaktionen zwischen Bestandteilen der Schellack-Lösung und den vernetzenden Calciumionen zu einer Verarmung dieser Ionen im Pektinat-Hydrogel führen. Diese Verarmung ginge mit einer Verringerung der Vernetzungsstellen einher. Daraus wiederum würde eine Veränderung der dreidimensionalen Gelstruktur resultieren, die makroskopisch zu einem geringeren Volumen führt.

Die Dicken der Schellack-Schichten zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Gelierzeit

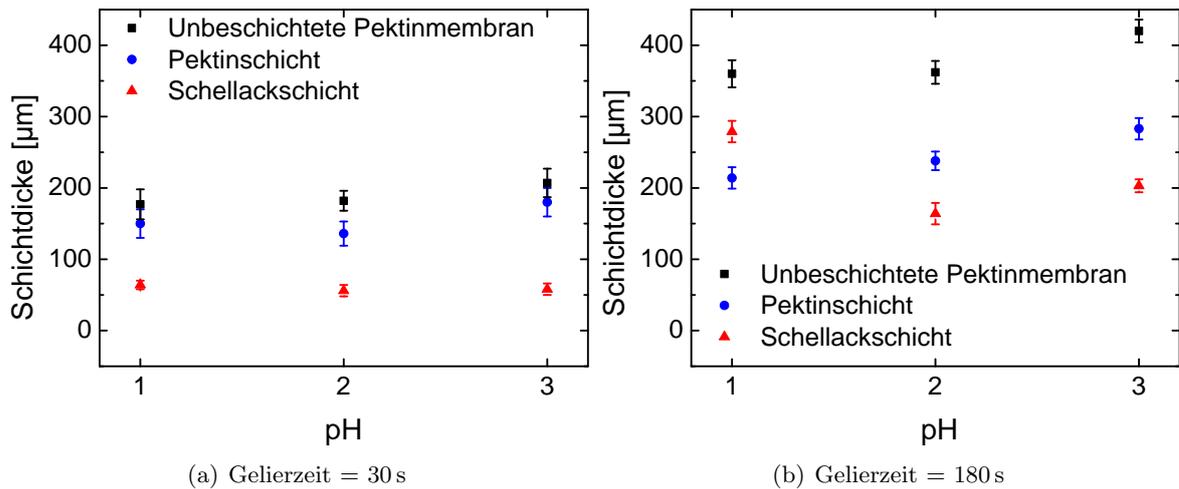


Abbildung 4.8.: Pektinat- und Schellack-Schichtdicken von unbeschichteten und beschichteten Hohlkapseln mit Gelierzeiten von 30 s (a) und 180 s (b) bei Beschichtungszeiten von 10 min als Funktion des pH-Werts.

und somit von der Dicke der Pektinatmembranen. Die Kapseln mit der Gelierzeit von 30 s weisen Schellackdicken von etwa 60 µm auf. Dabei lässt sich keine Abhängigkeit vom pH-Wert feststellen. Bei den dickeren Kapseln der Gelierzeit 180 s weisen die Schellackdicken allerdings eine Varianz mit dem pH-Wert auf. Hier variiert die Dicke zwischen 180 und 280 µm, wobei die dicksten Schellackbeschichtungen bei einem pH-Wert von 1 entstehen.

Die wichtigste Erkenntnis liegt hier darin, dass dickere Pektinatmembranen zu drei- bis fünfmal dickeren Schellackbeschichtungen führen. Über die Ursachen dafür kann hier nur spekuliert werden. Ein bestimmender Faktor für die Dicke der gebildeten Membran ist vermutlich die absolute Menge an für die Ausfällung zur Verfügung stehenden H^+ -Ionen. Es ist denkbar, dass die in hoher Anzahl im Polysaccharid-Netzwerk des Pektinat-Hydrogels vorhandenen H^+ -Ionen auch für die Ausfällung des Schellacks verwendet werden. Da in dickeren Pektinatmembranen deutlich mehr H^+ -Ionen gebunden sind, könnte dadurch die Gesamtzahl der H^+ -Ionen soweit steigen, dass die Bildung von dickeren Schellackschichten erfolgen kann. Da die Schellackdicken bei dünnen Kapseln allerdings keine Abhängigkeit vom pH-Wert aufzeigen, müsste die Konzentration an H^+ -Ionen innerhalb der Membran deutlich höher sein als innerhalb des flüssigen Kerns. Da die Kapseln vergleichbare Durchmesser aufweisen, kann die durch größere Kapseln verursachte höhere Anzahl an H^+ -Ionen nicht die unterschiedlichen Schellackdicken erklären.

Neben dem pH-Wert und der Gelierzeit kann die Dicke der Schellackschicht auch durch die Verweildauer der Kapseln im Schellack-Bad (Beschichtungszeit) eingestellt werden. In Abbildung 4.9 kann man eindeutig erkennen, dass längere Beschichtungszeiten zu dickeren Schellackschichten führen.

Die Beschichtung der reinen Pektinatkapseln mit Schellack soll eine Abdichtung der Kapseln für zu transportierende Inhaltsstoffe bewirken. Daher wurde für die hier charakterisierten Kapseln auch ihre Permeabilität für Anthocyane und paramagnetische Testmoleküle gemessen (siehe Abschnitt 5 und 6).

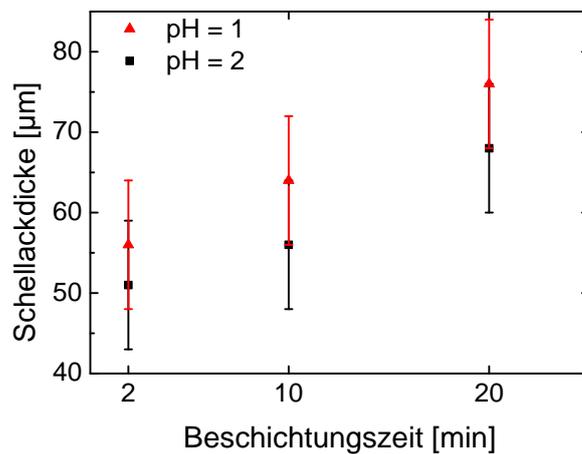


Abbildung 4.9.: Dicke der Schellackbeschichtung als Funktion der Beschichtungszeit von Pektinatkapseln mit Gelierzeiten von 30 Sekunden.

4.7. Alginat-Matrixkapseln mit externer Schellack-Beschichtung

Eine Variation des in Abschnitt 3.3 erklärten Beschichtungsverfahrens liegt in einer doppelten Ausführung dieses Prozesses. Konkret heißt dies, dass fertig beschichtete Kapseln noch einmal in ein pH-Bad und anschließend in ein Schellack-Bad gegeben werden. Zur Aufklärung der Unterschiede zwischen einfach und zweifach beschichteten Alginat-Matrixkapseln wurden hier NMR-Bilder von ihnen aufgenommen.

Abbildung 4.10 zeigt diese NMR-Bilder von einfach (a) und zweifach (b) beschichteten Kapseln. Im Unterschied zu den bisher gezeigten NMR-Bildern wurden die Kapseln hier in ein NMR-Röhrchen mit 10-mm Außendurchmesser gegeben, um die gleichzeitige Bildgebung an drei Kapseln zu ermöglichen. Diese Bilder zeigen, dass durch eine zweimalige Ausführung des Beschichtungsprozesses die Dicke der Schellack-Schicht von 110 µm auf 180 µm erhöht werden kann. Weiterhin zeigte sich bei dieser Messung sehr deutlich, dass es zwischen beiden Materialien eine Schicht freien Wassers gibt, die durch eine doppelte Ausführung des Beschichtungsprozesses reduziert werden kann. Die Ursache für die Verringerung des Wassers zwischen der Schellackbeschichtung und der Alginat-Matrixkapsel ist vermutlich auf ein durch den pH-Wert bedingtes Quellen des Hydrogels zurückzuführen, da es zu erwarten ist, dass der zusätzliche Beschichtungsprozess zu einem äußeren Aufbau der vorherigen Beschichtung führt.

Eine weitere Auffälligkeit liegt hier in dem Auftreten von kleinen schwarzen Punkten in den Hydrogelen der Kapseln. Diese sind darauf zurückzuführen, dass mit diesen Kapseln ein Heidelbeer-Extrakt verkapselt wurde, welcher feste Bestandteile enthält.

4.8. Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die NMR-Mikroskopie sehr gut zur Charakterisierung der makroskopischen Struktur von Pektinat- und Alginat-Mikrokapseln geeignet ist und es konnte ein Überblick über die charakterisierbaren Eigenschaften von Kapseln mit konventioneller NMR-Mikroskopie gegeben werden. Insbesondere lassen sich die Membran-

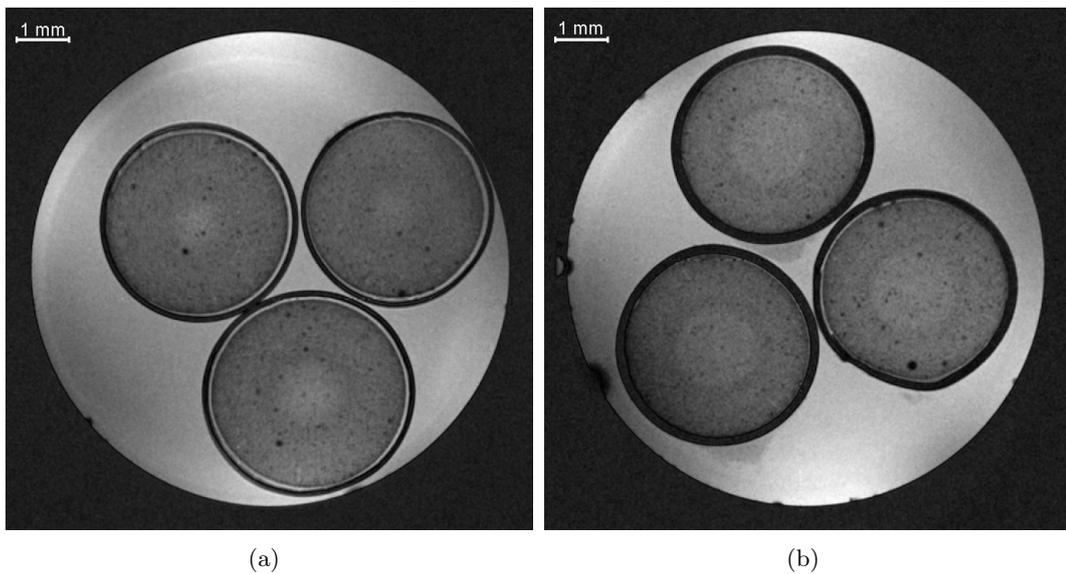


Abbildung 4.10.: NMR-Bilder schellack-beschichteter Alginat-Matrixkapseln in 10-mm Röhren. Die in (a) dargestellten Kapseln sind einfach beschichtet, wohingegen (b) zweifach beschichtete Kapseln zeigt.

strukturen von beschichteten Hohlkapseln sehr gut visualisieren, wodurch die Bestimmung von Schichtdicken möglich ist. Auf die hier bestimmten Schichtdicken wird später in Kapitel 6 nochmals zurückgegriffen, da zu diesen Kapseln dort Freisetzungskinetiken für Anthocyane präsentiert werden. Über die Bestimmung der Membrangeometrien lassen sich die zugrunde liegenden Mechanismen der Membranbildung aufklären. Da die Bestimmung der Kapselgeometrien aus den NMR-Bildern auch automatisch erfolgen kann (vgl. Abschnitt 5.3) könnte in Zukunft durch ebenfalls automatisierte experimentelle Versuchsdurchführungen und Kapselpräparationen ein sehr großer Erkenntnisgewinn bezüglich der Membranbildungsmechanismen erreicht werden.

5. Membranpermeabilitätsbestimmung mit paramagnetischen Kontrastmitteln

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Kapseln, die zur Lagerung und zum Transport verwendet werden, ist die Durchlässigkeit (Permeabilität) der Kapselwände (Membranen) für die zu verkapselnden Stoffe. Diese hängt im Allgemeinen von den Hüllmaterialien sowie den äußeren chemischen und physikalischen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Lösungsmittel, etc) ab. Die Messung dieser Membranpermeabilitäten ist ein wichtiges Instrument zur Bewertung der Verwendbarkeit der Kapseln für ihr jeweiliges Anwendungsgebiet.

Messverfahren zur Bestimmung der Membrandurchlässigkeiten basieren im Allgemeinen darauf, dass die Konzentration von in Kapseln hinein- oder aus ihnen heraus-diffundierenden Stoffen als Funktion der Zeit gemessen wird. Durch quantitative Auswertungen dieser zeitabhängigen Konzentration ist es möglich, Diffusionskoeffizienten für den jeweiligen Stoff in der Membran anzugeben. Diese Diffusionskoeffizienten sind ein objektives Maß für die Bewertung der Membranpermeabilitäten. Üblicherweise werden für Messungen dieser Art empfindliche spektroskopische Methoden, wie beispielsweise die UV-Spektroskopie, verwendet. So wurden im Rahmen dieser Arbeit die Durchlässigkeiten der Kapselwände für medizinisch bedeutsame Anthocyane bestimmt (vgl. Abschnitt 6). Die dort verwendete Methode der UV/Vis-Spektroskopie hat allerdings den Nachteil, dass dort Durchschnittswerte der Permeabilitäten von mehreren Kapseln gemessen werden. Zudem sind bei dieser Methodik noch weitere Messungen zur Bestimmung der Kapselgeometrien nötig, wenn man zur quantitativen Auswertung Diffusionskonstanten bestimmen möchte. Dies stellt insofern ein Problem dar, dass die Kapseln zwischen diesen beiden Messungen strukturellen Veränderungen unterliegen könnten, und somit ein Vergleich der Permeabilität mit der Kapselstruktur schwierig wird. Die zuvor genannten Nachteile können durch Messverfahren, die auf der orts aufgelösten NMR basieren, umgangen werden. Für die Messung von Stoffkonzentrationen ist die NMR prinzipiell geeignet. Durch den Einsatz spezieller Techniken wie der Einzelvoxel-Spektroskopie [54] oder dem *Chemical Shift Imaging* [55] ist es möglich, orts aufgelöste Spektren zu messen und damit Stoffkonzentrationen zu bestimmen. Da die NMR bezüglich der quantitativen Stoffbestimmung allerdings eine vergleichsweise insensitive Methode ist, sind die zuvor genannten Verfahren keine gute Wahl zur Bestimmung von Membranpermeabilitäten. Eine gleichzeitige adäquate Zeit- und Ortsauflösung ist im Allgemeinen nämlich nur schwer zu erreichen.

Neben den zuvor beschriebenen direkten Verfahren existieren allerdings auch indirekte Verfahren zur Konzentrationsmessung. Grundlegend für diese Verfahren ist der allgemeine Vorteil der bildgebenden NMR, dass die Signalamplituden in NMR-Bildern durch vielzählige stoffspezifische Eigenschaften hervorgerufen werden. Dies hat in der Vergangenheit zur Entwicklung

von MRT-Kontrastmitteln geführt, welche in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zu einer Abschwächung oder Verstärkung des Signals und somit zu Kontrasten zwischen Bereichen unterschiedlicher Konzentration führen. Insbesondere haben sich paramagnetische Moleküle als sehr nützlich erwiesen, welche auch hier verwendet werden. Durch paramagnetische Relaxation führen diese Moleküle zu einer Verkürzung der Relaxationszeiten der sie umgebenden Kerne. Genau dies wird hier ausgenutzt, indem NMR-Bilder von Kapseln aufgenommen werden, in welche paramagnetische Moleküle hinein-diffundieren. Die serielle Aufnahme von Bildern als Funktion der Zeit führt dabei zu zeit- und ortsabhängigen Signalamplituden und somit zu einer Visualisierung des Diffusionsprozesses. Durch die im Folgenden beschriebenen Verfahren lässt sich aus den Signalamplituden die Konzentration der Kontrastmittel als Funktion der Zeit und des Ortes ermitteln. An diese Konzentrationsprofile werden weiterhin durch numerische Lösung der Diffusionsgleichung gewonnene Simulationen angefügt, wodurch die Bestimmung von Diffusionskonstanten möglich wird.

Ähnliche Messtechniken zur orts aufgelösten Bestimmung der Konzentration von paramagnetischen Kontrastmitteln mittels der NMR-Mikroskopie wurden in der Vergangenheit beispielsweise zur Bestimmung der Kontrastmitteldiffusion in Alginat- und PVA-Hydrogelen [56, 57] sowie zur Erstellung von Konzentrations-Karten in tierischen Zell-Bioreaktor Systemen verwendet [58].

Hier werden Bestimmungen der Membranpermeabilitäten an reinen unbeschichteten Pektinatkapseln und an extern mit Schellack beschichteten Pektinatkapseln durchgeführt. Als Kontrastmittel werden Kupferionen und das aus medizinischen Anwendungen bekannte Molekül Gd-DTPA verwendet.

5.1. Paramagnetische Kontrastmittel: Gd-DTPA und Kupferionen

Im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren die prinzipiell auf nur eine inhärente Materialeigenschaft sensibel sind, wie beispielsweise der Absorptionskoeffizient in der Computertomographie, bietet die bildgebende NMR wie zuvor schon erwähnt die Möglichkeit, aufgrund vieler verschiedener physikochemischer Materialeigenschaften Kontraste zu erzeugen. Ein häufig verwendetes Verfahren zur Erzeugung von Kontrasten ist die Benutzung von paramagnetischen Kontrastmitteln, wodurch beispielsweise Blutgefäße in der kardiovaskulären MRT dargestellt werden. Die verwendeten Kontrastmittel bestehen meistens aus chemisch sehr stabilen Komplexen des stark paramagnetischen Kations Gd^{3+} . Gadolinium besitzt sieben ungepaarte Elektronen mit parallelen Spins in der innerhalb der Elektronenhülle liegenden 4f-Schale, wodurch es hochgradig paramagnetisch ist. Da die ungepaarten Elektronen auch bei chemischen Verbindungen ungepaart bleiben, bleibt auch der Paramagnetismus in Verbindungen erhalten. Gadoliniumionen sind aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu Calciumionen hoch toxisch, da sie als Calciumantagonisten die Kontraktilität des Myokards beeinflussen und das Gerinnungssystem hemmen [59]. Daher müssen Gadoliniumionen zur Verwendung als Kontrastmittel in der klinischen MRT komplexiert werden. Bislang sind etwa ein Dutzend Gadolinium-Verbindungen als Kontrastmittel zugelassen. Davon ist Gadopentetat-Dimeglumin (kurz: Gd-DTPA) eines der am häufigsten verwendeten Kontrastmittel in der klinischen Magnetresonanztomografie und wird hier u.a. als Testmolekül für die Bestimmung

der Membranpermeabilität verwendet. Es wurde 1988 als erstes Kontrastmittel für die MRT unter dem Handelsnamen Magnevist zugelassen. In Abbildung 5.1 ist die chemische Struktur des Gd-DTPA Chelatkomplexes dargestellt. Es besitzt ein Molekulargewicht von 548 Da. Das zentrale Gadolinium-Ion bindet über 8 Koordinationsstellen an den Liganden (5 an Sauerstoff und 3 an Stickstoff). Die neunte Koordinationsstelle des Gadoliniums wird von einem schnell austauschenden Wassermolekül besetzt.

Die so an das Gadolinium bindenden Wassermoleküle erfahren durch paramagnetische Wechselwirkungen eine deutliche Reduzierung ihrer Relaxationszeiten, worauf die Wirkung als Kontrastmittel beruht.

Neben diesem Gd-DTPA werden hier auch noch Kupfer(II)ionen als Kontrastmittel verwendet, die in der zweiten Oxidationsstufe aufgrund eines ungepaarten Elektrons paramagnetisch sind. Die Verwendung verschiedener Kontrastmittel mit deutlich unterschiedlicher molekularer Größe soll dabei ermöglichen, Aussagen über die Abhängigkeit der Permeabilität von der Molekülgröße zu treffen. Weiterhin können damit auch Rückschlüsse auf mikroskopische Eigenschaften der Pektinat-Hydrogele, wie beispielsweise die durchschnittlichen Porengrößen, getroffen werden.

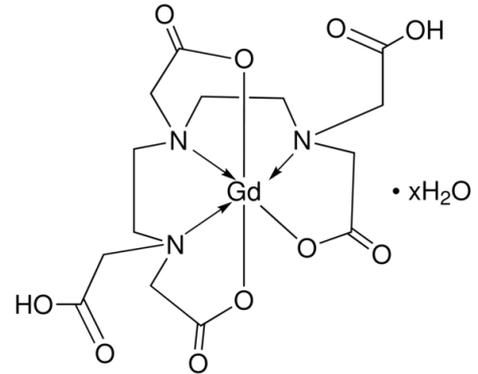


Abbildung 5.1.: Strukturformel des verwendeten Gd-DTPA Komplexes [60].

5.2. Experimentelle Durchführung

Zur Bestimmung der Membranpermeabilität wurde hier jeweils eine Kapsel in ein NMR-Röhrchen gegeben, in welchem sich eine wässrige Lösung des jeweiligen Kontrastmittels befand. Anschließend wurden T_1 -gewichtete NMR-Bilder aufgenommen. Die Konzentrationen der Kontrastmittel in der Lösung betragen dabei zu Beginn der Messung $c_0 = 1,83 \text{ mmol/l}$ Gd-DTPA bzw. $7,44 \text{ mmol/l}$ Cu^{2+} . Diesen Konzentrationen entsprechen longitudinale Relaxationszeiten von $T_1(\text{Gd-Lsg.}) = 110 \text{ ms}$ bzw. $T_1(\text{Cu-Lsg.}) = 140 \text{ ms}$. Die Kupferionen stammen hier von gelöstem Kupfer(II)sulfat.

Um sicher zu stellen, dass die Kapseln während der Messung keiner Strukturänderung unterliegen, mussten die Kontrastmittellösungen auf einen sauren pH-Wert eingestellt werden (vgl. Messungen zur Kapselauflösung in Abschnitt 7). Hier tritt das Problem auf, dass der Komplex Gd-DTPA bei niedrigen pH-Werten instabil wird. Dies hätte zur Folge, dass sowohl im Komplex gebundene als auch freie Gadoliniumionen mit jeweils unterschiedlichen Diffusionskonstanten in die Kapseln diffundieren. Daher musste ein Kompromiss bei der Wahl des pH-Wertes getroffen werden. Eine Abschätzung der Komplexbildungskonstante des Gd-DTPA-Moleküls offenbarte, dass bei einem pH-Wert von 6 eine genügend hohe Stabilität vorhanden ist. Dieser pH-Wert wurde durch zusätzlich in die Lösung gegebenes CaCl_2 in einer Konzentration von 0,5 % Gew. erreicht.

Zur Vorbereitung der Messung wurde ein 5-mm NMR-Röhrchen auf eine Höhe von etwa 3 cm mit der Kontrastmittellösung gefüllt. Zusätzlich zum Kontrastmittel enthielt das Röhrchen

noch einen Suszeptibilitäts-Plug, auf dem die Kapsel durch eine kleine Vertiefung eine stabile und vor allem zentrale Position einnehmen konnte. Um zu erreichen, dass die Kontrastmittellösung in thermisches Gleichgewicht mit der Umgebung in der auf 10 °C gekühlten Gradienteneinheit gerät, wurde das Röhrchen etwa 30 Minuten vor der eigentlichen Messung mit dem Probenkopf in die im Magneten befindliche Gradienteneinheit eingeführt. Innerhalb dieser Zeit wurde der Schwingkreis des Probenkopfes abgestimmt und das Magnetfeld „geschimmt“.

Die Permeabilitäts-Bestimmungen wurden an beschichteten und reinen Pektinatkapseln vorgenommen, die gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.3 präpariert wurden. Die beschichteten Kapseln wurden dabei mit den gleichen Herstellungsparametern¹ produziert, wie diejenigen welche in Anthocyan-Freisetzungsmessungen die geringste Durchlässigkeit aufweisen (vgl. Abschnitt 6). Da diese Kapseln nach der Herstellung in einer Lösung mit pH = 1 aufbewahrt wurden, mussten sie vor der Messung für etwa 30 Minuten in eine auf pH = 6 eingestellte CaCl₂ Lösung transferiert werden. So konnte sichergestellt werden, dass während der eigentlichen Messung innerhalb und außerhalb der Kapsel der gleiche pH-Wert vorherrscht. Die Initialisierung der eigentlichen Permeabilitäts-Messung geschah anschließend durch das Transferieren einer Kapsel in das zuvor gekühlte NMR-Röhrchen. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Kapsel möglichst schnell eine stabile Position in der Mitte des Suszeptibilitäts-Plugs einnimmt, um den Zeit-Offset zum Beginn der Bildgebung möglichst kurz zu halten. Nach dem Wiedereinbringen der Probe in den Magneten wurde die vertikale Position der Kapsel durch die Aufnahme eines Bildes einer vertikalen Schicht durch die Probe bestimmt. Anschließend wurde mit der Aufnahme von T_1 -gewichteten Bildern einer horizontalen Schicht durch die Kapsel begonnen. Durch die zuvor bestimmte Position der Kapsel konnte die Aufnahme der Bilder in einer zentralen Schicht der Kapsel stattfinden.

Die Zeit, welche zwischen dem ersten Kontakt der Kapsel mit der Kontrastmittellösung und der Initialisierung der Bildaufnahme verging, wurde gemessen und für die im Folgenden beschriebene Auswertung berücksichtigt. Sie betrug in der Regel etwa 1,5 Minuten.

Die NMR-Bilder wurden mit einer Schichtdicke von 150 μm und einem FOV von 6 mm aufgenommen. Durch die vierfache Signal-Akkumulation unter Verwendung eines CYCLOPS-Phasenzklus wurde die Entstehung von Bildartefakten unterdrückt und ein genügend hohes Signal-zu-Rausch Verhältnis gewährleistet. Durch die Wahl der Echo- bzw. Repetitions-Zeit zu 20 bzw. 150 ms zeigten die so aufgenommen Bilder einen deutlichen Kontrast zwischen Bereichen unterschiedlich hoher Kontrastmittel-Konzentration. Nach der Aufnahme eines Bildes, welche etwa 1,3 Minuten beanspruchte, wurde in Abhängigkeit von der erwarteten Geschwindigkeit des Diffusionsprozesses entweder direkt oder nach einer bestimmten Wartezeit die Aufnahme eines weiteren Bildes gestartet. So wurden je Permeabilitätsmessung zwischen 100 und 1000 einzelne NMR-Bilder aufgenommen bis eindeutig ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Kapselkern und Kontrastmittellösung hergestellt war.

Nach den Messungen wurde jeweils ein zweidimensionales „zero-filling“ und eine zweidimensionale \sin^2 -Apodisierung des \vec{k} -Raums durchgeführt. Die durch die anschließenden

¹Pektinat-Gelierzzeit = 30 s; Zeit im Schellack-Bad = 10 min; pH-Wert der Schellack-Lösung = 1.

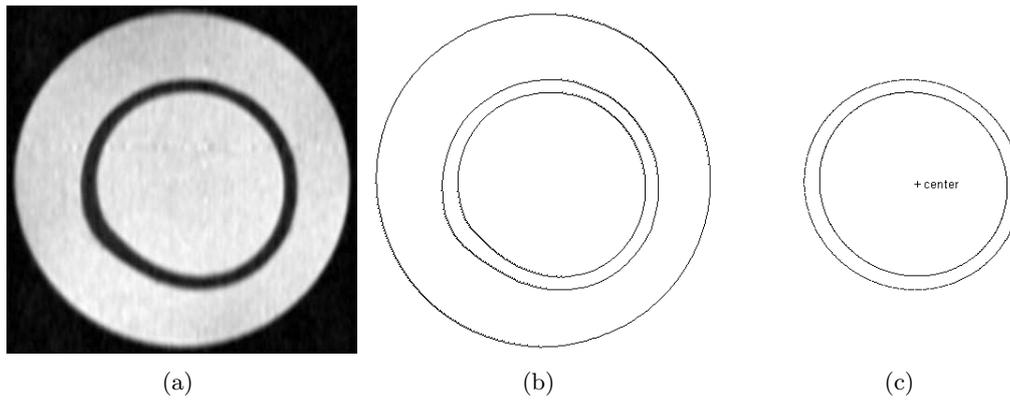


Abbildung 5.2.: Schema zur Bestimmung der Kapselgeometrie. (a) Originales NMR-Bild einer unbeschichteten Kapsel in 5-mm NMR-Röhrchen. (b) Bild (Matrix) der Konturlinien. (c) An die Konturlinien der Kapselwand angepasste Ellipsen mit dem entsprechenden Ellipsenmittelpunkt.

Fouriertransformationen erhaltenen NMR-Bilder haben eine Pixel-Größe von $(11,5 \mu\text{m})^2$.

5.3. Bestimmung der Kapselgeometrie und radialsymmetrischer Amplituden-Mittelwerte

Die automatische Ermittlung der ortsabhängigen Konzentration erfolgte mit Hilfe der Software Matlab. Folgende Schritte sind für jedes Bild einer Messreihe nötig:

1. Zuordnung der Pixel zu den verschiedenen Bereichen der Probe
2. Bestimmung der Membrandicke, des Kapselmittelpunkts und des inneren und äußeren Kapseldurchmessers
3. Mittelung der Signalamplituden gleichen Abstands zum Kapselmittelpunkt
4. Berechnung der Konzentrationen aus den gemittelten Signalamplituden

Zuerst müssen die Pixel des NMR-Bildes den verschiedenen Bereichen der Probe zugeordnet werden. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 5.2a ein NMR-Bild aus einer Messreihe dargestellt. Hier erkennt man 4 unterschiedliche Bereiche: Der flüssige Kapselkern, die Kapselmembran, die Lösung in der die Kapsel liegt, und der Bereich außerhalb des NMR-Röhrchens. Der erste Schritt der Auswerteprozedur besteht darin, dass NMR-Bild in ein binäres Bild zu verwandeln. Dazu werden die Zahlenwerte der das Bild darstellenden Matrix so verändert, dass alle Werte oberhalb (unterhalb) einer bestimmten Schwelle auf den Wert 1 bzw. 0 gesetzt werden. Dadurch erhält man eine Matrix, die den Bereichen Luft, Glas und Kapselmembran den Wert Null zuordnet, wohingegen der Bereich freien Wassers (Kapselkern und äußere Lösung) den Wert 1 erhält. Anschließend wird der zweidimensionale Gradient dieses binären Bildes berechnet. Eine neue Matrix erhält dort den Wert 1, wo der zuvor berechnete Gradient Werte annimmt, die größer oder kleiner als Null sind. Diese Matrix ist in Abb. 5.2b

dargestellt und stellt die Konturlinien des NMR-Bildes dar. An diese Konturlinien, welche die Abgrenzung der Kapselmembran repräsentieren, werden anschließend Ellipsen angefügt. Diese sind in Abb. 5.2c dargestellt. Anhand dieser Ellipsen können die Membrandicke und das Kapselzentrum bestimmt werden. Das Kapselzentrum ist dabei der Mittelpunkt der inneren Ellipse. Die Membrandicke wird durch die Differenz der jeweiligen mittleren Ellipsenradien² berechnet.

Da die Diffusion der Kontrastmittel in die Kapseln hier in erster Näherung radialsymmetrisch erfolgt, soll die Kontrastmittelkonzentration als Funktion des Abstands zum Kapselzentrum erhalten werden. Dazu werden ausgehend vom Kapselzentrum die Mittelwerte der Signalamplituden aller Pixel gebildet, die den gleichen Abstand zum Zentrum besitzen. Dies wird dadurch realisiert, dass Matrizen mit einer der Bildmatrix entsprechenden Größe erstellt werden, die auf etwa 1 Pixel dicken Kreisringen mit dem Kapselzentrum als Mittelpunkt jeweils den Wert 1 enthalten, wohingegen alle anderen Einträge 0 sind. Dabei wird für jeden Abstand zum Kapselzentrum eine Matrix erstellt, wobei der Durchmesser der Kreisringe in diesen Matrizen von zwei Pixeln mit der Schrittweite von einem Pixel bis zum mittleren Durchmesser der Kapsel inkrementiert wird. Die so erhaltenen Matrizen werden jeweils Komponentenweise mit der Bildmatrix multipliziert. Die dadurch entstehenden Matrizen, welche also die Signalamplituden gleichen Abstands zum Kapselzentrum enthalten, werden wiederum mit einer Matrix Komponentenweise multipliziert, die auf allen Pixeln, die innerhalb der inneren Konturlinie der Membran liegen (vgl. Abb. 5.2b), den Wert 1 enthalten. Dadurch wird sichergestellt, dass im Falle von nicht kreisrunden Membranen keine Signale aus dem Bereich der Kapselmembran für die Auswertung berücksichtigt werden. Anschließend wird gemäß Abschnitt 5.4 aus den Mittelwerten der Signalamplituden in jeder Matrix die Konzentration als Funktion des Abstands zum Kapselzentrum bestimmt.

5.4. Ortsaufgelöste Ermittlung der Kontrastmittel-Konzentration

Für die Amplitude der Signalstärke in einem Voxel eines NMR-Bildes, welches mit einer Spin-Echo-Sequenz aufgenommen wird, gilt allgemein der Zusammenhang

$$S(T_1, T_2) = S_0 \cdot e^{-\frac{T_E}{T_2}} \cdot \left(1 - 2e^{-\left(\frac{T_R}{T_1} - \frac{T_E}{2T_1}\right)} + e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right), \quad (5.1)$$

welcher sich durch Lösung der Bloch Gleichungen ergibt [61]. Für den Fall, dass $T_E \ll T_R$ gilt, vereinfacht sich diese Gleichung zu der aus Abschnitt 2.2 bekannteren Form

$$S(T_1, T_2) = S_0 \cdot e^{-\frac{T_E}{T_2}} \cdot \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}} \right). \quad (5.2)$$

Bei wässrigen Lösungen paramagnetischer Moleküle kann man in guter Näherung einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration der paramagnetischen Moleküle in der Lösung c und den Relaxationsraten $R_{1,2} = T_{1,2}^{-1}$ annehmen:

$$R_{1,2}(c) = k_{1,2} \cdot c + R_{1,2}(0). \quad (5.3)$$

²Mittlerer Ellipsenradius = (kleine Halbachse + große Halbachse)/2.

Dabei entspricht $R_{1,2}(0)$ der Relaxationsrate des reinen Lösungsmittels und $k_{1,2}$ der molaren Relaxivität der gelösten Substanz. Ist dieser Zusammenhang aus Messungen bekannt, so können die Relaxationsraten in Glg. 5.1 substituiert werden und die Signalamplitude wird eine Funktion der Kontrastmittel-Konzentration:

$$S(c) = S_0 \cdot e^{-T_E R_2(c)} \cdot \left(1 - 2e^{-(T_R R_1(c) - T_E R_1(c)/2)} + e^{-T_R R_1(c)} \right). \quad (5.4)$$

In dieser Funktion tritt neben der unbekanntem Konzentration c noch der weitere unbekanntem Faktor S_0 auf. Diese Gleichgewichtsamplitude S_0 gibt die Signalstärke für $T_E \rightarrow 0$ und $T_R \rightarrow \infty$ an. Die Bestimmung von S_0 ist für den Fall einfach, dass die Konzentration, welche einer bestimmten Signalamplitude zugeordnet werden kann, bekannt ist.³ In diesem Fall kann S_0 durch Umstellung von Glg. 5.4 bestimmt werden. Auf das hier durchgeführte Experiment bezogen, ist die Konzentration des Kontrastmittels in der verwendeten Kontrastmittellösung zum Zeitpunkt $t = 0$ bekannt. Man kann annehmen, dass die Konzentration des Kontrastmittels außerhalb der Kapsel im ersten aufgenommenen Bild jeder Messreihe ungefähr der Ausgangskonzentration c_0 entspricht. Diese Annahme wird durch den großen Volumenunterschied zwischen Kapsel und Lösungsmittelbad gerechtfertigt. Es ergibt sich also

$$S_0 = \frac{\langle S_{CA-sol.} \rangle_{1.Bild} - \langle \text{Rauschen} \rangle_{1.Bild}}{e^{-T_E R_2(c_0)} \cdot \left(1 - 2e^{-(T_R R_1(c_0) - T_E R_1(c_0)/2)} + e^{-T_R R_1(c_0)} \right)}, \quad (5.5)$$

wobei $\langle S_{CA-sol.} \rangle_{1.Bild}$ dem Mittelwert aller Signalamplituden aus dem Bereich außerhalb der Kapsel aber innerhalb des Röhrchens im ersten aufgenommenen NMR-Bild entspricht, und $\langle \text{Rauschen} \rangle_{1.Bild}$ dem Mittelwert des Rauschens im Bildbereich außerhalb des Röhrchens entspricht.

Um die Funktion der konzentrationsabhängigen Relaxationsraten (Glg. 5.3) zu bestimmen, wurden die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten unterschiedlich konzentrierter wässriger Lösungen der verwendeten Kontrastmittel gemessen.⁴ T_1 wurde dabei gemäß des in Abschnitt 8.1 näher erläuterten *saturation recovery*-Verfahrens ermittelt. Die Messung von T_2 erfolgte durch Spin-Echo-Messungen mit variabler Echozeit.⁵ Abbildung 5.3 zeigt die Resultate dieser Messungen, an die lineare Funktionen angepasst worden sind. In Tabelle 5.1 sind die ermittelten Parameter des linearen Zusammenhangs zwischen Konzentration und Relaxationsraten zusammengefasst. Die deutlich höheren molaren Relaxivitäten $k_{1,2}$ des Gd-DTPA-Moleküls im Vergleich zum Kupfer sind durch die verschiedenen magnetischen Momente begründet, welche eine Folge der unterschiedlichen Anzahl ungepaarter Elektronen sind.

Für die Berechnung der Konzentration anhand der Signalamplitude ist es weiterhin nötig, die

³Für den Fall, dass diese Zuordnung nicht durchgeführt werden kann, kann auf die sogenannte Null-Punkt-Methode zurückgegriffen werden [56,57]. Dabei wird die Magnetisierung vor der eigentlichen Bildgebungssequenz in einem bestimmten zeitlichen Abstand invertiert, wodurch in Bildern Punkte mit verschwindender Amplitude auftreten, wo durch das entsprechende T_1 gerade eine Magnetisierung von Null erreicht wird.

⁴Zusätzlich zum Kontrastmittel enthielten die Lösungen noch 0,5% Gew. Calciumchlorid, welches zur Einstellung des pH-Wertes benötigt wurde.

⁵Auf die T_2 -Messung mittels des genaueren und schnellerem *CPMG*-Verfahrens wurde bewusst verzichtet, da die hier verwendeten Bildgebungsverfahren auf einzelnen (nicht mehrfach refokussierten) Spin-Echos beruhen, wodurch die T_E -Abhängigkeit des Signals hier analog zur Signaldämpfung in Hahn-Echos ist.

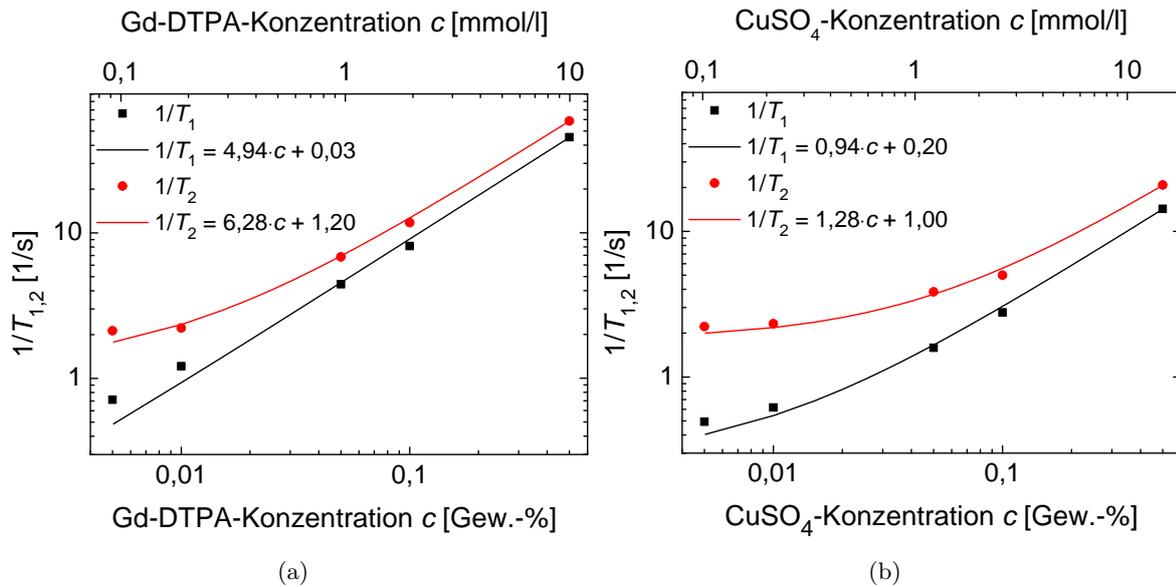


Abbildung 5.3.: Doppellogarithmische Darstellung der Relaxationsraten als Funktion der Konzentration für Gd-DTPA (a) und Cu^{2+} (b) bei 10°C . Aufgrund der logarithmischen Konzentrationsachse sind die Relaxationsraten der 0%igen Lösungen in den Diagrammen nicht dargestellt, obwohl Sie für den linearen Fit berücksichtigt wurden. Sie betragen $R_1 = 0,4\text{s}^{-1}$ und $R_2 = 1,8\text{s}^{-1}$. Die in der Legende dargestellten angepassten Funktionen beziehen sich auf die Konzentration in mmol/l .

Umkehrfunktion von Glg. 5.4 zu bilden. Diese ist analytisch nicht trivial zu berechnen. Daher erfolgte die Berechnung der zu bestimmten Signalamplituden korrelierenden Konzentrationen dadurch, dass Glg. 5.4 diskretisiert wurde. Die Konzentrationen wurden dann bestimmt, indem die Stelle (Konzentration) der diskretisierten Funktion gesucht wurde, welche die geringste Abweichung des Funktionswertes zur gemessenen Signalamplitude aufweist. In Abb. 5.4 sind die diskretisierten Abhängigkeiten der Signalamplitude von den Kontrastmittelkonzentrationen für verschiedene Werte der Repetitions- bzw. Echozeit im Bildgebungsexperiment dargestellt. Man kann gut erkennen, dass die Funktionen nicht monoton sind, was Probleme bei der eindeutigen Zuordnung der Signalamplituden zu den Konzentrationen bereitet. Um dieses Problem zu umgehen, mussten vor der Permeabilitätsmessung die Parameter T_E und T_R , sowie die Ausgangskonzentration c_0 so gewählt werden, dass die Funktion $S(c)$ im Intervall $c = [0, c_0]$ eine strenge Monotonie aufweist. Neben der strengen Monotonie mussten auch noch weitere Kriterien bei der Auswahl der Bildgebungsparameter berücksichtigt werden.

Kontrastmittel	k_1 [$\text{ls}^{-1}\text{mmol}^{-1}$]	$R_1(0)$ [s^{-1}]	k_2 [$\text{ls}^{-1}\text{mmol}^{-1}$]	$R_2(0)$ [s^{-1}]
Gd-DTPA	4,94	0,03	6,28	1,2
Cu^{2+}	0,94	0,20	1,28	1,0

Tabelle 5.1.: Mittels linearer Regression bestimmte Parameter (vgl. Glg. 5.3) zur Beschreibung der Relaxationsraten als Funktion der Konzentration von wässrigen Lösungen der Kontrastmittel Gd-DTPA und Cu^{2+} bei 10°C .

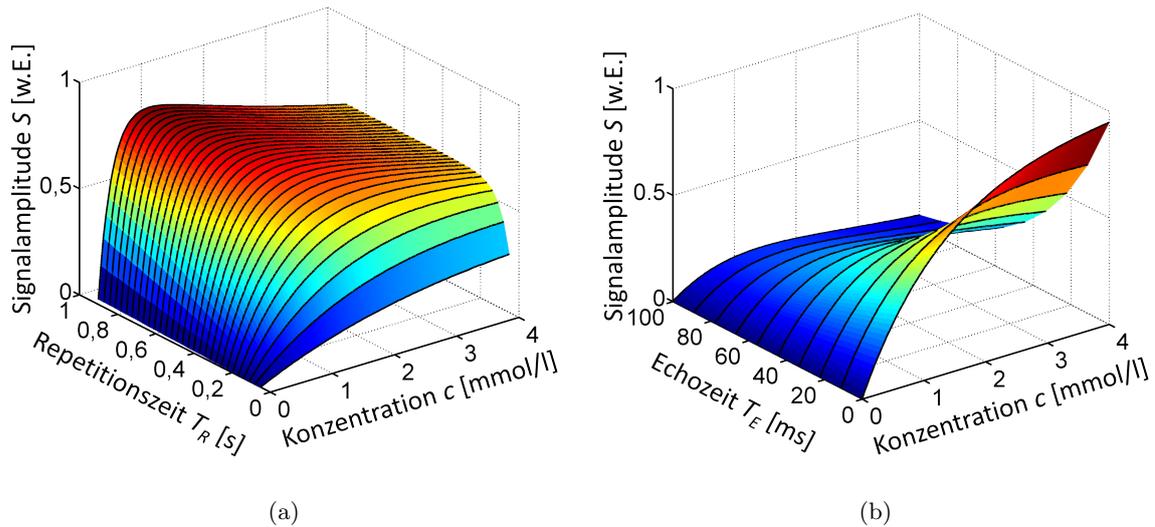


Abbildung 5.4.: Anhand von Glg. 5.1 berechnete Signalamplituden in NMR-Bildern als Funktion der Kontrastmittel-Konzentration (Gd-DTPA bei 10°C) und der Repetitionszeit (bei $T_E = 20$ ms) (a) bzw. Echozeit (bei $T_R = 150$ ms) (b).

So sollte beispielsweise die Echozeit so gewählt werden, dass die Signalamplitude bei der Ausgangskonzentration c_0 einerseits maximiert wird (kurze Echozeit), und andererseits ein guter Kontrast zwischen Kapselmembran und Kontrastmittellösung gewährleistet wird (lange Echozeit). Zusätzlich musste berücksichtigt werden, dass die Steigung der Funktion im kompletten Intervall $c = [0, c_0]$ möglichst groß wird, damit auch kleine Konzentrationsänderungen visualisierbar sind und die Konzentrationsberechnung mit einer hohen Präzision erfolgen kann. Ein weiterer Aspekt, der zu berücksichtigen war, lag in der Wahl der Repetitionszeit hinsichtlich der Zeitdauer, die für die Aufnahme eines Bildes benötigt wird. Die Zeitdauer sollte natürlich minimiert werden, damit die Kontrastmitteldiffusion mit einer hohen zeitlichen Auflösung beobachtet werden kann. Dies ist insbesondere bei schnellen Diffusionsprozessen an unbeschichteten Kapselmembranen von großer Bedeutung. Die Repetitionszeit konnte allerdings nicht beliebig reduziert werden, da ansonsten hohe Auslastungsgrade der Gradientenverstärker und -Spulen zu instabilen Versuchsdurchführungen führten.

Die beschriebenen Betrachtungen ergaben die hier für alle Experimente verwendeten Parameter $T_R = 150$ ms, $T_E = 20$ ms und $c_0(\text{CuSO}_4) = 7,44$ mmol/l bzw. $c_0(\text{Gd-DTPA}) = 1,83$ mmol/l.

5.5. Simulation des Diffusionsvorgangs

Für die Bestimmung von Diffusionskonstanten der Kontrastmittel in den Kapselmembranen ist eine Simulation des Diffusionsprozesses durch eine Lösung der Diffusionsgleichung nötig, welche hier beschrieben wird.

Kurzer theoretischer Abriss der Diffusion

Unter Diffusion versteht man einen Prozess, der aufgrund von thermischer Bewegung zu einer gleichmäßigen Verteilung von Teilchen und damit zur vollständigen Durchmischung mehrerer Stoffe führt. Grundlagen für die mathematische Beschreibung der Diffusion sind

das erste und zweite Fick'sche Gesetz [62]. Das erste Fick'sche Gesetz drückt aus, dass die Teilchenstromdichte J proportional zum Konzentrationsgradienten ist:

$$J = -D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right). \quad (5.6)$$

Dabei wird der Proportionalitätsfaktor D als Diffusionskonstante oder -koeffizient bezeichnet. Das zweite Fick'sche Gesetz ergibt sich aus der Kombination von 5.6 mit der Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{\partial J}{\partial x} \quad (5.7)$$

zu

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right) \quad (5.8)$$

bzw.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) \quad (5.9)$$

für den allgemeinen dreidimensionalen Fall.

Das 2. Fick'sche Gesetz stellt somit den Zusammenhang zwischen örtlichen und zeitlichen Konzentrationsänderungen dar. Die Lösung dieser partiellen Differentialgleichung führt zu Funktionen, welche die Stoffkonzentration in Abhängigkeit von Ort und Zeit darstellen. Bei der Betrachtung von Problemen mit Kugelsymmetrie empfiehlt sich die Darstellung der Diffusionsgleichung in Polarkoordinaten:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \left[\frac{\partial}{\partial r} \left(D r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(D \sin \theta \frac{\partial c}{\partial \theta} \right) + \frac{D}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2 c}{\partial \phi^2} \right]. \quad (5.10)$$

Bei einer Beschränkung auf den hier angebrachten Fall, dass die Diffusion mit radialer Symmetrie erfolgt, ist die Konzentration winkelunabhängig, womit sich Glg. 5.10 durch die Anwendung der Produktregel vereinfacht zu:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right). \quad (5.11)$$

Für eine analytische Lösung der radialsymmetrischen Diffusionsgleichung ist es sinnvoll, diese durch die Substitution $u = cr$ umzuformen in

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 u}{\partial r^2} \right). \quad (5.12)$$

Diese Form der radialsymmetrischen Diffusionsgleichung ist identisch mit der eindimensionalen Diffusionsgleichung 5.8. Dadurch vereinfacht sich die Lösung der radialsymmetrischen Diffusionsgleichung enorm, weil für viele Fälle auf eindimensionale Lösungswege zurückgegriffen werden kann.

Analytische Lösung der Diffusionsgleichung

Betrachtet man die Diffusion eines gelösten Stoffes aus einem gut gerührten Lösungsbad in eine Sphäre, so existieren analytische Lösungen von Glg. 5.11 [63]. Diese analytischen Lösungen sind für das hier beschriebene Experiment allerdings nicht anwendbar. Trotzdem wird die analytische Lösung hier beschrieben, da sie für eine Überprüfung der numerischen Lösung und zur Auswertung der in Abschnitt 6.4 beschriebenen Experimente zur Messung von Anthocyan-Freisetzungen verwendet wird.

Zur Lösung der Diffusionsgleichung geht man von einer Kugel aus, die sich zentral in einem sphärischen Bad mit Volumen V befindet (Vgl. Abb. 5.5). In der Kugel besitzt der gelöste Stoff die Diffusionskonstante D_m . Zur Zeit $t = 0$ ist die Kugel frei vom gelösten Stoff. Im Lösungsbad ist der gelöste Stoff zu jeder Zeit homogen verteilt und hat zur Zeit $t = 0$ die Konzentration $c = c_0$. Die Bedingung einer homogenen Verteilung des gelösten Stoffes im Bad wird experimentell durch eine Rührung des Bades gewährt. Dadurch ist die Konzentration innerhalb des Bades nur noch von der Zeit abhängig, wodurch sich die Lösung der Diffusionsgleichung deutlich vereinfacht. Zusätzlich gilt die Randbedingung, dass die Rate, mit welcher der gelöste Stoff dem Bad entweicht, der Rate entspricht, mit welcher der gelöste Stoff in die Kugel entlang der Kugeloberfläche bei $r = r_a$ eintritt:

$$\left. \frac{\partial c}{\partial t} \right|_{r=r_a} = \left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=r_a} . \quad (5.13)$$

Mit Hilfe dieser Randbedingung lässt sich die Diffusionsgleichung unter Anwendung einer Laplace-Transformation lösen und man erhält die gesamte Stoffmenge M innerhalb der Kugel als Funktion der Zeit:

$$M(t) = M(\infty) \cdot \left[1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)}{9+9\alpha+\alpha^2 q_n^2} \cdot \exp\left(-\frac{D_m q_n^2}{r_a^2} \cdot t\right) \right] . \quad (5.14)$$

In dieser Gleichung sind die Faktoren q_n die positiven und nicht verschwindenden Lösungen der Gleichung

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} . \quad (5.15)$$

Der Faktor α gibt dabei in Glgn. 5.14 und 5.15 das Verhältnis der Kugel- und Bad-Volumina an:

$$\alpha = \frac{V_{Bad}}{V_{Kugel}} . \quad (5.16)$$

Mit Glg. 5.14 liegt nun eine analytische Lösung der Diffusionsgleichung für die in Abb. 5.5a skizzierte Diffusion in eine Sphäre vor. Der umgekehrte Fall der Diffusion eines Stoffes aus einer Kugel in ein gut gerührtes Bad wird ebenfalls durch Glg. 5.14 gelöst.

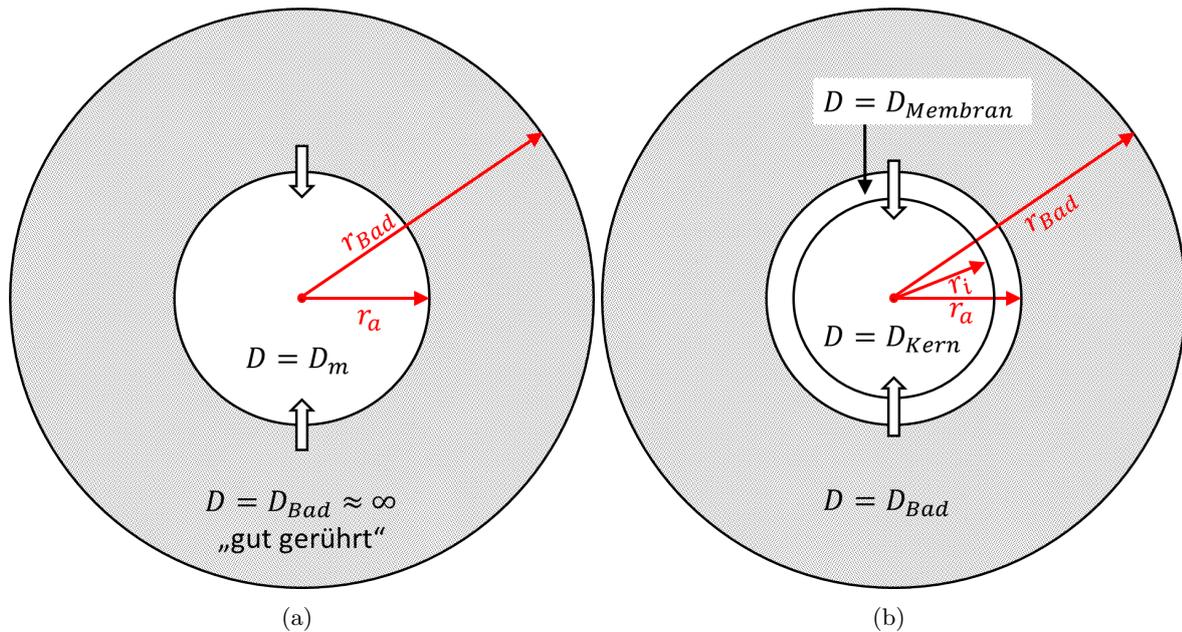


Abbildung 5.5.: Grafiken zur Erklärung der Diffusionsmodelle. Für das Modell in (a) existieren exakte analytische Lösungen (Glg. 5.14). Das Modell in (b) wird für das hier vorliegende Experiment verwendet und wird numerisch gelöst.

Numerische Lösung der Diffusionsgleichung

Das Modell, welches die Diffusion in dem hier durchgeführten Experiment beschreibt, unterscheidet sich in zwei Arten von dem zuvor dargestellten analytisch lösbaren Modell. So besitzen die hier untersuchten Mikrokapseln zum einen eine Membran und einen Kern, wodurch sich zwei Bereiche innerhalb der Kapsel mit unterschiedlichen Diffusionskonstanten ergeben. Zum anderen befindet sich das Lösungsmittelbad in Ruhe, so dass hier nicht von einer Ortsunabhängigkeit der Konzentration im Bad ausgegangen werden kann. Daher muss hier auf eine numerische Lösung der Diffusionsgleichung zurückgegriffen werden, um Diffusionskonstanten der Membranmaterialien möglichst genau zu ermitteln.

Für die numerische Lösung wird die Matlab-Funktion `pdepe` verwendet, welche parabolische Differentialgleichungen (DGL) lösen kann. Die Funktionsweise basiert darauf, dass die partielle DGL durch eine lokale Diskretisierung zweiter Ordnung in eine gewöhnliche DGL konvertiert wird und anschließend durch eine numerische Integration gelöst wird (Finite-Differenzen-Methode). Zum Lösen der Diffusionsgleichung werden die Anfangsbedingungen

$$\begin{aligned} c(r = 0 \dots r_a, t = 0) &= 0 \\ c(r = r_a \dots r_{Bad}, t = 0) &= c_0 \end{aligned} \quad (5.17)$$

verwendet, wobei r_a gemäß dem in Abb. 5.5b dargestellten Modell den Außenradius der Kapsel darstellt. r_{Bad} entspricht hier dem Radius eines sphärischen Bades, welches das gleiche Volumen besitzt wie die experimentell verwendete Kontrastmittellösung im NMR-Röhrchen. Die Randbedingungen werden so gewählt, dass die Konzentration im Kapselzentrum und am

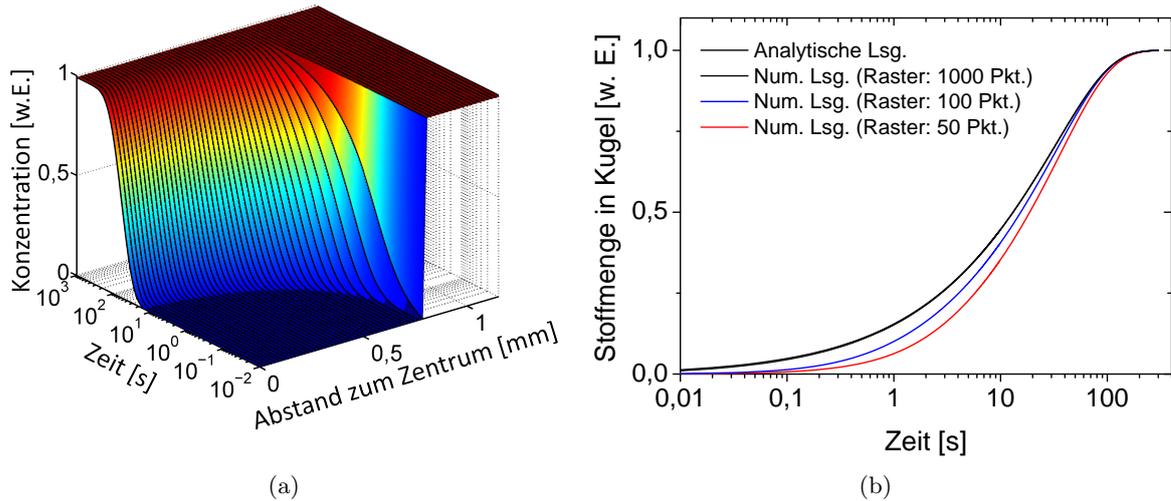


Abbildung 5.6.: (a) Konzentrationsprofil (Ausschnitt) für die Diffusion eines gelösten Stoffes mit $D = 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ aus einem gut gerührtem Bad (Volumen = 250 mm^3) mit Ausgangskonzentration $c_0 = 1,0$ in eine Kugel ohne Wand mit dem Durchmesser $1,6 \text{ mm}$ und der Ausgangskonzentration $c_0 = 0$. (b) Vergleich der gesamten gelösten Stoffmengen innerhalb der Kugel, welche sich aus der numerischen (für verschiedene Raster-Genauigkeiten) sowie der analytischen Lösung ergeben. Für große Raster-Genauigkeiten stimmen die numerische und die analytische Lösung überein und sind hier daher nicht zu unterscheiden.

Rand des Bades gegen ein horizontales Plateau strebt:

$$\left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=0} = \left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=r_{Bad}} = 0. \quad (5.18)$$

Für die Lösung werden den Bereichen Bad, Membran und Kapselkern die Diffusionskoeffizienten folgendermaßen zugeordnet:

$$\begin{aligned} D(r = 0 \dots r_i) &= D(r = r_a \dots r_{Bad}) = D_{frei}, \\ D(r = r_i \dots r_a) &= D_{mem}. \end{aligned} \quad (5.19)$$

Man erhält so in Abhängigkeit von der Diffusionskonstanten und der Kapsel- bzw. Badgeometrie die Konzentration $c_{num}(r, t)$ als Funktion der Zeit und des Abstandes zum Kapselzentrum.

5.5.1. Überprüfung der Korrektheit der numerischen Simulation

Zur Überprüfung, ob die numerische Lösung der Diffusionsgleichung korrekte Ergebnisse liefert, werden die Ergebnisse einer numerischen Lösung mit denen der analytischen Lösung nach Glg. 5.14 des in Abb. 5.5a dargestellten Systems verglichen. Da die analytische Lösung nur gilt, wenn die Kugel sich in einen „gut gerührtem“ Bad befindet, wurde in der numerischen Lösung die Diffusionskonstante im äußeren Bad auf einen sehr hohen Wert gesetzt ($D_{Bad} = 1 \text{ m}^2/\text{s}$), um so eine „gute Rührung“ zu simulieren. In Abb. 5.6a sind die orts- und zeitabhängigen Konzentrationen innerhalb einer Kugel dargestellt, wie sie sich aus der numerischen Lösung

ergeben. Da das Badvolumen, von dem hier nur ein kleiner Ausschnitt dargestellt ist, sehr viel größer als das Kugelvolumen ist, verringert sich die Konzentration im Bad hier nur unmerklich. Diese Konzentrationsprofile wurden mit verschiedenen Genauigkeiten (Inkrementen der Zeit- und Orts-Raster) simuliert. Um einen Vergleich mit der analytischen Lösung vollziehen zu können, wurden aus den Konzentrationsprofilen die gesamten gelösten Stoffmengen innerhalb der Kugel als Funktion der Zeit berechnet, welche in Abb. 5.6b dargestellt sind. Man kann hier deutlich erkennen, dass für ausreichend hohe Raster-Genauigkeiten die numerische Simulation mit der analytischen Lösung übereinstimmt.

Ähnliche Vergleiche wurden auch für den Fall durchgeführt, dass die Kugel eine Wand besitzt, in welcher der gelöste Stoff eine geringere Diffusivität aufweist. Für diesen Fall existiert eine analytische Näherungslösung, mit welcher die numerische Simulation verglichen wurde (siehe Abschnitt 6.4). Hier zeigte sich, dass zwischen beiden Lösungen eine deutliche Diskrepanz vorliegt, was somit neben dem ruhenden Bad ein weiterer Grund für die Verwendung der numerischen Lösung zur Bestimmung der Diffusionskonstanten ist.

5.6. Ergebnisse

Um den Einfluss der Schellack-Beschichtung auf die Membranpermeabilitäten aufzuklären, wurden wie in Abschnitt 5.2 beschrieben jeweils drei Messreihen von beschichteten und unbeschichteten Kapseln für jedes der beiden verwendeten Kontrastmittel aufgenommen. In Abhängigkeit von der Permeabilität der Kapselwände für das jeweilige paramagnetische Molekül bestanden die Messreihen dabei aus etwa 100 bis über 1000 einzelnen NMR-Bildern. In Abbildung 5.7a sind exemplarische NMR-Bilder der Permeabilitätsmessungen von unbeschichteten Kapseln mit Gd-DTPA als Kontrastmittel bei verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Zu Beginn der Messung befindet sich im Kapselinneren hauptsächlich Wasser ohne gelöste paramagnetische Moleküle, wohingegen sich außerhalb der Kapsel die Kontrastmittellösung befindet. Daher liefert das Kapselinnere im ersten Bild der Messreihe kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal aus dem Randbereich des flüssigen Kerns. Dies ist mit den unterschiedlichen longitudinalen Relaxationszeiten der beiden Medien (etwa 2 s im inneren der Kapsel und 100 ms außerhalb der Kapsel) in Kombination mit einer T_1 -Gewichtung der Bildaufnahme ($T_R = 150$ ms) zu erklären. Man kann deutlich erkennen, dass die Signalamplitude aus dem Kapselkern mit der Zeit ansteigt. Weiterhin erkennt man, dass bei kurzen Diffusionszeiten die Signalstärke vom Rand des Kapselkerns zum Kapselzentrum hin radialsymmetrisch abnimmt, was durch den Konzentrationsgradienten innerhalb der Kapsel zu erklären ist. Dieser Konzentrationsgradient nimmt für größere Diffusionszeiten ab. Ab einer Diffusionszeit von etwa 20 Minuten ist dieser Konzentrationsgradient kaum noch zu erkennen, da sich die Signalamplituden von Kapselkern und Kontrastmittellösung aufgrund des Erreichens eines Konzentrationsgleichgewichts angleichen.

Betrachtet man dahingegen die NMR-Bilder der Diffusion von Gd-DTPA in eine mit Schellack beschichtete Kapsel (Abb. 5.7b) fällt direkt auf, dass dort das Eindringen der paramagnetischen Moleküle deutlich langsamer erfolgt. Hier werden gleiche Signalamplituden aus Kapselkern und Kontrastmittellösung erst nach etwa einem Tag erreicht. Die vergleichsweise langsame Diffusion erklärt auch, dass ein radialer Signalstärkegradient hier nicht zu erkennen

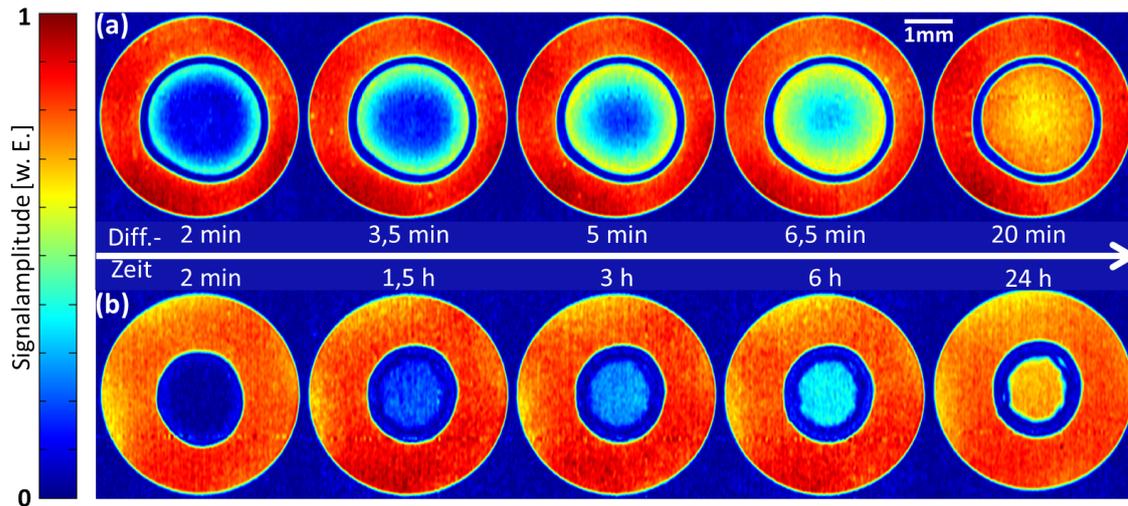


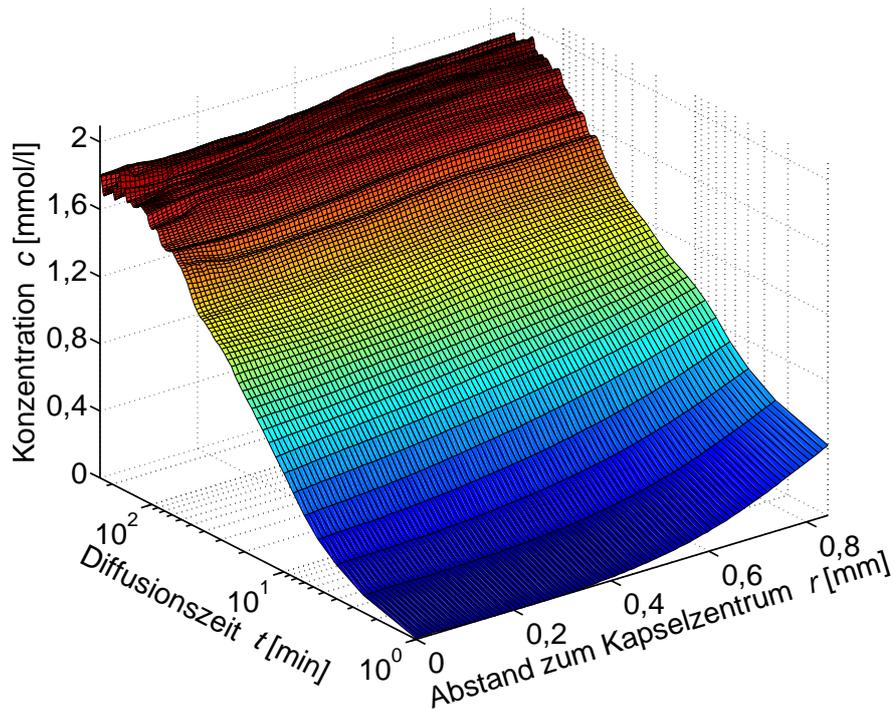
Abbildung 5.7.: Exemplarische NMR-Bilder von zwei Messreihen zur Bestimmung der Durchlässigkeiten von unbeschichteten (a) und mit Schellack beschichteten Pektinat-kapseln (b) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die mit der Zeit ansteigende Signalstärke aus dem Kern der Kapseln kennzeichnet in die Kapseln hinein-diffundierende paramagnetische Moleküle.

ist.

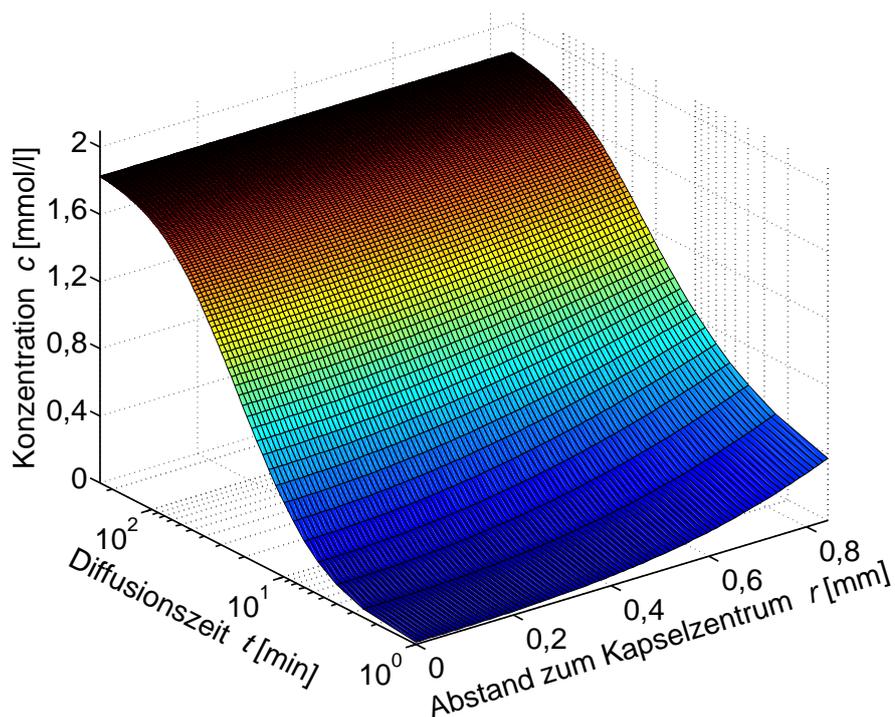
Bei einem direkten Vergleich der Kapseln in den hier dargestellten Messreihen fällt auf, dass die beschichteten Kapseln deutlich kleiner sind als die Unbeschichteten. Dies ist konform mit den in Kapitel 4.6 dargestellten Messungen und Erklärungen. Leider sind in den Bildern zur Untersuchung der Kontrastmitteldiffusion die Schellackschichten nicht durch unterschiedliche Signalamplituden von den Pektinatschichten zu unterscheiden. Dies liegt daran, dass die Bildgebungsparameter hier nicht für eine Differenzierbarkeit der unterschiedlichen Schichten, sondern für eine Visualisierung der Kontrastmitteldiffusion optimiert worden sind.

Für eine rein qualitative Bestimmung der Kapselwandpermeabilitäten würden diese NMR-Bilder schon ausreichen. Um allerdings Diffusionskonstanten für die verwendeten Kontrastmittel in den Membranen angeben zu können, müssen anhand dieser NMR-Bilder wie in den letzten Abschnitten beschrieben die Konzentrationen der gelösten paramagnetischen Moleküle als Funktion der Diffusionszeit und dem Abstand zum Kapselzentrum berechnet werden. Abbildung 5.8a stellt die experimentell erhaltenen Konzentrationen innerhalb der unbeschichteten Pektinat-kapsel aus Abb. 5.7a dar. Die Konzentrationen wurden dabei geglättet⁶, um ihre Streuung zu vermindern. Der in den NMR-Bildern schon erkennliche radiale Konzentrationsgradient ist hier insbesondere bei kurzen Diffusionszeiten deutlich zu erkennen. Nach längeren Diffusionszeiten wird dieser interne Konzentrationsgradient aufgrund des sinkenden Konzentrationsgefälles zwischen Kapselinnerem und Kontrastmittellösung weniger signifikant. Bei genügend langen Diffusionszeiten ist die Konzentration innerhalb der Kapsel homogen und erreicht hier nach etwa 100 Minuten einen Gleichgewichtswert, der

⁶Die Glättung erfolgte entlang der zeitlichen und räumlichen Dimension durch eine lokale Regression, welche einen gewichteten linearen *least squares fit* verwendet.



(a) Experimentelle Konzentrationen



(b) Angefittete Konzentrationen

Abbildung 5.8.: (a) Experimentell ermittelte und geglättete Konzentrationen des Kontrastmittels Gd-DTPA innerhalb einer unbeschichteten Pektinatkapsel als Funktion der Zeit und des Abstands zum Kapselzentrum. (b) Konzentrationsprofil aus einer an die exp. Daten angepassten numerischen Lösung der Diffusionsgleichung mit den Diffusionskonstanten $D_{mem} = 6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und $D_{frei} = 25 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

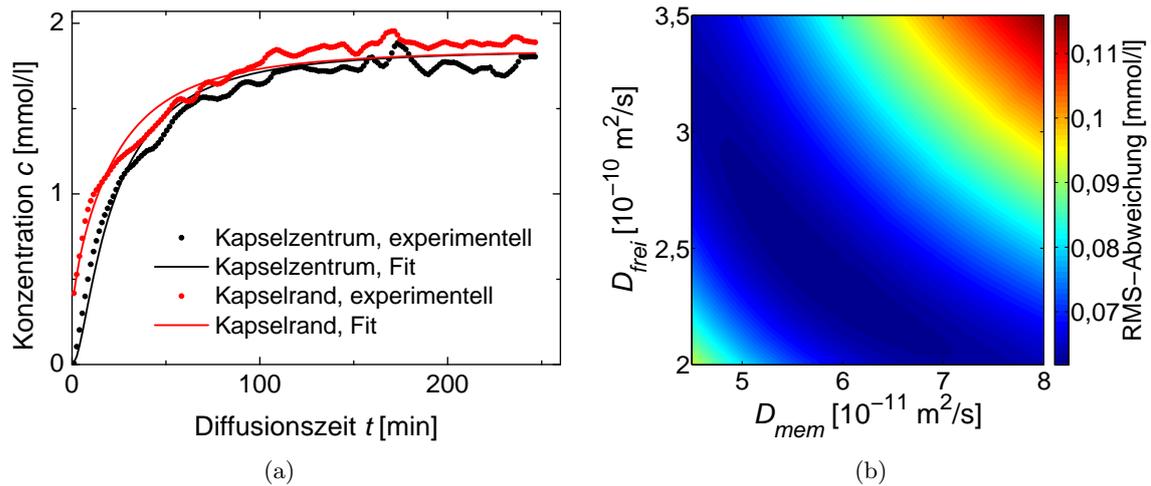


Abbildung 5.9.: (a) Vergleich der experimentellen Konzentration mit der numerisch ermittelten Konzentration als Funktion der Zeit für zwei verschiedene Orte innerhalb der Kapsel (Zentrum und Rand des flüssigen Kerns) (b) Einfluss der Diffusionskonstanten auf die RMS-Abweichung der numerischen Lösung von den experimentellen Daten.

aufgrund des Verhältnisses zwischen Kapsel- und Bad-Volumen ($V_{Bad} \approx 1000 \cdot V_{Kapsel}$) im Wesentlichen gleich der Ausgangskonzentration c_0 ist.

Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten für die jeweiligen Moleküle in den unterschiedlichen Membranen wurde die in Abschnitt 5.5 beschriebene numerische Lösung der Diffusionsgleichung an die experimentellen Daten angefitet. Die Fitprozedur bestand dabei darin, dass die Diffusionsgleichung für bestimmte vorgegebene Werte von D_{mem} und D_{frei} gelöst wurde und anschließend die Parameter-Kombination gesucht wurde, zu der die experimentellen Daten die kleinste quadratische Abweichung besitzen. Für das hier dargestellte Konzentrationsprofil wurden dabei die Diffusionskonstanten $D_{mem} = 6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und $D_{frei} = 25 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ermittelt.

Um die experimentell erhaltenen Konzentrationen mit der angefiteten numerischen Simulation quantitativ zu vergleichen, sind in Abb. 5.9a die Konzentrationen als Funktion der Zeit für den Rand des flüssigen Kerns und das Kapselzentrum dargestellt. Für kurze Diffusionszeiten zeigen sich nur unsignifikante Abweichungen. Bei längeren Diffusionszeiten zeigen sich durch Fluktuationen der experimentellen Daten hervorgerufene größere Abweichungen. Diese Fluktuationen können auf die zur Berechnung der Konzentrationen verwendete Glg. 5.1 zurückgeführt werden. Da die Ableitung der Signalfunktion nach der Konzentration $\frac{\partial S}{\partial c}$ für hohe Konzentrationen kleiner wird, führt konstantes experimentelles Rauschen zu größeren Fehlern bei der Bestimmung der Konzentration. Für eine Abschätzung der Zuverlässigkeit der angepassten Diffusionskonstanten ist in Abb. 5.9b die mittlere quadratische (RMS-)Abweichung des angefiteten vom experimentellen Konzentrationsprofil als Funktion der für die Simulation verwendeten Diffusionskonstanten dargestellt. Diese Funktion hat ihr Minimum bei den angepassten Werten für D_{mem} und D_{frei} , bei denen die relative RMS-Abweichung hier etwa 3% beträgt. Im Bereich von $D_{mem} = 5$ bis $7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und $D_{frei} = 2$

Kontrastmittel	Kapseltyp	D_{mem} [$10^{-11}\text{m}^2/\text{s}$]	D_{frei} [$10^{-11}\text{m}^2/\text{s}$]
Gd-DTPA	unbeschichtet	6 / 5 / 5	30 / 30 / 30
Cu ²⁺	unbeschichtet	11 / 11 / 11	80 / 80 / 80
Gd-DTPA	beschichtet	6 / 0,06 / ≈ 0	30 / 30 / k.A.
Cu ²⁺	beschichtet	6 / 0,02	80 / 80

Tabelle 5.2.: Diffusionskonstanten für die verwendeten Moleküle in beschichteten und unbeschichteten Membranen, sowie im flüssigen Kapselkern, welche durch einen Fit der numerischen Lösung der Diffusionsgleichung an die experimentellen Daten ermittelt wurden. Die aus verschiedenen Messungen erhaltenen Diffusionskonstanten sind durch einen Schrägstrich getrennt. Die Genauigkeiten der angefitteten Diffusionskonstanten liegen bei etwa 15% für D_{mem} und 20% für D_{frei} .

bis $3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ sind die Unterschiede der RMS-Abweichung vernachlässigbar gering. Daraus folgt eine Abschätzung der Genauigkeit der ermittelten Diffusionskoeffizienten von 15% für D_{mem} und 20% für D_{frei} . Analoge Betrachtungen an den anderen durchgeführten Permeabilitätsbestimmungen führten zu vergleichbaren Genauigkeiten. Entsprechende Auswertungen wurden für die hier untersuchten Kapselsysteme durchgeführt, wobei die Ergebnisse in Tabelle 5.2 zusammengefasst sind. Die dreifach wiederholten Experimente an unbeschichteten Kapseln lieferten in allen Fällen vergleichbare Ergebnisse. Die ermittelten Diffusionskonstanten innerhalb unbeschichteter Membranen sind dabei etwa 6 bis 7 mal geringer als die ermittelten freien Diffusionskoeffizienten $D_{frei} = 30 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und $D_{frei} = 80 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ für Gd-DTPA bzw. Kupferionen. Diese Diffusionskonstanten D_{frei} sind für alle hier durchgeführten Permeabilitätsbestimmungen jeweils übereinstimmend. Betrachtet man die Diffusionskonstanten in den Membranen beschichteter Kapseln, so lieferte jede Messung andere Werte für D_{mem} . Die Diffusionskonstanten in beschichteten Membranen variieren von $D_{mem} = 0$ bis $6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, wobei die obere Grenze der Permeabilität von unbeschichteten Membranen entspricht. Die Diffusionskonstante $D_{mem} = 0$ wurde dabei allerdings nicht angefittet sondern bedeutet, dass innerhalb einer Zeit von 4 Wochen keine Signal- bzw. Konzentrationsänderung innerhalb der Kapsel verzeichnet werden konnte. In Abbildung 5.10 sind NMR-Bilder von dieser Kapsel dargestellt. 5.10a und 5.10b zeigen die Kapsel kurz nachdem sie in die Kontrastmittel-Lösung gegeben wurde und nach einem Aufenthalt von etwa 4 Wochen in dieser Lösung. Hier sind keine Änderungen der Signalamplituden aus dem Inneren der Kapsel zu verzeichnen.

An genau dieser Kapsel wurde weiterhin noch getestet, ob Sie die gleichen Eigenschaften auch bei einer physiologischen Temperatur von 37°C besitzt. Dazu wurden bei dieser Temperatur entsprechende Diffusionsmessungen durchgeführt. In dem NMR-Bild in Abb. 5.10c erkennt man, dass auch hier keine Veränderungen der Signalamplitude aus dem Kapselkern zu erkennen sind, nachdem sich die Kapsel etwa zwei Tage bei 37°C im Kontrastmittelbad befand. Demnach scheinen mit Schellack beschichtete Kapseln prinzipiell dazu geeignet zu sein, die hier verwendeten Kontrastmittel unter physiologischen Bedingungen des oberen Gastrointestinaltraktes ausreichend zurückzuhalten.

Ergänzend wurde auch ein T_2 -gewichtetes Bild dieser Kapsel aufgenommen (Abb. 5.10d),

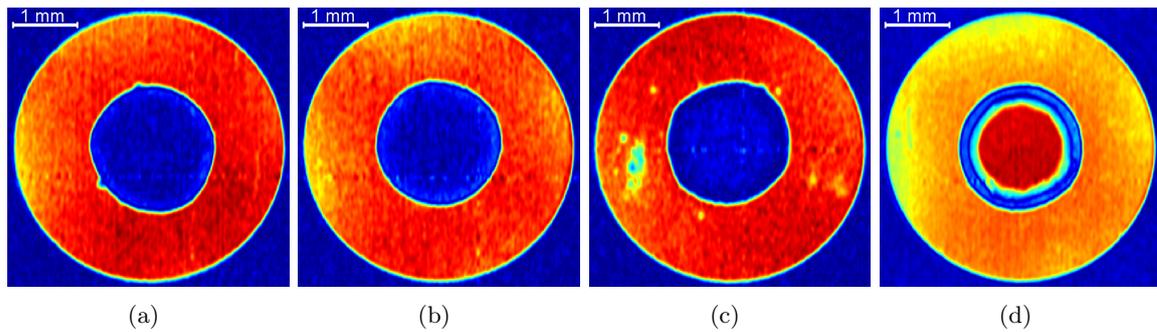


Abbildung 5.10.: NMR-Bilder der beschichteten Kapsel in Gd-DTPA-Lösung mit korrespondierender Diffusionskonstante $D_{mem} = 0$. T_1 -gewichtetes Bild (a) zu Beginn der Messung, (b) nach 4 Wochen in Kontrastmittellösung und (c) nach 2 Tagen bei 37°C . (d) T_2 -gewichtetes Bild.

in dem man ein deutliches Signal aus dem Kapselinneren erkennt. Die Signale aus dem Kapselkern sind hier aufgrund der niedrigeren transversalen Relaxationszeit deutlich stärker als die Signale der Gd-DTPA-Lösung außerhalb der Kapsel. In diesem Bild ist im Gegensatz zu den T_1 -gewichteten Bildern auch ein guter Kontrast zwischen der Pektinatschicht und der Schellack-Beschichtung zu erkennen. Aufgrund dieses NMR-Bildes ist davon auszugehen, dass im flüssigen Kapselinneren tatsächlich Wasser vorliegt und die Kapsel somit intakt ist.

5.6.1. Spezialfall: Absorption von Kupferionen in Pektinatmembranen

Abbildung 5.11 stellt das experimentelle Konzentrationsprofil innerhalb einer beschichteten Kapsel dar, in welche Kupferionen mit $D_{mem} = 0,02 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ hinein diffundiert sind. Hier fällt auf, dass die Konzentration innerhalb der Kapsel bis zu einer Diffusionszeit von ungefähr 1000 Minuten konstant bei etwa Null bleibt. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung basiert darauf, dass Kupferionen die vernetzenden Calciumionen verdrängen und ersetzen, da sie Pektinatgele ebenfalls vernetzen können. Im Gegensatz zu der Kapsel, bei der die Kupferionen deutlich schneller in die Kapsel diffundiert sind, ist die Schellack-Beschichtung hier vermutlich deutlich undurchlässiger für die Kupferionen. Hier diffundieren die Kupferionen wahrscheinlich so langsam durch die Schellackschicht, dass sie anfangs gar nicht den flüssigen Kapselkern erreichen, sondern zunächst im Pektinatgel durch die Ersetzung von Calciumionen „absorbiert“ werden. Erst wenn das Pektinatgel mit Kupferionen gesättigt ist, erreichen die Kupferionen das Kapselinnere, wodurch die Konzentration dort ansteigt. Dieser Prozess wird bei der numerischen Lösung der Diffusionsgleichung für diese experimentellen Daten berücksichtigt. Ein zusätzlicher Parameter gibt in der numerischen Lösung eine Zeit an, bis zu welcher die Diffusionskonstante innerhalb der Kapselmembran den Wert $D = 0$ annimmt. Dieser Parameter beträgt für den vorliegenden Fall 1300 Minuten. Dies ist natürlich nur in erster Näherung ein anwendbares Auswerteverfahren, da strenggenommen die Diffusionsgleichung um einen Term, welcher die Absorption berücksichtigt, ergänzt werden müsste. Da allerdings zu wenig Informationen über den Absorptionsprozess vorliegen, ist die durchgeführte Weise hier zweckmäßiger.

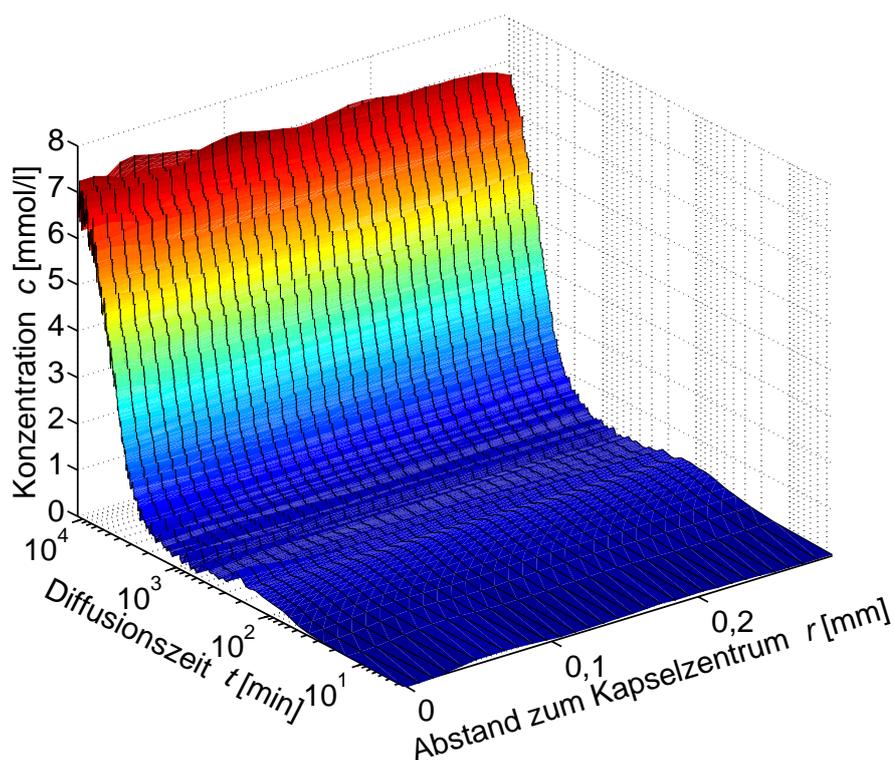


Abbildung 5.11.: Experimentell ermitteltes Konzentrationsprofil der Diffusion von Kupferionen in eine mit Schellack beschichtete Pektinat-Mikrokapsel. Der verzögerte Anstieg der Konzentration zu Beginn der Messung ist auf eine Absorption der Kupferionen im Pektinatgel zurückzuführen.

5.7. Diskussion

Vergleich der experimentell bestimmten Diffusionskoeffizienten mit Literaturwerten

Chen et al. [64] haben die Diffusionskonstante von Kupferionen in Wasser zu $D = 60 - 80 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt. Dieser Wertebereich deckt sich gut mit dem hier bestimmten Wert von $D = 80 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Von dem hier verwendeten Gd-DTPA-Molekül sind bislang keine Diffusionskonstanten bekannt. Daher wurde versucht, diese in D_2O durch PFG-NMR⁷ zu bestimmen. Das war allerdings nicht erfolgreich, da im Protonenspektrum des Gd-DTPA-Moleküls die von den Protonen des Komplexbildners stammenden Signale sehr schwach sind. Begründet werden kann das zum einen mit der geringen Konzentration der Moleküle im nicht hundertprozentig wasserfreiem D_2O , und zum anderen mit der schnellen Relaxation der Protonen bedingt durch die Nähe zum paramagnetischen Gadolinium-Ion.

Elst et al. [65] haben allerdings temperaturabhängig die Diffusionskonstante des zum Gd-DTPA ähnlichen Komplexes La-(DTPA-BMA) bestimmt, dass sich bezüglich der Diffusionskonstanten vermutlich nur geringfügig von dem hier verwendeten Molekül unterscheidet.⁸ Eine lineare Extrapolation auf die hier benutzte Temperatur von 10°C resultiert in einer

⁷Gepulste-Feldgradienten-NMR. Eine nähere Erläuterung ist in Abschnitt 6.2.1 zu finden.

⁸Die Unterschiede liegen im Zentralion (Gd vs. La), und in der Ersetzung der Hydroxyl-Gruppen durch MeNH Restgruppen.

Diffusionskonstante von $D = 26 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die hier bestimmte Diffusionskonstante von $D = 30 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

Literaturwerte von Gd-DTPA oder Kupferionen in Pektinatgelen sind nicht bekannt. Allerdings haben Chen et al. [64] und Jang et al. [66] die Diffusionskonstanten von Kupferionen in Alginat-Gelen zu etwa $D = 100 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt, zu denen die hier erhaltenen Diffusionskonstanten in Pektinatgelen um den Faktor 10 geringer sind. Das könnte damit zu erklären sein, dass die Dichte an positiven Ladungen (vernetzende und nicht-vernetzende Calciumionen) im Pektinatgel höher ist als im Alginatgel, wie es auch schon in Abschnitt 4.3 geschlussfolgert wurde. Diese größere Menge an positiven Ladungsträgern könnte zu einer Abbremsung der in die Kapsel hinein-diffundierenden Kupferionen führen.

Erklärung der Permeabilitäts-Streuung in beschichteten Membranen durch dreidimensionale Bildgebung

Die große Streuung der Diffusionskonstanten bei beschichteten Kapseln legt die Vermutung nahe, dass der feste Schellack an sich undurchlässig für die hier verwendeten Moleküle ist. Die unterschiedlich ausgeprägten Permeabilitäten wären ein Hinweis darauf, dass die Schellackbeschichtung unterschiedliche Qualitäten aufweist. So könnte der Schellack an einigen Stellen zu dünn sein oder gar nicht vorhanden sein (Beschichtungs-Defekte). Durch diese Defektstellen könnten die Kontrastmittel dann nahezu ungehindert in die Kapsel hinein diffundieren. Das Auftreten von Defekten ist ein bekanntes Problem beim Beschichten [67]. Die Defekte könnten dabei ein Resultat des Herstellungsprozesses sein, oder der Schellack könnte sich auch nachträglich, zum Beispiel beim Überführen der Kapseln in die NMR-Röhrchen, abgelöst haben.

Um die angestellten Thesen zu überprüfen ist es nötig, die Beschichtungen von Kapseln mit bekannter Permeabilität vollständig auf Defekte bzw. Ungleichmäßigkeiten zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden mittels der der Mehrschicht-Bildgebung (vgl. Abschnitt 2.2.5) von übereinander liegenden Schichten der Kapsel dreidimensionale Bilder der Kapseln rekonstruiert. Die Kapseln, zu denen die Permeabilitäten aus Tabelle 5.2 bestimmt wurden, waren allerdings nicht mehr vorhanden. Daher wurden vor der Aufnahme von dreidimensionalen Bildern Kapseln gesucht, welche deutlich unterschiedliche Permeabilitäten aufweisen. Dies geschah dadurch, dass mehrere Kapseln in eine Kontrastmittel-Lösung gegeben wurden und anschließend nach einer bestimmten Diffusionszeit T_1 -gewichtete Bilder aufgenommen wurden. Die Kapseln, welche nach identischer Diffusionszeit die geringste bzw. höchste Signalamplitude im Kapselinneren aufwiesen, wurden für die Aufnahme der dreidimensionalen Bilder herangezogen.

Abbildungen 5.12a und c zeigen die dreidimensional rekonstruierten Oberflächen der untersuchten Kapseln. Die in 5.12a dargestellte Kapsel weist über die gesamte Oberfläche eine glatte und intakte Schellackbeschichtung auf. Diese Kapsel wies keine Permeabilität für die untersuchten Kontrastmittel auf. Dahingegen erkennt man an der in 5.12c dargestellten Kapsel deutlich einen Riss in der Schellack-Beschichtung. Diese Kapsel wies eine hohe Permeabilität für die untersuchten Kontrastmittel auf. In den Schnittbildern rechts neben den Bildern der gesamten Oberfläche erkennt man, dass es nur die Schellackschicht ist, welche einen Defekt

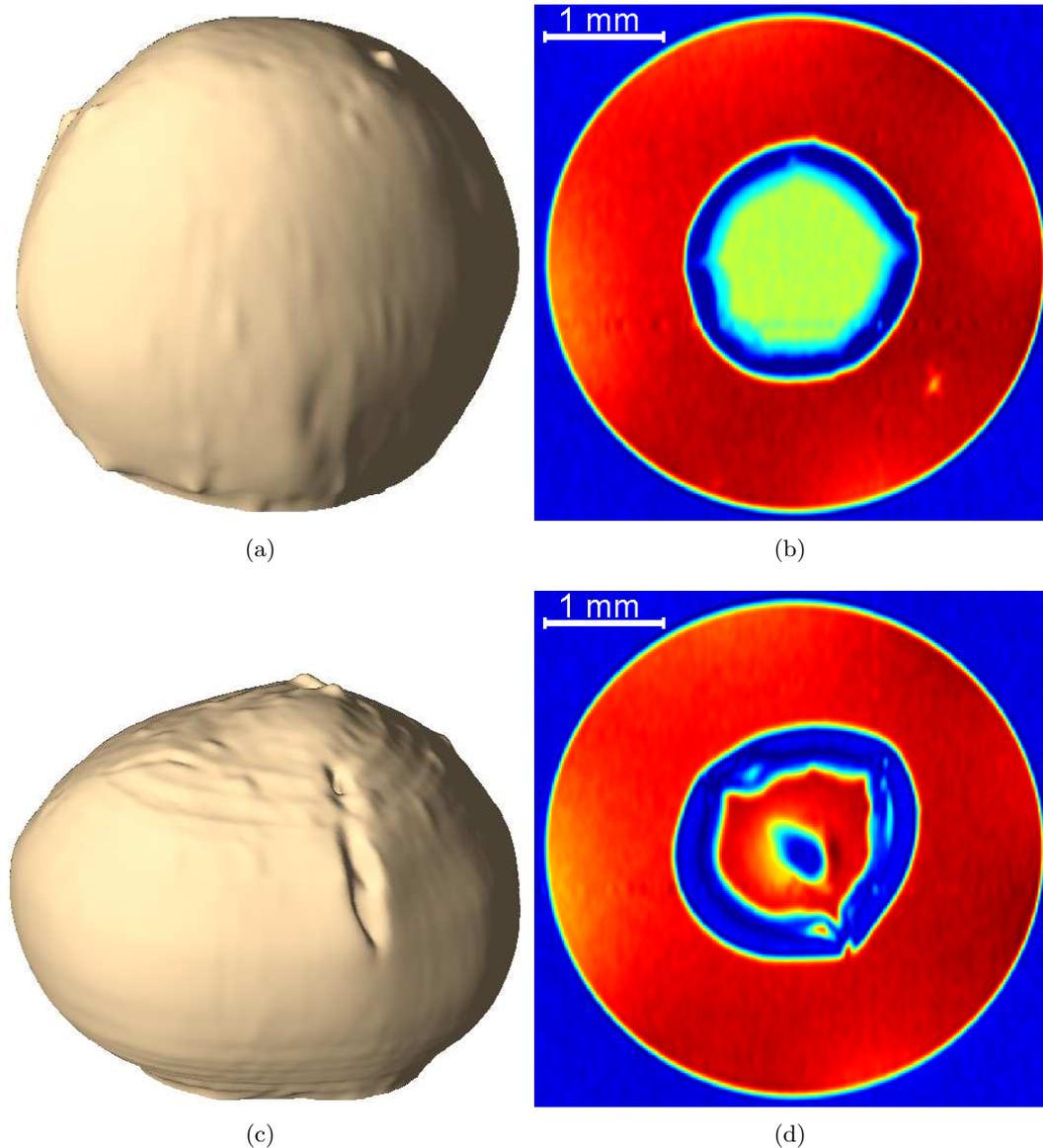


Abbildung 5.12.: Mittels Multischicht-Bildgebung erhaltene dreidimensionale Rekonstruktionen der Oberflächen von Mikrokapseln mit intakter (a) und beschädigter (c) Beschichtung. In (b) und (d) sind exemplarische zweidimensionale NMR-Bilder der Kapseln dargestellt, aus denen die dreidimensionalen Bilder rekonstruiert wurden.

aufweist, wohingegen die Pektinatschicht intakt ist. Diese Beobachtungen bekräftigen die oben aufgestellte These der Defektstellen als Ursache der unterschiedlichen Permeabilitäten der beschichteten Kapseln.

5.8. Zwischenfazit

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die NMR-Mikroskopie sehr gut geeignet ist, die Permeabilität von Mikrokapselmembranen zu bestimmen. Durch die Aufnahme von T_1 -gewichteten Bildern als Funktion der Zeit konnte das Hineindiffundieren von paramagnetischen Molekülen in beschichtete und unbeschichtete Pektinatkapseln visualisiert werden.

Es ist gelungen, anhand der Bilder die Konzentration der paramagnetischen Kontrastmittel als Funktion der Zeit und des Ortes innerhalb der Kapsel darzustellen. Der Vergleich dieser Konzentrationsprofile mit numerischen Lösungen der an die experimentellen Bedingungen angepassten Diffusionsgleichung ließ eine Ermittlung von Diffusionskonstanten zu. Hinsichtlich der Diffusionskonstanten in der Membran hat sich gezeigt, dass diese für unbeschichtete Kapseln reproduzierbar sind und im Vergleich zur freien Diffusionskonstante etwa die gleiche relative Verringerung um den Faktor 6 bis 7 erfahren. Dahingegen variieren die Diffusionskonstanten von beschichteten Kapseln in einem großen Bereich zwischen Werten, die einer kompletten Undurchlässigkeit nahekommen und solchen, die vergleichbar mit unbeschichteten Kapseln sind. Als Ursache für diese starke Streuung konnten durch die dreidimensionale Visualisierung von kompletten Kapseln Defekte in der Schellack-Beschichtung ausgemacht werden.

Die Permeabilitäten wurden für Substanzen bestimmt, die für Anwendungen der Kapseln nicht besonders relevant sind. Die hier vorgestellte Methodik kann allerdings dazu verwendet werden, um die Permeabilitäten für zu verkapselnde Stoffe abzuschätzen, wenn man die Molekulargrößen oder sonstige chemische Eigenschaften, wie beispielsweise die Ladung, miteinander vergleicht. Eine andere Weise, um mit der hier vorgestellten Technik die Permeabilitäten für andere nicht-paramagnetische Stoffe zu bestimmen, bestünde in einer Markierung dieser Moleküle mit sogenannten Spin-Labels [68].

Die hier untersuchten Kapseln sollen eine Möglichkeit zur kontrollierten Freisetzung von Anthocyanen im Darm liefern. Diese Anthocyane besitzen mit einem Molekulargewicht zwischen 400 und 1200 g/mol vermutlich geringere Permeabilitäten als die hier verwendeten Kontrastmittel. Daher ist davon auszugehen, dass mit Schellack-beschichteten Pektinatkapseln ein System vorliegt, mit dem der geschützte Transport von Anthocyanen durch die sauren Bestandteile des Gastrointestinaltraktes ermöglicht wird, wenn der Beschichtungsprozess soweit optimiert werden kann, dass die Schellackbeschichtungen möglichst wenig Defektstellen aufweisen.

6. Freisetzungen von Anthocyanen aus beschichteten und unbeschichteten Pektinatkapseln

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, wie die Durchlässigkeiten (Permeabilitäten) von Kapselmembranen durch die NMR-Mikroskopie mit Hilfe paramagnetischer Kontrastmittel bestimmt werden können. Bezüglich des geplanten Anwendungsgebietes der hier verwendeten Kapseln als Transportmedium für ein anthocyanhaltiges Heidelbeer-Extrakt ist es von besonderem Interesse, die Permeabilitäten für Anthocyane zu bestimmen. Anthocyane sind von Natur aus nicht paramagnetisch, so dass deren Permeabilitäten ohne weiteres nicht mit der NMR-Bildgebung bestimmt werden können. Dies wäre nur möglich, wenn man auf NMR-spektroskopische Methoden zurückgreifen würde bzw. die Anthocyan-Moleküle mit Spin-Labels versehen könnte um in NMR-Bildern eine konzentrationsabhängige Signalstärke zu erhalten. Durch die Kooperation mit dem Lehrstuhl Physikalische Chemie II der TU-Dortmund standen glücklicherweise einfachere Methoden zur Verfügung, mit denen die Anthocyan-Permeabilitäten bestimmt werden konnten. Wie der Name schon vermuten lässt, absorbieren Anthocyane Licht im sichtbaren Spektralbereich. Daher wurden die hier dargestellten Messungen von Anthocyan-Freisetzungen zur Bestimmung der Permeabilitäten in Zusammenarbeit mit Dr. Sabine Leick mittels der UV-/Vis-Spektroskopie bestimmt. Die Freisetzungen wurden dabei für die bereits in Kapitel 4.6 bezüglich ihrer makroskopischen Struktur charakterisierten Kapselsysteme gemessen. Die Kombination der Ergebnisse dieses Kapitels mit den Schichtdicken lässt es zu, weitere Aussagen über die strukturellen Eigenschaften der Membranschichten zu treffen.

6.1. Grundlegendes zu Anthocyanen

Anthocyane zählen zu den Flavonoiden und sind wasserlösliche, sekundäre Pflanzenfarbstoffe [69]. Sie sind im Zellsaft fast aller Landpflanzen zu finden und verleihen den Pflanzen eine rote, violette, blaue oder blauschwarze Färbung. Sie erfüllen dort wichtige Aufgaben, wie dem Schutz vor UV-Strahlung, die Bindung freier Radikale sowie das Anlocken von Insekten zur Vermehrung. In sehr hoher Konzentration sind Anthocyane beispielsweise in Heidelbeeren, Brombeeren und Himbeeren zu finden [70].

Die chemische Struktur der zu den Polyphenolen zählenden Anthocyane ist in Abb. 6.1 dargestellt. Das Grundgerüst besteht aus dem Heterozyklus Pyran (C-Ring) mit einem an-kondensierten Benzolring (A-Ring). Der Pyranring ist dabei außerdem an einen Phenylrest (B-Ring) gebunden. Durch diesen aromatischen Grundkörper und die konjugierten Doppelbin-

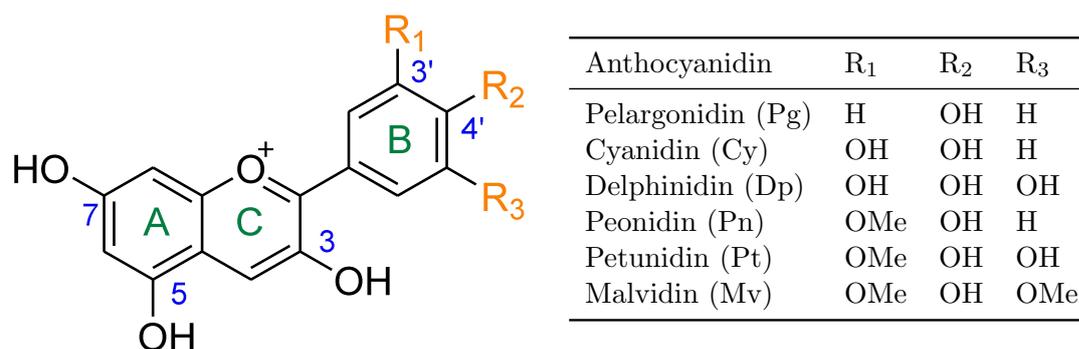


Abbildung 6.1.: Chemische Struktur der sechs häufigsten Anthocyane [18].

dungen kommt die Farbigeit der Anthocyanverbindungen zu Stande [71]. Der Pyranring des Grundgerüsts kann verschiedene Substituenten wie Methoxy- oder Hydroxylgruppen tragen. Das Molekulargewicht der meisten Anthocyane liegt zwischen 400 und 1200 g/mol [72]. Die Anthocyane lassen sich in Abhängigkeit von dem an Position 3 gebundenen Rest in zuckerfreie Anthocyanidine (Aglykone) und Anthocyane (Glykoside) unterteilen. Die Glykoside weisen an Position 3 des C-Rings (manchmal auch an Position 5 oder 7 des A-Rings) gebundene Zuckermoleküle auf. Von den Aglykonen sind heute 17 verschiedene bekannt. Die Restgruppen der sechs am häufigsten vorkommenden Aglykone sind in der Tabelle in Abb. 6.1 dargestellt. Diese zuckerfreien Anthocyanidine sind in der Natur allerdings nur selten vorzufinden. Natürlich liegen die Anthocyane meistens in der Glykosidform vor, von denen über 600 verschiedene bekannt sind.

Den Anthocyanen werden bislang viele gesundheitsfördernde Eigenschaften nachgewiesen. So wurde gezeigt, dass sie ein großes Potential zur Vorbeugung von Krebs und Diabetes besitzen sowie chronische Herz-Kreislauf-Erkrankungen vermindern und die Sehschärfe verbessern können. Außerdem weisen sie entzündungshemmende, gefäßschützende und anti-oxidative Wirkungen auf. [3, 73] Leider liegt die Bioverfügbarkeit der Anthocyane durch den Verzehr von Früchten oder Säften nur bei etwa 1 %, da sie nur in sehr geringem Ausmaß vom Körper aufgenommen werden bzw. schnell metabolisiert werden. Eine höhere Bioverfügbarkeit könnte durch einen geschützten Transport durch den Magen trakt und eine anschließende gezielte Freisetzung im Darm trakt ermöglicht werden [3].

6.2. Selbstdiffusionskonstante der Anthocyane

Für die quantitative Auswertung der im nächsten Kapitel vorgestellten Freisetzungskinetiken ist es vorteilhaft, die Diffusionskonstante der Anthocyane in Wasser zu ermitteln. Hierfür ist die NMR durch den Einsatz gepulster Magnetfeldgradienten besonders gut geeignet und heutzutage das am häufigsten angewandte Verfahren zur Messung von Selbstdiffusionskonstanten [74–77].

6.2.1. Grundlagen der Bestimmung von Diffusionskonstanten mittels der gepulsten-Feldgradienten-NMR

Wie die NMR-Bildgebung basiert die Diffusionskonstantenmessung mittels der NMR ebenso auf (gepulsten) Gradientenfeldern. Durch diese Gradientenfelder wird die Larmorfrequenz innerhalb einer Probe eine Funktion des Ortes. Bewegen sich Kerne also innerhalb eines Gradientenfeldes, so verändert sich ständig ihre Larmorfrequenz. Das Ausmaß dieser Frequenzänderung hängt dabei von der Stärke des Gradientenfeldes und der zurückgelegten Wegstrecke des Moleküls ab. In dem Fall, dass die Bewegung der Kerne durch reine Selbstdiffusion und nicht durch einen gleichmäßigen Fluss hervorgerufen wird, ergibt sich eine mit der Zeit immer breiter werdende Gauß-Verteilung der Larmorfrequenzen. Dadurch wird eine Dämpfung der Signalamplitude von Spin-Echos verursacht, die u.a. von der Diffusionskonstanten und der Gradientenstärke abhängt.

Zur experimentellen Umsetzung sind heute mehrere Verfahren bekannt, welche alle auf der Formierung von Spin-Echos oder stimulierten Echos in Kombination mit gepulsten oder statischen Gradientenfeldern basieren. Hier wird die Diffusionskonstante von Anthocyanen mittels der sogenannten PGSE-Sequenz (*pulsed gradient spin echo*) gemessen. Wie in Abbildung 6.2 dargestellt ist, werden hier vor und nach dem refokussierenden π -Puls in einer Hahn-Echo-Sequenz gepulste Magnetfeldgradienten geschaltet. Diese sorgen dafür, dass sich das zur Zeit T_E bildende Spin-Echo in Abhängigkeit von der Diffusionskonstanten D , der Gradientenstärke G , der Diffusionszeit Δ und der Dauer der Gradientenpulse δ gedämpft wird. Dabei gilt nach Stejskal und Tanner [78] der Zusammenhang

$$S = S_0 \cdot \exp\left(-\frac{T_E}{T_2}\right) \cdot \exp(-\gamma^2 D G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)) . \quad (6.1)$$

Bei konstanter Echozeit ergibt sich durch Einführung der Variablen $q = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ der vereinfachte Zusammenhang

$$S = S_0 \cdot \exp(-qD) . \quad (6.2)$$

Zur Messung der Diffusionskonstanten werden nun üblicherweise Spin-Echos mit variablen Gradientenstärken aufgenommen. Dabei ist es von großer Wichtigkeit, die Stärken der Gradienten möglichst genau zu kalibrieren. Die genaueste Kalibration der Gradientenstärken kann dadurch erfolgen, dass das Spin-Echo einer (wasserhaltigen) Probe mit bekannten Abmessungen unter dem Einfluss von Gradientenfeldern gemessen wird. Das resultierende Spektrum erfährt durch den Gradienten eine Verbreiterung, die proportional zu der Gradientenstärke und der Länge der räumlichen Projektion der Probe auf die Gradientenrichtung ist. Eine andere Methode zur Gradientenkalibrierung besteht darin, die gradientenbedingte Signalabschwächung von Proben mit bekannten Diffusionskoeffizienten zu betrachten und so die Stärke der Gradienten anzupassen. Die erste Methode ist aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Diffusionskonstanten und der im Allgemeinen schwierigen Kontrolle der

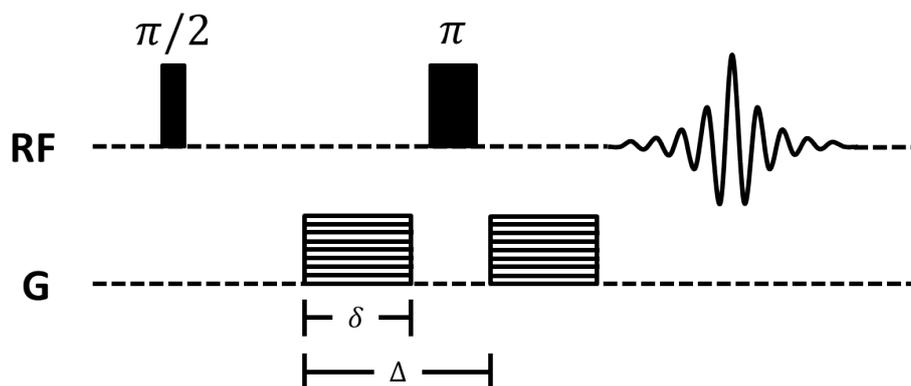


Abbildung 6.2.: Zur Messung der Diffusionskonstanten verwendete PGSE-Pulssequenz.

Probentemperatur der zweiten Methode vorzuziehen. Da hier allerdings zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keine Probe mit definierter Geometrie vorhanden war, wurde zur Kalibration auf Literaturwerte der Diffusionskonstanten von HDO in Wasser zurückgegriffen, welche bei Raumtemperatur bei $D = 1,902 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ liegt [79]. Damit konnte durch eine Messung des HDO-Signalzerfalls in einer PGSE-Sequenz die maximale Gradientenstärke des hier verwendeten Probenkopfs *DOTY 1025* zu $G_{max} = 9,2 \text{ T/m}$ bestimmt werden.

6.2.2. Durchführung und Ergebnisse

Die Messung der Diffusionskonstanten von Anthocyanen erfolgte an einer Probe bestehend aus 99,9%igen D_2O mit 10% Gew. Heidelbeer-Extrakt. Abbildung 6.3a zeigt das aus einem Spin-Echo erhaltene ^1H -Spektrum der Probe. Um ein ausreichend starkes Signal-zu-Rausch-Verhältnis der nicht vom Wasser stammenden Signale zu erhalten, wurde das Experiment 128 mal wiederholt und die Signale akkumuliert. Trotz des verwendeten deuterierten Wassers wird das Spektrum hier vom Wassersignal bei etwa 5 ppm chemischer Verschiebung dominiert. Die Amplitude des Wasserpeaks ist etwa 20 mal höher als der hier dargestellte Bereich. Die Dominanz des Wassersignals hat den Nachteil, dass die vom Heidelbeer-Extrakt stammenden Peaks von den Flanken des Wasserpeaks überlagert sind. Die Peaks um $\delta \approx 4 \text{ ppm}$ stammen vermutlich von den Zuckermolekülen des Heidelbeerextrakts und können somit nicht für die Ermittlung der Anthocyan-Diffusionskonstanten verwendet werden. Laut Wyzgoski et al. [80] besitzen die CH-Protonen an Position 6 des A-Rings (siehe Abb. 6.1) eine chemische Verschiebung von 6,7 ppm. Der an dieser Stelle befindliche Peak (Pfeil in Abbildung 6.3a) wird daher für die Bestimmung der Diffusionskonstanten verwendet.

In Abbildung 6.3b ist die logarithmierte Amplitude dieses Peaks gegen q aufgetragen. Aufgrund der Überlagerung des Anthocyanin-Peaks mit den Flanken des Wasserpeaks ist hier kein einfacher linearer Zusammenhang zu erkennen, da dieses Signal von zwei unterschiedlich schnell diffundierenden Molekülen stammt. Die Wassermoleküle diffundieren aufgrund ihrer geringeren Größe allerdings deutlich schneller als die Anthocyan-Moleküle. Daher zeigen die Signalamplituden für große q und somit starken Gradientenfeldern einen linearen Verlauf, weil hier die vom Wasser stammenden Signale schon unmessbar schwach sind. An diesen linearen

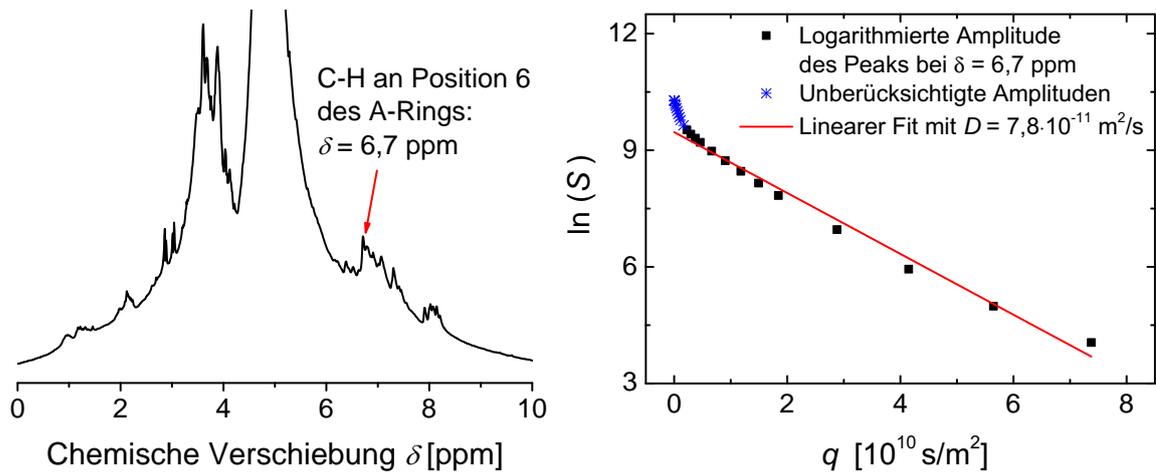


Abbildung 6.3.: a) ^1H -Spektrum von in D_2O gelöstem Heidelbeer-Extrakt. b) Abhängigkeit der Signalamplituden des Anthocyanin-Peaks von q bei $\Delta = 5$ ms, $\delta = 2$ ms und $T_E = 10$ ms inklusive Anpassung von Glg. 6.2.

Verlauf wurde Glg. 6.2 angefitet und dadurch die Diffusionskonstante der Anthocyane bei Raumtemperatur zu

$$D_{\text{Anthocyan}} = (7,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s} \quad (6.3)$$

bestimmt.

6.3. Ermittlung der Anthocyan-Freisetzung durch die UV/Vis-Spektroskopie

In Abhängigkeit von ihrer genauen Struktur und dem pH-Wert absorbieren Anthocyane UV-Strahlung mit Wellenlängen zwischen 270 und 290 nm sowie sichtbares Licht mit Wellenlängen zwischen 465 und 560 nm. Dies macht es möglich, Anthocyangehalte in Proben durch optische Spektroskopie zu bestimmen [71].

Der Hauptbestandteil des hier verwendeten Heidelbeerextraktes ist das Aglykon Cyanidin [18, S.57]. Zur genauen Ermittlung der Cyanidin-Konzentration wird hier auf die pH-Differentialmethode zurückgegriffen. Diese Methode beruht darauf, dass die Anthocyane bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Formen annehmen. So liegt Cyanidin beispielsweise bei $\text{pH} = 1$ als intensiv rot gefärbtes Flavyliumkation vor, wohingegen es bei einem pH von 4,5 als farblose Carbinol-Pseudobase vorliegt. Daraus resultieren große Abhängigkeiten der optischen Spektren, die in Abb. 6.4 dargestellt sind. An diesem Spektrum erkennt man, dass die maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 510 nm auftritt. Zur Bestimmung der Konzentration werden die Spektren jeweils bei den pH-Werten 1,0 und 4,5 aufgenommen und die Absorptivitäten A_{Cy} und A_{Ref} bei den Wellenlängen $\lambda_{Cy} = 510$ nm und $\lambda_{Ref} = 700$ nm bestimmt. Nach Giusti et al. [71] kann man mit

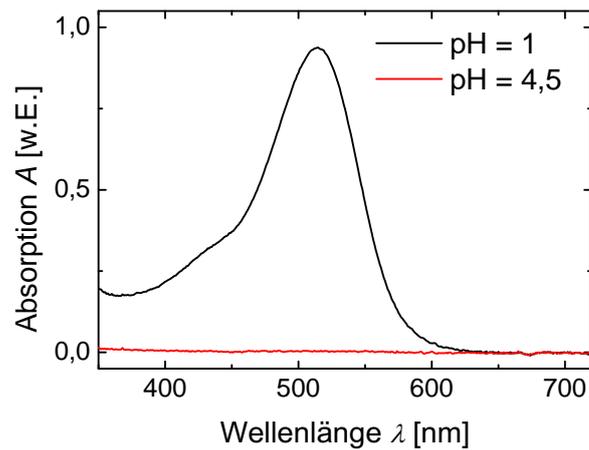


Abbildung 6.4.: *Optisches Absorptionsspektrum des Heidelbeer-Extraktes bei pH 1 und 4,5.*

$$A = (A_{Cy} - A_{Ref})_{pH=1} - (A_{Cy} - A_{Ref})_{pH=4,5} \quad (6.4)$$

die monomere Anthocyankonzentration c_{antho} bestimmen zu

$$c_{antho} = A \cdot M \cdot \epsilon^{-1} . \quad (6.5)$$

Dabei bezeichnen M und ϵ das Molekulargewicht bzw. die molare Absorptivität des Cyanidin-3-Glykosids ($M = 449,2 \text{ g/mol}$ und $\epsilon = 26\,9001/\text{mol}$ bei einer optischen Weglänge von 1 cm). Um die Anthocyanfreisetzung zu messen, wurden Kapseln entsprechend Abschnitt 3.3 präpariert, wobei die Vernetzungslösung 10 % Gew. Heidelbeerextrakt enthielt. Nach der Präparation wurden die Kapseln in eine Calciumchlorid-Lösung überführt und die Zeitmessung der Freisetzungsmessung initiiert. Nach bestimmten Zeiten wurden der Lösung geringe Mengen entnommen und deren Cyanidin-Konzentrationen wie oben beschrieben bestimmt.

Zum Vergleich der Freisetzungskinetiken verschiedener Kapseln ist es sinnvoll, die Freisetzung nicht als absolute Konzentration als Funktion der Zeit zu betrachten, sondern die Konzentrationen in relative Freisetzungen umzurechnen. Dazu wurde von jeder Messreihe der Anthocyangehalt innerhalb der Kapseln direkt nach der Präparation durch Zerstörung der Kapseln und anschließender Konzentrationsmessung bestimmt. Diese Konzentrationen entsprechen in den Freisetzungskinetiken 100 % Wirkstofffreisetzung.

6.4. Ergebnisse und Diskussion

Die zuvor beschriebenen Messungen wurden für verschiedene beschichtete und unbeschichtete Pektinatkapseln durchgeführt. Bezüglich der mit Schellack beschichteten Kapseln sind zum einen die Einflüsse des für die Beschichtung verwendeten pH-Werts interessant, da die Ausfällung von Schellack eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert aufweist. Zum anderen

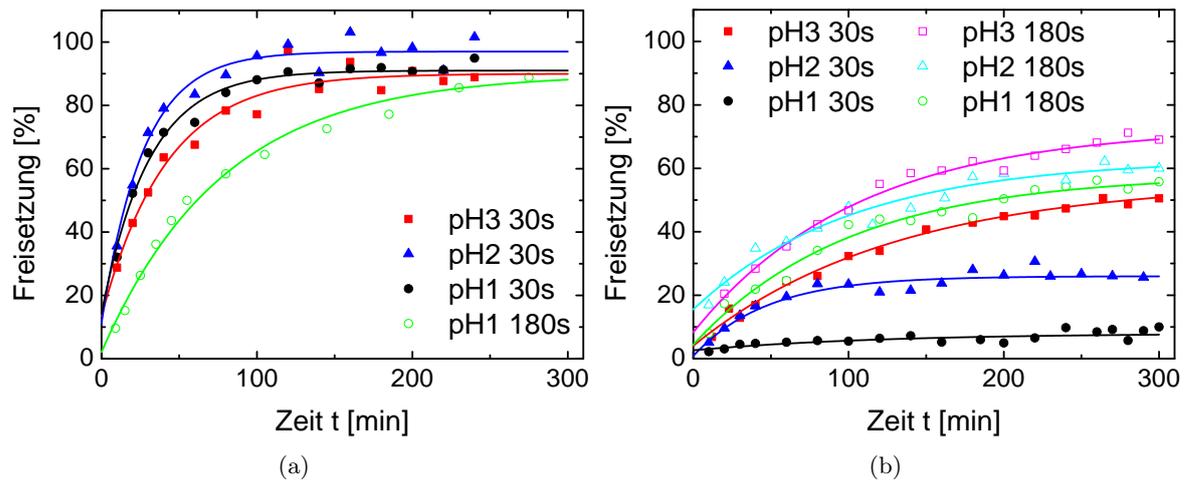


Abbildung 6.5.: Mittels UV-/Vis-Spektroskopie ermittelte Freisetzungskinetiken unbeschichteter (a) und beschichteter (b) Pektinatkapselformen für Anthocyane in Abhängigkeit der Gelierzeit (30 und 180 s) und dem pH-Wert bei einer konstanten Beschichtungszeit von 10 Minuten. (Zum Teil wurden diese Daten bereits in [18] veröffentlicht).

sind auch die Einflüsse der Pektinatschichtdicken von Interesse, welche hier durch unterschiedliche Gelierzeiten der Pektinatmembranen variiert wurden.

In Abbildung 6.5a sind die relativen Cyanidin-Freisetzungskinetiken aus unbeschichteten Kapseln als Funktion der Zeit dargestellt, was im Folgenden auch als Freisetzungskurve oder -kinetik bezeichnet wird. Die zugrunde liegenden Kapselsysteme unterscheiden sich zum einen in der Gelierzeit (30 bzw. 180 s) und somit in der Pektinatschichtdicke. Zum anderen unterscheiden sich die untersuchten Systeme darin, dass die Kapseln nach der Herstellung und während der Freisetzungsmessung bei unterschiedlichen pH-Werten aufbewahrt wurden. Dadurch wird ein Vergleich zu den beschichteten Kapseln möglich, welche mit verschiedenen pH-Werten präpariert wurden. Sämtliche unbeschichtete Kapseln weisen eine schnelle Freisetzung des verkapselten Extrakts auf. Nach einer Zeit von 3 Stunden beträgt die Freisetzung 80 bis 100 %. Die Unterschiede der Freisetzungskinetiken hinsichtlich des pH-Wertes können vernachlässigt werden. Eine Erhöhung der Gelierzeit und somit der Membrandicke scheint jedoch einen, wenn auch geringen, verlangsamen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Freisetzung zu besitzen.

Unbeschichtete Kapseln sind also nicht dazu geeignet, Anthocyane in hoher Konzentration geschützt durch den Magen- in den Darmtrakt zu befördern, da typische Verweildauern von zugenommenen Nahrungsmitteln im Magen bei deutlich über 3 Stunden liegen können.

Betrachtet man die Freisetzungskinetiken beschichteter Kapseln in Abbildung 6.5b, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu unbeschichteten Kapseln. Sowohl die Geschwindigkeit der Freisetzung als auch die erreichten maximalen Freisetzungswerte sind deutlich geringer als bei unbeschichteten Kapseln. Untereinander weisen die beschichteten Kapseln auch eine starke Variabilität der Freisetzungskinetik auf. So zeigt sich insbesondere bei Kapseln mit einer Gelierzeit von 30 s eine deutliche pH-Abhängigkeit der Freisetzungskinetik. Bei einem pH-Wert von 1 werden aus den Kapseln nur 5 -10 % des verkapselten Extrakts freigesetzt,

wohingegen bei pH-Werten von 2 und 3 Freisetzungen von etwa 25 bzw. 50 % erreicht werden. Bei Kapseln mit einer Gelierzeit von 3 Minuten ist die pH-Abhängigkeit weniger deutlich. Hier variieren die maximalen Freisetzungen zwischen 55 und 70 %.

Zur Interpretation der Ergebnisse ist es sinnvoll, die Schichtdicken der Kapselmembranen zu betrachten, welche in Abschnitt 4.6 dargestellt sind. Hinsichtlich der Pektinatschichten hat der pH-Wert nur einen geringen Einfluss auf die Schichtdicken. Die Variation der Gelierzeiten von 30 auf 180 s macht sich jedoch in einer Verdoppelung der Schichtdicken bemerkbar. Diese dickere Pektinatschicht könnte die geringere Freisetzungsgeschwindigkeit der dickeren unbeschichteten Pektinatkapseln erklären.

An dieser Stelle sei betont, dass der Versuch durch Kapseln mit noch dickeren Pektinatschichten eine Möglichkeit zum gezielten Transport des Extraktes zu erreichen nicht erfolgreich sein würde. Dies liegt hauptsächlich daran, dass die Schichtdicken aufgrund des diffusionskontrollierten Herstellungsprozesses einer oberen Grenze unterliegen (vgl. Abschnitt 4.3). Auch der Versuch der Verwendung von Matrixkapseln, die keinen flüssigen Kern besitzen sondern vollständig aus Pektinat-Gel bestehen, zeigte keine signifikante Herabsetzung der Durchlässigkeiten.

Bei einer Betrachtung der Freisetzungskinetiken beschichteter Kapseln zeigt sich, dass der Einfluss der Gelierzeit auf die Freisetzung hier gegenteilig zu den unbeschichteten Kapseln ist. Hier scheint also nur die Schellack-Beschichtung für die unterschiedlichen Kinetiken verantwortlich zu sein. Die Schichtdicken der Schellack-Beschichtung weisen bei den Kapseln mit 30 s Gelierzeit keine Variation auf. Da diese Kapseln jedoch deutlich unterschiedliche Freisetzungskinetiken zeigen, kann eine Abhängigkeit der Durchlässigkeit von der Schellack-Dicke hier ausgeschlossen werden. Ein weiteres Argument für diesen Ausschluss liefert die Erkenntnis, dass die beschichteten Kapseln mit 180 s Gelierzeit trotz deutlich dickerer Schellack-Schichtdicken höhere Durchlässigkeiten aufweisen.

Man kann nun verschiedene Ursachen für diese Feststellungen vermuten. Eine mögliche Erklärung wären beispielsweise unterschiedliche mikroskopische Strukturen der Schellackbeschichtungen. Da die Schellack-Ausfällung mit geringerem pH-Wert deutlich zunimmt, könnten niedrigere pH-Werte zu dichteren Schellack-Strukturen führen. Diese Vermutung konnte allerdings mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht weiter untersucht werden. In Kapitel 5.7 konnten Defekte in der Schellackbeschichtung für unterschiedliche Durchlässigkeiten verantwortlich gemacht werden. Es liegt nahe zu vermuten, dass auch hier Defekte im Schellack die unterschiedlichen Freisetzungskinetiken verantworten, wobei hier vorstellbar ist, dass höhere pH-Werte zu einem vermehrten Auftreten von Defekten führen.

Anhand der Freisetzungskurven können auch Diffusionskonstanten ermittelt werden. Durch eine Anpassung der analytischen Lösung der Diffusionsgleichung nach Crank (vgl. Abschnitt 5.5) an die Freisetzungskurven können die in Tabelle 6.1 zusammengefassten Diffusionskonstanten D_m und maximalen Freisetzungen $c(eq.)$ ermittelt werden. Es sei angemerkt, dass die angepassten Diffusionskonstanten hier nicht die Diffusionskoeffizienten der Anthocyane in der Kapselmembran beschreiben. Die Diffusionskonstante D_m kombiniert vielmehr die Diffusionsprozesse im flüssigen Kern und in der Membran zu einer einzigen Diffusionskonstanten in Anlehnung an das Modell in Abbildung 5.5a (Abschnitt 5.5).

Kapselart	Gelierzzeit [min]	pH	$D_m [10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}]$	$c(eq.) [\%]$
unbeschichtet	3	3	$1,9 \pm 0,4$	90 ± 2
unbeschichtet	0,5	3	$4,8 \pm 0,3$	90 ± 2
unbeschichtet	0,5	2	$8,1 \pm 0,3$	97 ± 2
unbeschichtet	0,5	1	$6,6 \pm 0,2$	91 ± 1
beschichtet	3	3	$2,5 \pm 0,2$	73 ± 2
beschichtet	3	2	$1,6 \pm 0,2$	63 ± 2
beschichtet	3	1	$1,4 \pm 0,4$	58 ± 2
beschichtet	0,5	3	$1,1 \pm 0,4$	56 ± 2
beschichtet	0,5	2	$4,1 \pm 0,9$	26 ± 1
beschichtet	0,5	1	$0,9 \pm 0,3$	8 ± 2

Tabelle 6.1.: An die Freisetzungskurven angepasste Diffusionskoeffizienten D_m und Gleichgewichtsfreisetzungen $c(eq.)$ (vgl. Glg. 5.14) unterschiedlich präparierter Pektinatkapseln.

Die angegebenen Diffusionskonstanten D_m sind nicht besonders aussagekräftig, um die tatsächliche Permeabilität in den Kapselwandmaterialien zu beschreiben. Da sie in der Literatur jedoch oft verwendet werden, um Permeabilitäten von Kapseln zu charakterisieren und vergleichen zu können, ist deren Angabe hier dennoch sinnvoll. Für die Umrechnung der D_m in ein D_{mem} , welches die Diffusion innerhalb der Kapselmembran beschreibt, existiert eine Näherungsformel. Mit den Innen- und Außenradien der Kapseln r_i bzw. r_a ergibt sich nach Chai et al. [81]

$$D_m = r_a \cdot \left(\frac{r_a - r_i}{D_{mem}} + \frac{r_i}{D_{Kern}} \right)^{-1}. \quad (6.6)$$

Dabei entspricht $D_{Kern} = D_{Anthocyan} = (7,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ der aus Abschnitt 6.2 bekannten Selbstdiffusionskonstante der Anthocyane in Wasser. In Kombination mit den in Abschnitt 4.6 bestimmten geometrischen Abmessungen genau dieser Kapseln können die in Tabelle 6.2 dargestellten analytisch ermittelten Diffusionskonstanten $D_{mem,anal.}$ in unbeschichteten Pektinatmembranen ermittelt werden. Obwohl sich die Pektinatmembranen nur hinsichtlich des pH-Wertes unterscheiden, weisen die Membranen deutlich unterschiedliche und nicht systematisch variierende Diffusionskonstanten auf. Insbesondere fällt auch auf, dass die beiden Kapselarten, welche sich nur in ihrer Gelierzzeit unterscheiden, sehr stark unterschiedliche Diffusionskonstanten aufweisen. Unter der Annahme einer homogenen Membranbildung sollten die Kapseln vergleichbare Diffusionskonstanten aufweisen, da sich die Unterschiede der Gelierzzeiten nur in verschiedenen Membrandicken bemerkbar machen, welche aber auf die hier ermittelte Diffusionskonstante keinen Einfluss besitzen.

Diese Beobachtungen lassen Zweifel an der Anwendbarkeit der analytischen Formel zur

Kapselart	Gelierzzeit [min]	pH	$D_{mem,anal.}[10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}]$	$D_{mem,num.}[10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}]$
unbeschichtet	3	3	0,7	6
unbeschichtet	0,5	3	20	7
unbeschichtet	0,5	2	2	8
unbeschichtet	0,5	1	4	8

Tabelle 6.2.: Diffusionskonstanten für Anthocyane in unbeschichteten Pektinatmembranen, ermittelt durch analytische (Glg. 6.6) und numerische Verfahren.

Ermittlung von D_{mem} aufkommen.¹ Um festzustellen, ob die Diskrepanzen eine Ursache der Näherung sind, konnte das in Abschnitt 5.5 vorgestellte numerische Lösungsverfahren zur Ermittlung von $D_{mem,num.}$ verwendet werden². Hierzu mussten lediglich die Anfangsbedingungen angepasst werden. Die ebenfalls in Tabelle 6.2 dargestellten numerisch ermittelten Werte $D_{mem,num.}$ weisen nur geringe, auf ungenaue Freisetzungsmessungen zurückzuführende Streuungen auf. Vertraut man diesen numerisch ermittelten Werten, so diffundieren die Anthocyane durch unbeschichtete Pektinatmembranen unabhängig vom pH-Wert mit einer Geschwindigkeit, die im Wesentlichen der Diffusionskonstanten der Anthocyane in Wasser entspricht.

Vergleicht man die hier ermittelten Diffusionskonstanten mit denen der Kontrastmittel Gd-DTPA und Kupferionen, so zeigt sich hier eine Auffälligkeit. Für die beiden paramagnetischen Moleküle ist die Diffusionskonstante in den Membranen unbeschichteter Kapseln deutlich kleiner als in Wasser. Dahingegen weisen die Anthocyane in den Membranen und in Wasser vergleichbare Diffusionskonstanten auf. Über die zugrundeliegenden Ursachen für das unterschiedliche Ausmaß der Dämpfung der Diffusionsgeschwindigkeit kann hier nur spekuliert werden. Legt man zugrunde, dass die Diffusionskonstante der Anthocyane 5 bis 10 mal kleiner ist als die der paramagnetischen Kontrastmittel, könnte man vermuten, dass in Analogie zu nicht-newtonschen Fluiden³ langsam diffundierende Moleküle in den Membranen weniger stark gebremst werden. Weitere Erklärungsansätze wären in molekularen Wechselwirkungen zwischen den Testmolekülen und dem Gelnetzwerk zu vermuten.

Eine Ermittlung der D_{mem} von Anthocyanen wurde hier nur für unbeschichtete Pektinatmembranen durchgeführt. Die Ermittlung der D_{mem} in beschichteten Pektinatmembranen aus den entsprechenden Freisetzungskurven durch die numerische Lösung der Diffusionsgleichung ist nicht auf triviale Weise durchführbar. Da die Freisetzungskurven ihr Gleichgewicht erreichen, bevor ein tatsächliches Konzentrationsgleichgewicht zwischen Kapselinnerem und Bad erreicht wird, müsste das für die numerische Lösung der Diffusionsgleichung zugrunde liegende Modell drastisch geändert werden. Diese Änderungen lägen beispielsweise in der Einführung von zeitabhängigen Diffusionskonstanten, womit berücksichtigt werden könnte,

¹In Abschnitt 5.5 wurde bereits beschrieben, dass ein Vergleich mit einer numerischen Lösung gezeigt hat, dass diese Näherungslösung sehr grob ist.

²Ermittlung der Durchschnittskonzentration innerhalb der Kapsel durch Gewichtung mit dem Mittelpunktsabstand.

³Nach [18] zeigen zumindest die Polysaccharid-Lösungen der hier verwendeten Hydrogele nicht-newtonsches Verhalten.

dass Poren in den Kapselwänden mit der Zeit durch herausdiffundierende Moleküle verstopft werden. Des Weiteren wäre zu berücksichtigen, dass der exponentielle Anstieg der Freisetzung bei gleichzeitigem nicht-erreichen 100 %iger Freisetzung dadurch bedingt wird, dass bei den Messungen Kapseln vorlagen, die den Extrakt gar nicht freisetzten, wohingegen andere den Extrakt infolge von Beschichtungsdefekten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit freisetzten.

6.5. Kapitelzusammenfassung

Durch UV/Vis-spektroskopische Freisetzungsmessungen die in Kooperation mit Dr. Sabine Leick durchgeführt wurden konnte hier gezeigt werden, dass Schellackbeschichtungen die Permeabilitäten von Pektinatkapseln für medizinisch interessante Anthocyane deutlich herabsetzen und somit Potential für eine erfolgreiche Verkapselung dieser Wirkstoffe besitzen. Im Gegensatz zu unbeschichteten Kapseln, die praktisch keinen Diffusionswiderstand für Anthocyane aufweisen, hängt die Freisetzung aus beschichteten Kapseln deutlich vom Herstellungsprozess der Kapseln ab. Die Kapseln, welche die geringste Schellackdicke aufweisen, zeigen die stärkste Rückhaltung der Anthocyane. Unabhängig von der Schellackdicke ist auch auffällig, dass die Freisetzung stark vom pH-Wert beim Beschichtungsprozess abhängt. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Ursachen für unterschiedliche Freisetzungskinetiken, wie schon im vorangegangenen Kapitel erörtert, in Beschichtungsdefekten liegen. Die Häufigkeit des Auftretens dieser Defekte scheint mit höheren pH-Werten zuzunehmen.

Mit Hilfe der gepulsten-Feldgradienten-NMR wurde die Selbstdiffusionskonstante der Anthocyane in Wasser bestimmt. Diese machte es möglich, durch eine numerische Lösung der Diffusionsgleichung Diffusionskonstanten für Anthocyane in unbeschichteten Pektinatmembranen zu ermitteln. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zur freien Diffusion festgestellt werden. Ein Vergleich der numerisch ermittelten Diffusionskonstanten mit den aus einer analytischen Näherung berechneten offenbarte, dass die Verwendung der analytischen Näherung zu nicht vertrauenswürdigen Ergebnissen führt.

7. Visualisierung der Kapselauflösung

In den letzten beiden Kapiteln wurde gezeigt, dass schellackbeschichtete Pektinatkapseln geeignet sind, verkapselte Wirkstoffe, insbesondere einen anthocyanhaltigen Heidelbeer-Extrakt, für lange Zeiten bei sauren pH-Werten zurückzuhalten. Zur Ermöglichung einer gezielten Freisetzung im Darmtrakt muss darüber hinaus sichergestellt werden, dass die Kapseln am Zielort durch geänderte chemische Bedingungen der Umgebung eine strukturelle Änderung erfahren, welche die Freisetzung ermöglicht. Für die Charakterisierung solcher Strukturänderungen der Kapseln werden hier auf der NMR-Mikroskopie basierende Methoden vorgestellt, die dazu in der Lage sind. Diese Methoden basieren darauf, dass NMR-Bilder zeitaufgelöst von Kapseln aufgenommen werden, welche sich in Magen-Darm-Simulationsmedien befinden. Um eine hohe zeitliche Auflösung zu gewährleisten, musste hier teilweise auf besonders schnelle Bildgebungsverfahren, wie der aus klinischen Anwendungen bekannten FLASH-Technik, zurückgegriffen werden. Damit wird im Folgenden gezeigt, wie unterschiedlich präparierte Kapseln unter simulierten Magen- und Dünndarmbedingungen strukturell stabil bleiben, wohingegen sie sich unter simulierten Dickdarmbedingungen auflösen.

7.1. Experimentelle Vorgehensweise

Pektinatkapseln wurden für die Visualisierung der Stabilität bzw. des Auflösens auf unterschiedliche Weise mit Schellack beschichtet. Die Unterschiede im Beschichtungsprozess liegen dabei zum einen in der Beschichtungszeit, welche zwischen 3 und 10 Minuten variiert. Die Beschichtungszeit charakterisiert hier die Dauer, in der sich die reinen Pektinatkapseln beim Beschichten in der Schellacklösung befinden. Zum anderen wurde die Konzentration des Weichmachers PVP (Polyvinylpyrrolidon) in der Schellacklösung zwischen 5 und 10% variiert, da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass sich PVP positiv auf die Anthocyanin-Freisetzung unter simulierten Darm-Bedingungen auswirkt [18, S.178].

Zur Charakterisierung ihrer chemischen Stabilität wird das Verhalten der Kapseln im humanen Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) simuliert. Je nach gewünschter Genauigkeit werden unterschiedliche Arten der in-vitro Simulation des GI-Traktes verwendet [1]. Für die hier vorgenommenen Messungen wurde ein relatives einfaches System bestehend aus drei verschiedenen Simulationsmedien benutzt, welches den GI-Trakt hauptsächlich durch eine Anpassung der pH-Werte nachstellt:

1. Simulierter Magensaft ohne Enzyme bestehend aus verdünnter Salzsäure mit $\text{pH} = 1,2$ und 0,2% Gew. NaCl (USP 2008, Gastric Fluid, simulated, TS)
2. Simuliertes Dünndarmmedium ohne Enzyme mit $\text{pH} = 6,8$ bestehend aus 53,3% 1/15 molarer Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung und 46,6% 1/15 molarer Dinatriumhydro-

genphosphat-Lösung (Sörensen, Phosphat-Puffer)

3. Simuliertes Dickdarmmedium ohne Enzyme mit $\text{pH} = 7,4$ bestehend aus 19,7% 1/15 molarer Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung und 80,3% 1/15 molarer Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (Sörensen, Phosphat-Puffer)

Die unterschiedlich präparierten Kapseln wurden nacheinander in die drei verschiedene, sich in 5-mm NMR-Röhrchen¹ befindlichen, Simulationsmedien gegeben, welche zuvor auf eine physiologische Temperatur von 37°C temperiert wurden. Die Aufenthaltszeiten der Kapseln betragen dabei 2 Stunden im Magensimulationsmedium und 3 Stunden im Dünndarmsimulationsmedium, was typischen Transferzeiten entspricht [1]. Die Aufenthaltsdauer im Dickdarmmedium wurde je nach benötigter Auflösungszeit der Kapseln variabel gewählt. Während sich die Kapseln in den jeweiligen Medien befanden wurden bei einer Umgebungstemperatur von 37°C NMR-Bilder von ihnen aufgenommen, um so strukturelle Änderungen unter simulierten Magen-Darm-Bedingungen erkennen zu können.

In Abhängigkeit von der Zeitskala, auf welcher die untersuchten Kapseln strukturelle Änderungen erfahren, mussten dabei unterschiedliche Sequenzen zur Bildgebung verwendet werden. Mit der üblichen Spinwarp-Sequenz ist es möglich, unter Berücksichtigung eines ausreichenden Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine Bildaufnahmedauer (Akquisitionszeit) von 17 Minuten zu erreichen. Der Versuch, durch den Einsatz von paramagnetischen Kontrastmitteln die Repetitionszeit herabzusetzen und somit eine deutlich geringere Akquisitionszeit zu erreichen, war nicht erfolgreich. Zum Zeitpunkt der Messungen war das einzig verfügbare Kontrastmittel Kupfersulfat. Dieses Kupfersulfat vollzieht allerdings chemische Reaktionen mit den Bestandteilen der Simulationsmedien, was zu einer Ausfällung von unlöslichen Kupfersalzen (Kupferphosphat bzw. Kupferhydroxid) führt, wodurch das Kupfersulfat nicht verwendet werden konnte. Wenn jedoch kürzere Akquisitionszeiten erforderlich waren (bei Auflösungszeiten in der Größenordnung von einer Stunde), wurde daher auf die in Abschnitt 2.2.5 beschriebene FLASH-Sequenz zur schnellen Aufnahme von Bildern zurückgegriffen. Damit werden zeitliche Auflösungen von etwa einer Minute erreicht.

7.2. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 7.1 sind mit der Spinwarp-Sequenz aufgenommene NMR-Bilder dargestellt, die das Verhalten von beschichteten Pektinatkapseln unter simulierten gastrointestinalen Bedingungen zeigen. Die NMR-Bilder, von denen hier nur ausgewählte Exemplare gezeigt werden, wurden aufeinander folgend mit einer zeitlichen Auflösung von etwa 17 Minuten aufgenommen. Da die Parameter der Bildgebungssequenz für eine kurze Akquisitionszeit, und nicht für einen guten Kontrast, optimiert wurden, sind die verschiedenen Schichten der Kapselmembranen hier nicht gut zu identifizieren. Innerhalb der 2 bzw. 3 Stunden unter den sauren Bedingungen im simulierten Magen- und auch Dünndarm-Medium zeigen sich keine strukturellen Veränderungen an den Kapseln. Diese Stabilität der Kapseln unter sauren Bedingungen kann für sämtliche untersuchte Kapselsysteme beobachtet werden.

¹Probenpräparation mit unterem, aber ohne oberem Suszeptibilitätsplug (vgl Abb. 4.1), womit durch ein relativ großes Volumen des Simulationsmediums eine höhere pH- und Temperatur-Stabilität erreicht wird.

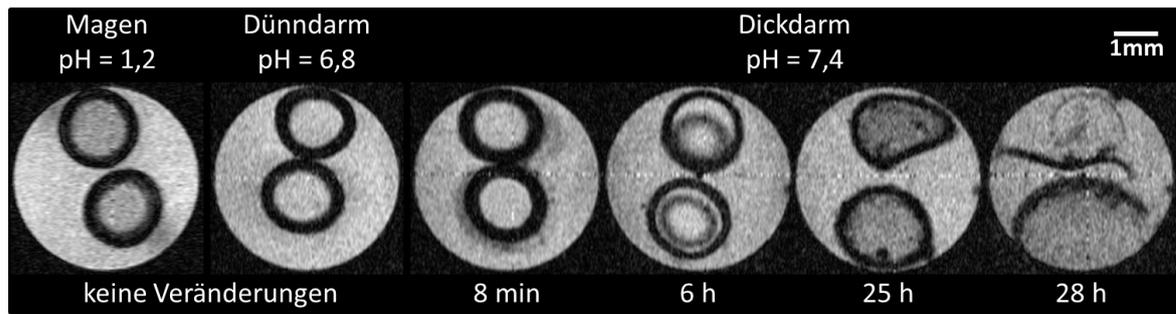


Abbildung 7.1.: NMR-Bilder von beschichteten Pektinatkapseln (Beschichtungszeit = 10 min, PVP-Konzentration = 5%) unter simulierten gastrointestinalen Bedingungen. Im Magen- und Dünndarmmedium sind keine Veränderungen feststellbar. Im Dickdarmmedium löst sich die Kapselmembran auf.

Die NMR-Bilder der Kapseln unter leicht basischen Bedingungen zeigen, dass sich die Kapseln im Dickdarm-Simulationsmedium auflösen. Im Speziellen ist zu erkennen, dass sich zuerst die Pektinatschicht von der Schellackschicht durch ein Schrumpfen des Pektinats trennt. Im weiteren Verlauf löst sich das Pektinatgel vollständig auf, was in den NMR-Bildern durch eine homogene Signalabschwächung innerhalb des Kapselkerns zu erkennen ist. Nach etwa 28 Stunden löst sich anschließend auch die Schellackbeschichtung der Kapsel auf.

Das Auflösen der Kapsel ist also sowohl auf eine Auflösung der Schellackschicht, als auch auf das Auflösen der Pektinatschicht zurückzuführen. Die Auflösung der Schellackbeschichtung kann durch die Löslichkeit des Schellacks im alkalischen Milieu erklärt werden. Das Verhalten der Pektinatschicht unter alkalischen Bedingungen ist durch verschiedene konkurrierende Effekte zu erklären. Entgegen des hier beobachteten Verhaltens sollten Pektinatgele unter alkalischen Bedingungen eigentlich aufquellen [82]. Das hier beobachtete Schrumpfen und Auflösen des Pektinatgels ist daher vermutlich darauf zurück zu führen, dass die Polysaccharidketten im alkalischen durch hydrolytische Spaltung zu Monosacchariden zersetzt werden. Einen weiteren Einfluss hat vermutlich auch der Phosphat-Puffer des Dünndarm-Simulationsmediums, welcher die Gelstruktur durch eine Komplexierung der vernetzenden Calciumionen angreift. Die Zersetzung der Pektinatgels durch den Phosphat-Puffer wird wahrscheinlich auch dadurch begünstigt, dass sich die Durchlässigkeit der Schellackbeschichtung für das Phosphat durch die Löslichkeit des Schellacks im alkalischen Milieu erhöht.

Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt wurde, ist die Schellackschicht für die Rückhaltung der Wirkstoffe verantwortlich. Daher ist der Zeitpunkt der Schellack-Auflösung mit dem Zeitpunkt der Wirkstoff-Freisetzung gleichzusetzen. Da hier nur ein kleiner Teil der gesamten Kapsel beobachtet werden kann und auch vorstellbar ist, dass der Schellack schon vor der in den NMR-Bildern sichtbaren Auflösung durchlässig wird, kann der eigentliche Freisetzung-Zeitpunkt nur grob bestimmt werden. Setzt man den Freisetzung-Zeitpunkt mit dem Einsetzen der Schellack-Auflösung gleich, so ergibt sich hier eine Freisetzungszeit von etwa einem Tag nach Überführung in das Dickdarmmedium. Je nach Füllstand des Darms kann diese Zeit zu lang für eine kontrollierte Freisetzung im Dickdarm sein, da übliche Transferzeiten im Dickdarm je

nach Darmfüllung zwischen 5 und 70 Stunden betragen. Daher wurde versucht, durch höhere Weichmacher-Konzentrationen im Schellack schnellere Auflösungen zu erzielen. Abbildung 7.2a stellt sämtliche bis zum vollständigen Verschwinden der Kapseln aufgenommene Bilder von Kapseln mit der höheren Weichmacherkonzentration von 10 % im Dickdarmmedium dar. Diese Variation der Weichmacherkonzentration hat hier eine deutlich schnellere Auflösung zur Folge. Nach zwei bis drei Stunden lösen sich diese Kapseln vollständig auf. Im Vergleich zu den Kapseln mit niedrigerer PVP-Konzentration zeigt hier nicht nur der Schellack eine deutlich schnellere Auflösung, sondern auch die innere Pektinatschicht. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Auflösung des Pektinatgels hauptsächlich durch den Phosphat-Puffer hervorgerufen wird. Da sich der Schellack hier wesentlich schneller auflöst, ist er vermutlich auch durchlässiger für die Phosphat-Moleküle, wodurch sich die Pektinatschicht deutlich schneller auflöst. Um noch schnellere Kapselauflösungen zu ermöglichen, wurden weiterhin die Beschichtungszeiten verringert. Die damit erhaltenen Kapseln lösen sich innerhalb von einer Stunde so schnell auf, dass die Auflösung der Kapseln mit der üblichen Spinwarp-Bildgebung nicht mehr mit der nötigen zeitlichen Auflösung verfolgt werden kann. Daher wurden die in Abbildung 7.2b dargestellten Bilder dieses Auflösungsprozesses mit der FLASH-Sequenz aufgenommen. Mit dieser Sequenz ist es hier möglich, zeitliche Auflösungen der Bildaufnahmen von etwa einer Minute zu erreichen. Trotz einer 17-fach geringeren Akquisitionszeit sind die Qualitäten der Bilder (SNR und Kontrast) mit den Bildern der Spinwarp-Sequenz vergleichbar. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung dieser Aufnahmen konnte anhand der Bilder ein Video erstellt werden, welches die Kapselauflösung gut visualisiert. Dieses kann in der online-Version von [83] gefunden werden.

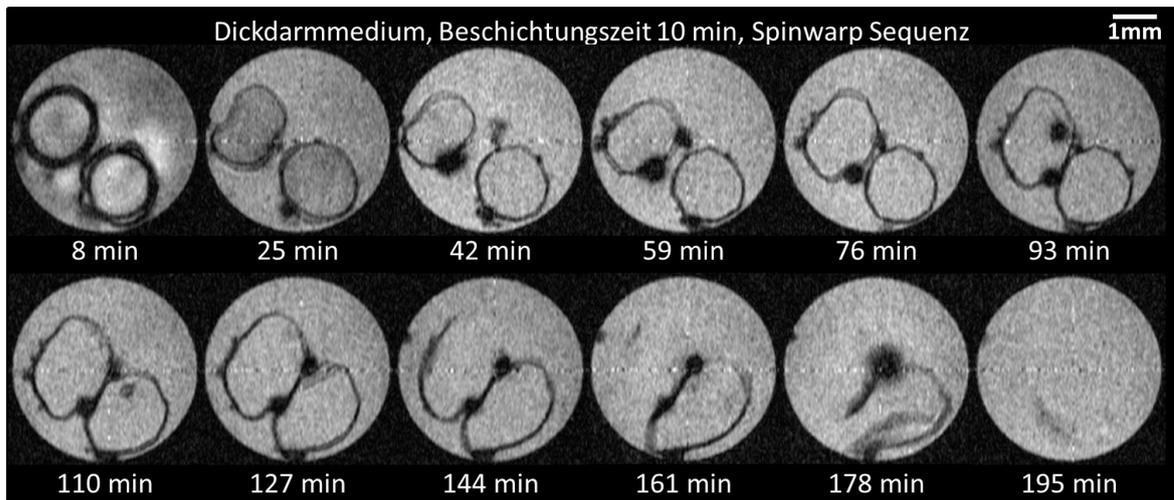
In Tabelle 7.1 sind die ungefähren Auflösungszeiten der hier untersuchten Kapselsysteme zusammengefasst. Die dort angegebenen Zeiten beziehen sich auf die vollständige Auflösung der Kapseln. Die Freisetzung von zuvor verkapselten Inhalten würde allerdings schon deutlich früher erfolgen. Sowohl eine Erhöhung der PVP-Konzentration, als auch eine Verringerung der Schellack-Beschichtungszeiten, haben einen erniedrigenden Einfluss auf die Auflösungszeiten.

Beschichtungszeit [min]	Weichmacherkonzentration [%]	Auflösungszeit [h]
10	5	28
10	10	3
5	10	1
3	10	1

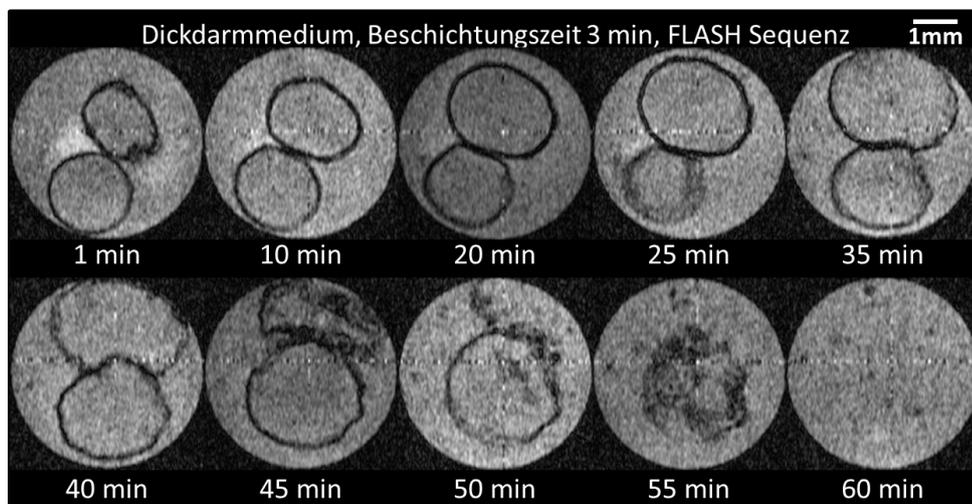
Tabelle 7.1.: *Zur vollständigen Auflösung der Kapseln unter Dickdarm-Bedingungen benötigte Zeiten von unterschiedlich präparierten Kapseln.*

7.3. Kapitelzusammenfassung

Wie sich durch zeitaufgelöste NMR-Bildgebung gezeigt hat, sind die hier untersuchten Kapseln, insbesondere ihre versiegelnden Schellack-Beschichtungen, im sauren Milieu des Magens und des Dünndarms für lange Zeiten stabil. Dahingegen lösen sie sich im Dickdarmmilieu auf, womit eine Freisetzung verkapselter Wirkstoffe ermöglicht werden kann. Schellack-



(a)



(b)

Abbildung 7.2.: NMR-Bilder zur Visualisierung des Auflösevorgangs von beschichteten Pektinatkapseln (Weichmacherkonzentration = 5 %, Beschichtungszeiten 10 bzw. 3 min) unter simulierten Dickdarm-Bedingungen, aufgenommen mit einer Spinwarp- (a) und einer FLASH-Sequenz (b).

beschichtete Pektinatkapseln eignen sich also für einen geschützten Transport durch den oberen Verdauungstrakt und für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen im Dickdarm. Vergleicht man die hier erzielten Ergebnisse mit den von Dr. Sabine Leick untersuchten Freisetzungen von Anthocyanen aus analog präparierten Kapseln in Magen-Darm-Simulationsmedien [18, S.178], so lässt sich der dort festgestellte sprunghafte Anstieg der Freisetzung nach Überführung in das Dickdarm-Medium mit der hier beobachteten Auflösung der Kapseln in Verbindung setzen.

Teil III.

Charakterisierung mikroskopischer Membranstrukturen durch die bildgebende Messung von Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten

8. Charakterisierung der mikroskopischen Hydrogelstruktur mittels orts aufgelöster Relaxometrie

Die bisher dargestellten bildgebenden Experimente waren nur möglich, da die Hydrogele, aus denen die Kapselwände bestehen, in T_2 -gewichteten NMR-Bildern geringere Signalamplituden liefern als das umgebende Wasser. In diesem Kapitel sollen nun die hauptsächlich den Kontrast bestimmenden Parameter T_1 und T_2 orts aufgelöst quantifiziert werden. Aus diesen Relaxationszeiten werden anschließend Informationen zur mikroskopischen Struktur der Hydrogele gewonnen und Rückschlüsse auf die Prozesse getroffen, welche für die verstärkte Relaxation in den Hydrogelen der Kapseln verantwortlich sind.

8.1. Quantitative Bildgebung der Relaxationszeiten

8.1.1. Messtechnische Grundlagen

T_2 -Bildgebung

Die Grundlage zur orts aufgelösten Messung der transversalen Relaxationszeit ist die Abhängigkeit der Echo-Amplitude von der Evolutionszeit (Echozeit) und der Relaxationszeit. So ist es prinzipiell mit jeder auf Hahn-Echos basierenden Bildgebungssequenz möglich, die transversale Relaxationszeit durch eine Variation der Echozeit zu messen.

Die in Abschnitt 2.2.3, Abb. 2.1 dargestellte Bildgebungssequenz¹ ist allerdings nur bedingt für eine T_2 -Messung geeignet. In dieser Sequenz ist der Lesegradienten-Rephasierungsgradient zur Ermöglichung kurzer Echozeiten zwischen den beiden RF-Pulsen platziert. Vergrößert man in dieser Sequenz die Echozeit, so erfolgt neben der Dämpfung der Signalamplitude durch die transversale Relaxation auch eine diffusionsbedingte Dämpfung durch den vergrößerten Abstand zwischen dem Lesegradienten-Paar. Diese diffusionsbedingte Dämpfung kann minimiert werden, wenn die Rephasierung des Lesegradienten wie in Abb. 8.1 gezeigt direkt vor diesem geschieht [84]. Hierdurch ergibt sich allerdings ein neues Problem. Das direkte hintereinander Schalten des Lesegradienten-Paares führt dazu, dass ungewünschte, durch Imperfektionen des π -Pulses entstehende FID's refokussiert werden und so zum Signal beitragen. Dies kann vermieden werden, indem um den π -Puls ein Spoiler-Gradientenpaar platziert wird. Durch diese Spoilergradienten werden die unerwünschten FIDs bei genügend großer Gradientenstärke dephasiert.

Wie schon lange bekannt ist, führt die T_2 -Messung mit Spin-Echos unter Variation der

¹Standardmäßige Spinwarp-Sequenz.

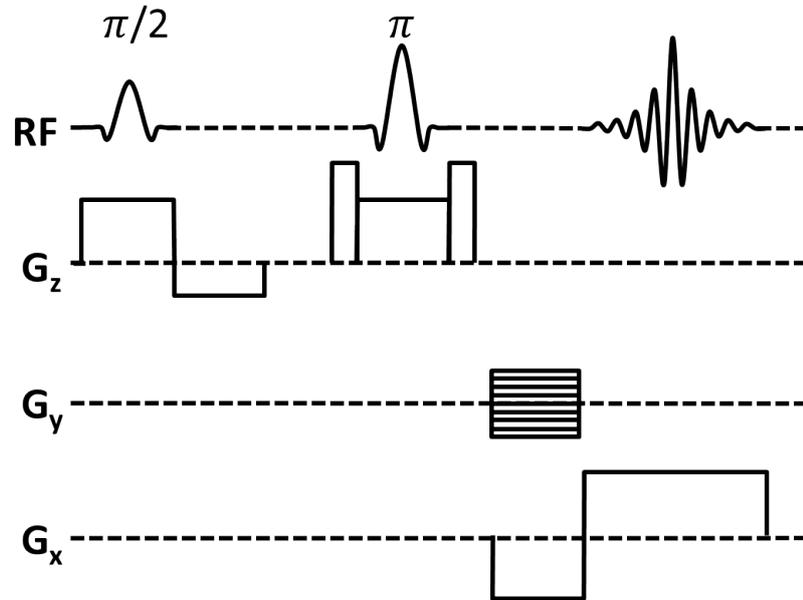


Abbildung 8.1.: Nach Hsu et al. [84] modifizierte Spinwarp-Sequenz, welche zur quantitativen Bildgebung der transversalen Relaxationszeiten von Mikrokapseln verwendet wird.

Echozeit zu einer Unterschätzung der T_2 -Zeit, da durch die Diffusion der Moleküle im nicht vollständig homogenem Feld keine hundertprozentige Refokussierung erfolgen kann. In der nicht-bildgebenden NMR werden daher multiple Refokussierungen durch wiederholte π -Pulse zur Verminderung des Einflusses der Diffusion auf die Signalamplitude verwendet, was auch als *CPMG*-Methode bekannt ist [85]. Ähnliche Prinzipien werden auch in der bildgebenden NMR verwendet [86, 87]. Hier treten allerdings viele Komplikationen auf. So führen inhomogen angeregte Schichten oder im Vergleich zur Echozeit und Diffusionskonstanten dünne Schichten beispielsweise zu Fehlern bei der T_2 -Bestimmung [88]. Eine weitere wichtige Fehlerquelle sind Imperfekte π -Pulse, welche zu unerwünschten FIDs, Echos, und stimulierten Echos führen. Hier kann zwar durch geeignete Positionierung von Spoilergradienten Abhilfe geschaffen werden, allerdings führen die zusätzlichen Gradienten wiederum zu zusätzlichen Signaldämpfungen und unerwünschten Effekten durch induzierte Wirbelströme [89].

Für die bildgebende Messung der transversalen Relaxationszeiten wurde hier versucht, die Magnetisierung vor der eigentlichen Bildaufnahme mehrfach durch harte oder weiche Pulse zu refokussieren, um so den störenden Einfluss der Diffusion auf die Signaldämpfung zu minimieren. Aufgrund der relativ großen B_1 - und B_0 -Inhomogenitäten sowie der Pulsimperfectionen wurde das resultierende Spin-Echo allerdings mit unerwünschten Signalen überlagert. Diese machten eine Bildaufnahme unmöglich. Zur Unterdrückung der unerwünschten Signale wurden auf verschiedene Weisen Spoilergradienten geschaltet. Hierbei zeigte sich, dass die vorhandene Hardware nicht für ein ausreichendes Spoiling geeignet ist, da das Fehlen einer aktiven Schirmung zu induzierten Wirbelströmen führt und weiterhin keine ausreichenden Duty-Cycles erreicht werden können. Die erwähnten Komplikationen in Kombination mit der vorhandenen

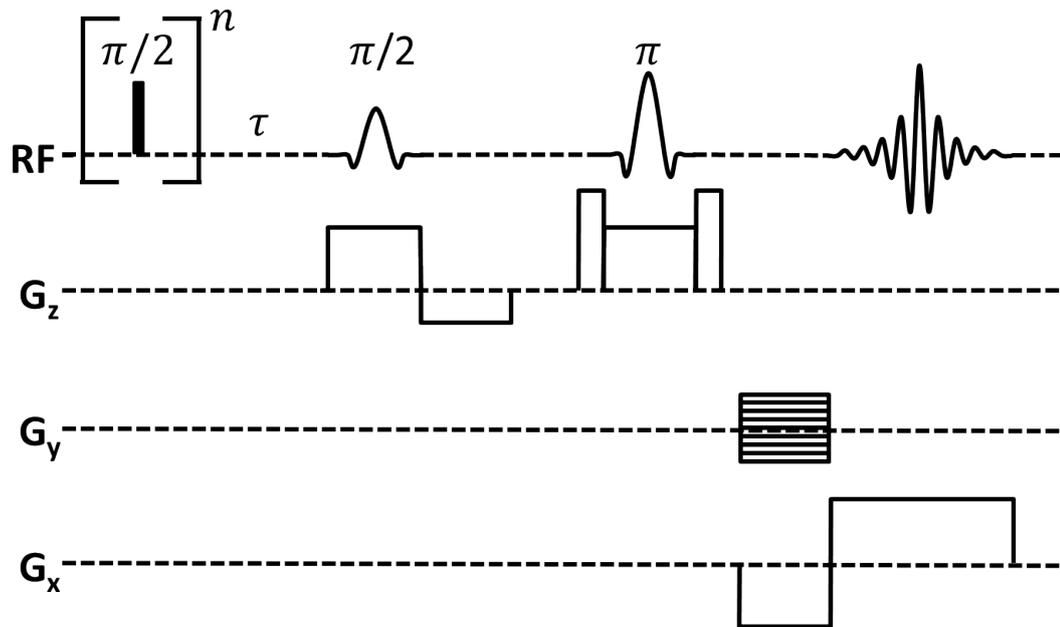


Abbildung 8.2.: Pulssequenz zur ortsaufgelösten Messung der longitudinalen Relaxationszeit nach dem *saturation-recovery* Verfahren. Im Abstand τ vor der eigentlichen Bildgebung wird die Magnetisierung mit n schnell aufeinander folgenden $\pi/2$ -Pulsen gesättigt.

Hardware führten also dazu, dass gängige Methoden der Multi-Echo T_2 -Bildgebung hier nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Da die untersuchten Alginat- und Pektinat-Gele der Mikrokapseln glücklicherweise sehr kurze transversale Relaxationszeiten besitzen, kann der Fehler bei der T_2 -Messung durch die in Abb. 8.1 dargestellte Spinwarp-Sequenz vernachlässigt werden (siehe auch Abschnitt 8.1.2), womit die Spinwarp-Sequenz die geeignetste Messmethode zur T_2 -Messung an den hier verwendeten Mikrokapseln darstellt.

T_1 -Bildgebung

Die quantitative Bildgebung der longitudinalen Relaxationszeit erfolgt durch die in Abb. 8.2 dargestellte Bildgebungs-Sequenz. Hier wird die Magnetisierung zunächst durch schnell aufeinanderfolgende $\pi/2$ -Pulse gesättigt [90]. Anschließend wird nach einer variablen Evolutionszeit τ , in welcher sich die longitudinale Magnetisierung in Abhängigkeit von T_1 wieder aufbaut, eine Spinwarp-Bildgebung durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit der Signalamplitude wird dabei durch Glg. 8.2 beschrieben. Im Gegensatz zu anderen Verfahren der T_1 -Messung, wie beispielsweise dem *inversion-recovery* [91], bietet die hier verwendete Methode des *saturation-recovery* den Vorteil, dass die Sättigungssequenz unabhängig von der longitudinalen Relaxation immer den gleichen Anfangszustand erzeugt. Dadurch kann dieses Experiment mit einer schnellen Repetitionszeit durchgeführt werden und bringt somit einen großen Messzeitgewinn mit sich. Die Sättigung der Magnetisierung erfolgt hier durch $n = 50$ aufeinanderfolgende $\pi/2$ -Pulse² im Abstand von jeweils $20 \mu\text{s}$. Diese Werte wurden durch eine Minimierung der Signalamplitude

²Pulslänge $\approx 20 \mu\text{s}$.

in Abhängigkeit von der Anzahl und dem Abstand der Sättigungs-Pulse ermittelt.

8.1.2. Ergebnisse

Die zuvor beschriebenen Pulssequenzen wurden verwendet, um die Relaxationszeiten von Hohl- und Matrixkapseln aus Alginat bzw. Pektinat zu messen. Die charakterisierten Kapseln unterschieden sich zum Teil darin, dass für ihre Herstellung unterschiedliche Konzentrationen der Polymerlösung verwendet wurden (0,5 und 1,0 % Gew.). Teilweise wurden die Messungen an identischen Kapseln bei verschiedenen Temperaturen (10, 30 und 50 °C) durchgeführt. Sämtliche Proben wurden gemäß Abb. 4.1b präpariert, das heißt die Kapseln waren an einer Grenzschicht aus Perchlorethen zu Wasser positioniert. Die Kalibration der Temperatur erfolgte mit dem in der Diplomarbeit von Daniel Edelhoff [92] beschriebenen Verfahren.

Um aus den bei verschiedenen Evolutionszeiten T_E bzw. τ aufgenommenen Bildern die ortsabhängigen Relaxationszeiten $T_2(x, y)$ bzw. $T_1(x, y)$ zu bestimmen, wurden an die dem Pixel der Koordinaten (x, y) zuzuordnenenden Signalamplituden $S(x, y)$ die Funktionen

$$S(x, y) = S_0(x, y) \cdot \exp\left(-\frac{T_E}{T_2(x, y)}\right) \quad (8.1)$$

bzw.

$$S(x, y) = S_0(x, y) \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{\tau}{T_1(x, y)}\right)\right] \quad (8.2)$$

angepasst.

Für die Auswertung wurde in einem Bild des jeweiligen Datensatzes der Bereich, welcher die Kapsel bzw. Kapselmembran darstellt, manuell markiert, damit die Ermittlung der Relaxationszeiten nur für den relevanten Bereich durchgeführt wird. Dies hatte zum einen zum Ziel, die Rechenzeit der Auswertung zu minimieren. Zum anderen wurde damit der Zweck erfüllt, die Bestimmung des T_2 vom Wasser außerhalb der Kapsel nicht durchzuführen, da dies mit den hier verwendeten Methoden nicht messbar ist (siehe nächster Abschnitt).

Im Folgenden wird in Abbildungen bei der Angabe von Relaxationszeiten als Funktion des Ortes die Einheit [Pixel] verwendet. Diese Pixel haben eine Kantenlänge von etwa 12 μm .

T_2 -Bildgebung

In Abbildung 8.3a ist ein Bild der transversalen Relaxationszeit, was im Folgenden als T_2 -map bezeichnet wird, von einer Alginat-Matrixkapsel dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die T_2 -Zeiten innerhalb der Matrixkapsel eine annähernd radialsymmetrische Funktion des Abstandes zum Kapselzentrum darstellen, welches auch von Wright et al. [93] festgestellt wurde und ein Resultat des im Außenbereich dichter vernetzten Gels ist. Die dichtere Vernetzung im äußeren Bereich wird dabei durch das während der Kapselherstellung nach außen diffundierende Alginat hervorgerufen. Von innen nach außen variiert T_2 innerhalb dieser Kapsel zwischen etwa 50 ms im Zentrum und 20 ms am Kapselrand. Die langen T_2 -Zeiten am unteren Rand der Kapsel sind auf eine Bewegung der Kapsel während der Messung zurückzuführen. In Abbildung 8.3b sind die Signalamplituden als Funktion der Echozeit für drei verschiedene Pixel im Zentrum, am Rand und in der Mitte zwischen Kapselzentrum und

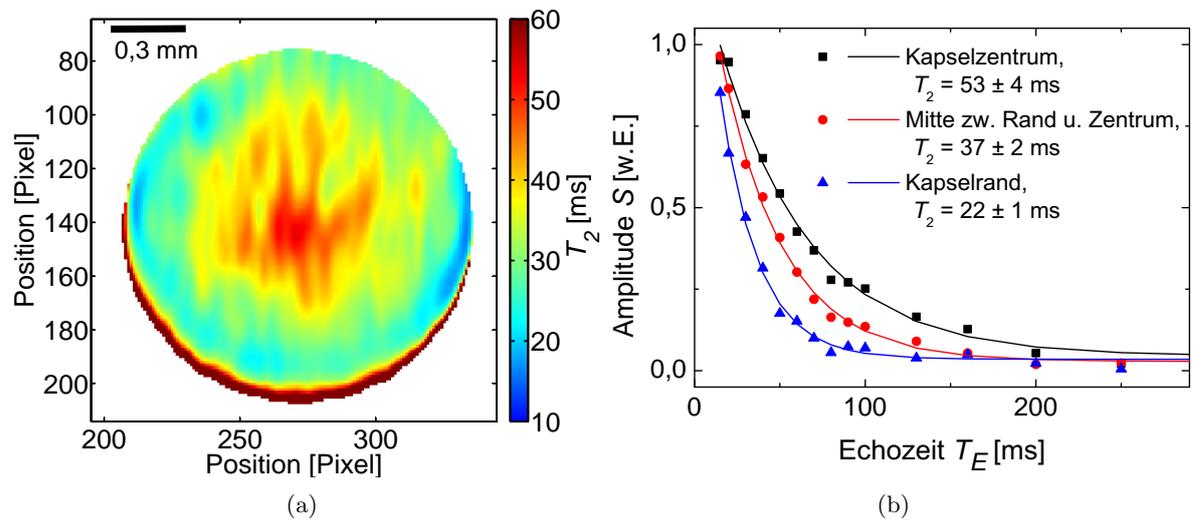


Abbildung 8.3.: (a) T_2 -map einer Alginat-Matrixkapsel (0,5% Alginat-Konzentration, 10°C). Alle Werte unter- oder oberhalb der Grenzen der Farbskala werden hier automatisch auf den entsprechenden Grenzwert gesetzt. (b) Signalzerfälle aus Pixeln an verschiedenen Positionen innerhalb der Matrixkapsel und daran angepasste Funktionen.

Kapselrand dargestellt. Die zusätzlich eingezeichneten angepassten Funktionen zeigen, dass sie mit einem Fehler des bestimmten T_2 von 1 bis 4 ms, was einen relativen Fehler von etwa 5 % entspricht, gut zu den Messdaten passen. Weiterhin kann man erkennen, dass die Signale mono-exponentiell zerfallen.

Eine weitere T_2 -map von einer Alginat-Hohlkapsel ist in Abb. 8.5a dargestellt. Hier variiert T_2 zwischen 10 und 30 ms, wobei höhere Werte vermehrt an den Rändern der Kapselmembran auftreten. Teilweise treten auch Werte oberhalb von 30 ms auf, insbesondere an der inneren Membranwand rechts unten im Bild und an der äußeren Membranwand links oben im Bild. Da man in den entsprechenden Pixeln auch teilweise vom Wasser und vom Hydrogel stammenden doppelt-exponentiellen Zerfall erkennen kann, sind die hohen Werte auf eine Bewegung der Kapsel während der Messung zurückzuführen. In dieser T_2 -map fällt weiterhin auf, dass dort senkrechte Streifen hoher und niedriger Relaxationszeiten auftreten. Dies kann mit dem bei dieser und einigen anderen Messungen schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis der NMR-Bilder erklärt werden, die dadurch ebenfalls eine streifenartige Modulation der Signalamplituden zeigen.

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, führt das verwendete Verfahren zu einer Unterbestimmung von langen Relaxationszeiten. Um dies genauer zu quantifizieren, sind in Abb. 8.4a die Signalamplituden des Wassersignals, welches ein intrinsisches T_2 in der Größenordnung von etwa 2 s besitzt, als Funktion der Echozeit für Pixel aus verschiedenen Bereichen des Probenröhrchens dargestellt (Zentrum, Rand und Mitte zwischen Zentrum und Rand). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signalamplituden nicht exponentiell und auch mit einer deutlich kürzeren Zeitkonstanten als 2 s zerfallen. Daher konnte für die Pixel, welche dem Wassersignal zuzuordnen sind, keine Anpassung von Glg. 8.1 durchgeführt werden.

Berücksichtigt man die Diffusion mit der Diffusionskonstanten D unter einem statischen

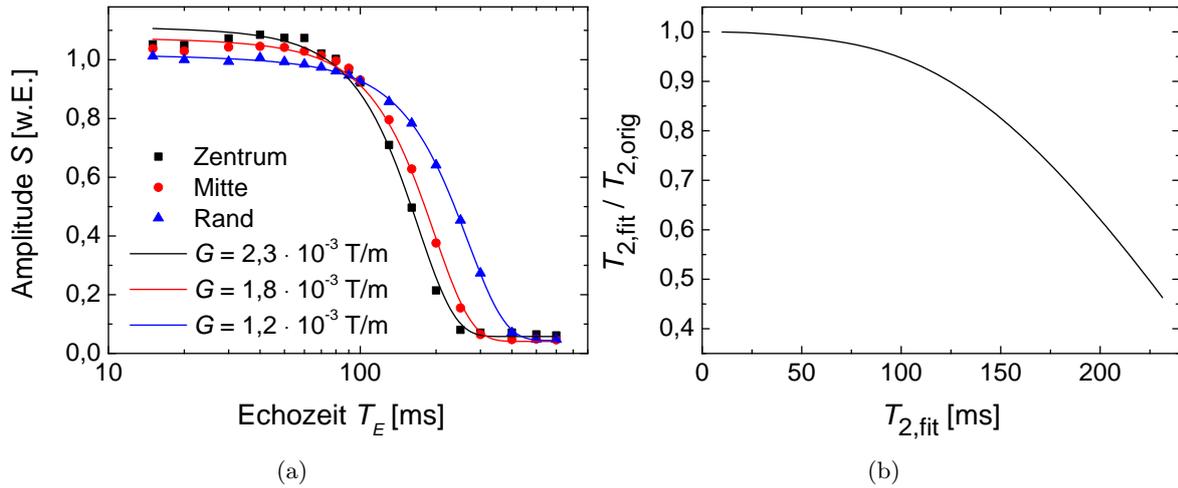


Abbildung 8.4.: (a) Zerfall des Wassersignals an verschiedenen transversalen Positionen innerhalb des Probenröhrchens und nach Glg. 8.3 angepasste Funktionen. (b) Abweichungen der nach Glg. 8.1 bestimmten T_2 vom intrinsischen T_2 .

Gradienten G , so ergibt sich nach Callaghan [4, S. 160] ein zusätzlicher Faktor bei der echozeitabhängigen Signaldämpfung:

$$S = S_0 \cdot \exp\left(-\frac{T_E}{T_2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{1}{3}\gamma^2 G^2 D T_E^3\right). \quad (8.3)$$

Diese Gleichung wurde an die Amplituden des Wassersignals in Abb. 8.4a angepasst. Mit den festen Parametern $D = 1,5 \cdot 10^{-9}$ m²/s und $T_2 = 2$ s ergeben sich Gradientenstärken zwischen $1,2$ und $2,3 \cdot 10^{-3}$ T m⁻¹. Sowohl die Größenordnung als auch die Ortsabhängigkeit dieser Werte passen gut mit der Messung einer B_0 -map an der Grenzfläche Perchlorethen/Wasser zusammen [94].

Für eine Einschätzung, wie vertrauenswürdig die mit der Spin-Echo Sequenz ermittelten transversalen Relaxationszeiten sind, wurden für verschiedene Werte $T_{2,orig}$ und dem oben bestimmten Wert des Hintergrundgradienten Signalamplituden nach Glg. 8.3 berechnet. An diese Funktionen wurde anschließend Glg. 8.1 angepasst. Das so erhaltene $T_{2,fit}$ wird mit dem ursprünglich verwendeten Wert $T_{2,orig}$ verglichen, indem in Abb. 8.4b das Verhältnis $T_{2,fit}/T_{2,orig}$ gegen $T_{2,fit}$ aufgetragen wird. Hier erkennt man, dass bis zu einer angefiteten Relaxationszeit $T_{2,fit}$ von 100 ms die Abweichungen unter 5% liegen. Bei angepassten T_2 -Werten von über 150 ms werden die Abweichungen schnell sehr groß. Die experimentell ermittelten transversalen Relaxationszeiten innerhalb der Hydrogele liegen meistens unter 100 ms, so dass der Fehler durch die verwendete Pulssequenz hier vernachlässigt werden kann.

T_1 -Bildgebung

In Abbildung 8.5b ist eine vollständige T_1 -map von mehreren Alginat-Matrixkapseln in einem NMR-Röhrchen dargestellt. Im Gegensatz zu den T_2 -maps ist es hier auch möglich, T_1 -Zeiten des Wassersignals zu bestimmen. Dieses liegt hier bei ungefähr 2 s. Betrachtet man die Matrixkapseln, so zeigt sich dort eine Abnahme des T_1 vom Zentrum der Kapseln zum Rand von etwa 1,5 zu 1,2 s. Das T_1 in den Matrixkapseln verhält sich also ähnlich wie das T_2 , ist

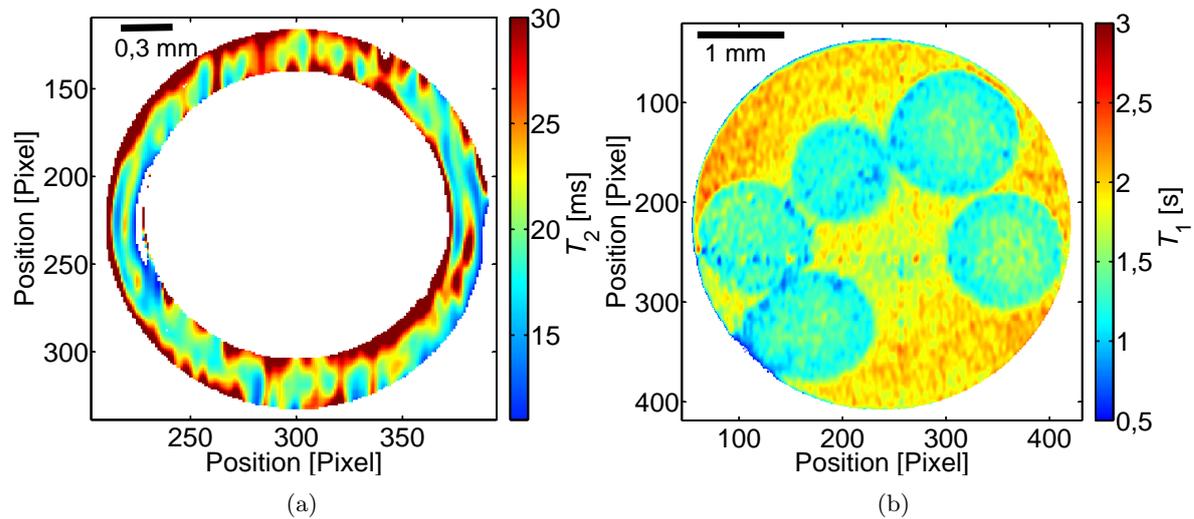


Abbildung 8.5.: (a) T_2 -map einer Alginat-Hohlkapselmembran (0,5 %, 10°C). (b) T_1 -map von mehreren Alginat-Matrixkapseln (1,0 %, 10°C) in Wasser. Alle Werte unter- oder oberhalb der Grenzen der Farbskala werden hier automatisch auf den entsprechenden Grenzwert gesetzt.

jedoch bei weitem nicht so stark reduziert.

Abbildung 8.6a zeigt eine weitere T_1 -map, nun von einer Alginat-Hohlkapsel. Im Vergleich zu den Matrixkapseln ist hier das T_1 weiter reduziert und liegt zwischen etwa 0,6 und 1,0s. Dabei treten niedrigere Relaxationszeiten vermehrt am äußeren Rand der Kapselmembran auf. Die in Abb. 8.6b zu erkennenden Fehler der ermittelten T_1 -Zeiten liegen im Bereich von 5 % bis 30 % und sind somit größer als bei der Ermittlung der T_2 -Zeiten (5 %). Dies liegt zum einen an der geringen Anzahl an Messpunkten. Zum anderen treten bei kurzen Evolutionszeiten Artefakte in den NMR-Bildern auf, welche aus B_0 und B_1 -Inhomogenitäten und der dadurch inhomogenen Magnetisierungssättigung resultieren.

Radialsymmetrische Relaxationsprofile

Die zur Ermittlung der T_1 - und T_2 -maps aufgenommenen NMR-Bilder weisen meistens ein relativ schlechtes Signal-zu-Rausch Verhältnis auf. Das kann mit der kurzen Messzeit zur Verminderung von Bewegungsartefakten und den durch lange Echozeiten T_E bzw. kurzen Evolutionszeiten τ bedingten niedrigen Signalamplituden begründet werden. Daraus resultiert eine Schwankung der ermittelten Relaxationszeiten innerhalb der T_1 - und T_2 -maps. Aufgrund des Herstellungsprozesses der Kapseln ist davon auszugehen, dass die physikochemischen Eigenschaften der Hydrogele in sphärischen Kapseln eine radialsymmetrische Funktion bezüglich des Kapselzentrums darstellen. Somit sollten im Idealfall auch die Relaxationszeiten nur vom Abstand zum Kapselzentrum abhängen. Ähnlich zu der Auswertung der Diffusion paramagnetischer Moleküle in Abschnitt 5.3 werden hier daher die Signalamplituden aus Pixeln gleichen Abstandes zum Kapselzentrum gemittelt und die Anpassung der Relaxationszeiten zu diesen radialsymmetrischen Amplituden-Mittelwerten durchgeführt.

In den Abbildungen 8.7 und 8.8 sind die so erhaltenen transversalen und longitudinalen Relaxationszeiten der hier untersuchten Kapseln als Funktion des Abstandes zum Kapselzentrum

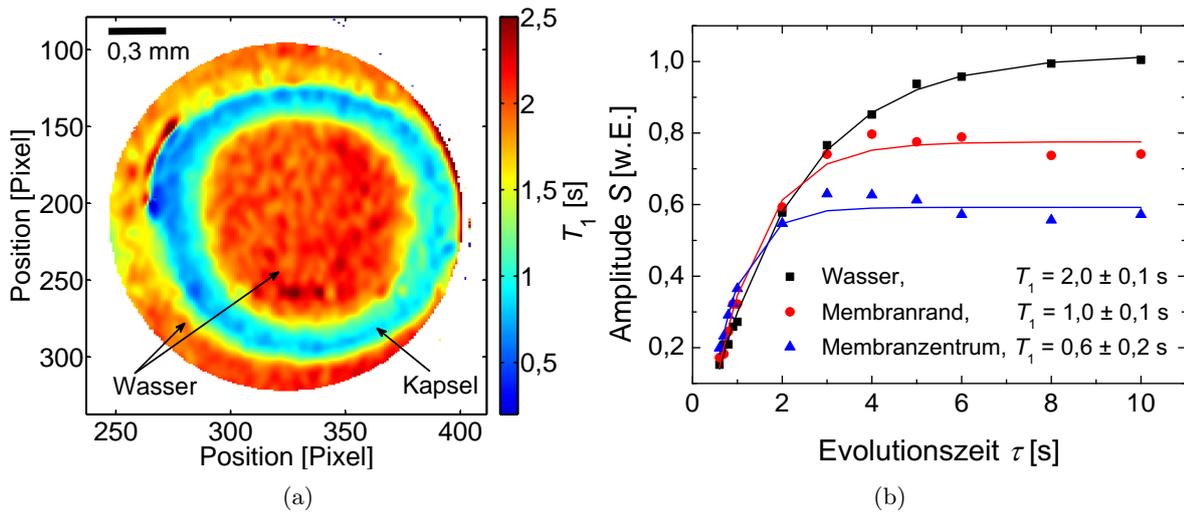


Abbildung 8.6.: (a) Ausschnitt der T_1 -map von einer sich in Wasser befindenden Alginat-Hohlkapsel (1,0 %, 10 °C). (b) Signalamplituden aus verschiedenen Positionen innerhalb der Kapselmembran und des Wassersignals aus dem Kapselzentrum als Funktion der Evolutionszeit τ inklusive Funktionsanpassung nach Glg. 8.2.

dargestellt. Zusätzlich sind dort auch die T_1 -Zeiten der außerhalb der Kapseln vorliegenden Aufbewahrungslösung (Bulk) als gestrichelte Linien eingezeichnet. Bei Betrachtung der Ergebnisse zu den Matrixkapseln zeigt sich, dass beide Relaxationszeiten mit steigendem Abstand zum Mittelpunkt geringer werden, wobei die Variation bei den T_2 -Profilen deutlicher ausgeprägt ist als bei den T_1 -Profilen. An den Relaxationsprofilen der Hohlkapseln lässt sich erkennen, dass die Relaxationszeiten an den Rändern der Kapselmembran maximal werden. Teilweise ist dies durch Bewegungen der Kapsel während der Messung zu erklären, wodurch eine Überbestimmung der Relaxationszeiten an den Rändern resultiert.

Vergleicht man die ermittelten Relaxationsprofile mit dem T_1 des Bulk-Wassers, so sind die T_1 -Zeiten der Hydrogele fast immer kleiner. Mit steigender Temperatur nehmen sowohl T_2 als auch T_1 der Hydrogele sowie des Bulks zu. Weiterhin ist die Tendenz zu erkennen, dass die Differenzen zwischen den longitudinalen Relaxationszeiten des Bulks und der Hydrogele mit steigender Temperatur zunehmen. Bei genauerer Betrachtung der T_1 -Zeiten des Bulk-Wassers fällt weiterhin auf, dass teilweise bei identischen Temperaturen verschiedene Relaxationszeiten gemessen wurden. Dies kann ein Hinweis auf vorhandene Verunreinigungen in den verwendeten Lösungen oder Defizite der Messmethode sein.

An dem Kurvenverlauf der Alginatkapsel bei 30 °C in Abb. 8.8d offenbarten sich Probleme bei der Messung der Relaxationszeiten. Hier sind die T_2 -Zeiten an den Kapselrändern sehr lang, was auf eine Bewegung der Kapsel während der Messung zurückzuführen ist. Ein weiterer Einfluss auf die Überschätzung dieser T_2 -Werte liegt einer deformierten Kapselform zu Grunde, welche aufgrund der Auswerteprozedur zu einer „Verschmierung“ von Signalamplituden aus dem Wasser und der Kapselmembran führt. Des Weiteren erkennt man eine Verschiebung der Kurvenminima zwischen den Messungen bei 10 °C und 30 °C. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Kapsel in einer Messung rund, und in der anderen Messung elliptisch geformt ist.

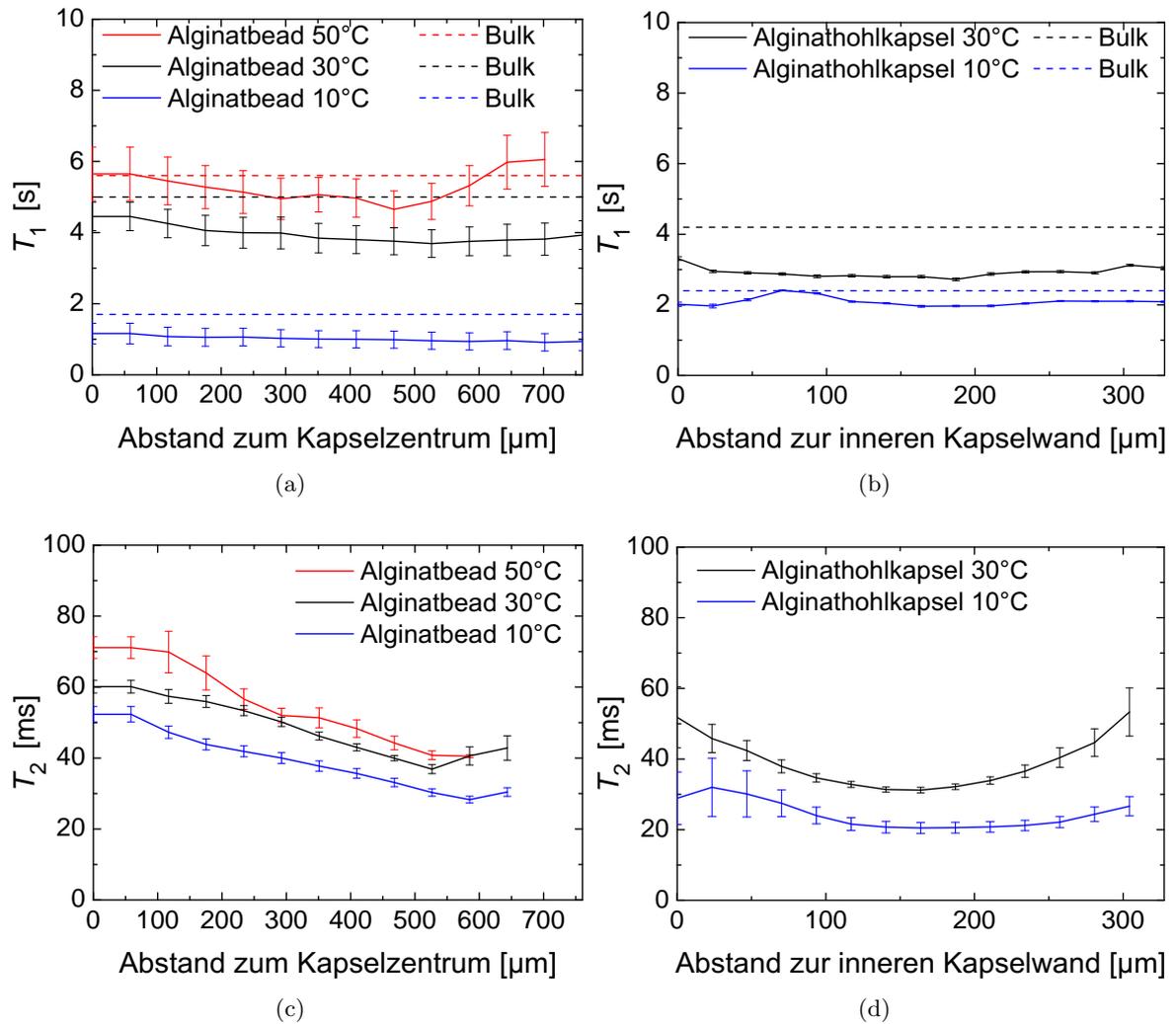


Abbildung 8.7.: Longitudinale und transversale Relaxationszeiten der Hydrogele in Alginat-Hohlkapseln und -Matrixkapseln (Beads) als Funktion der Position im Hydrogel (Polymerkonzentrationen = 0,5 %).

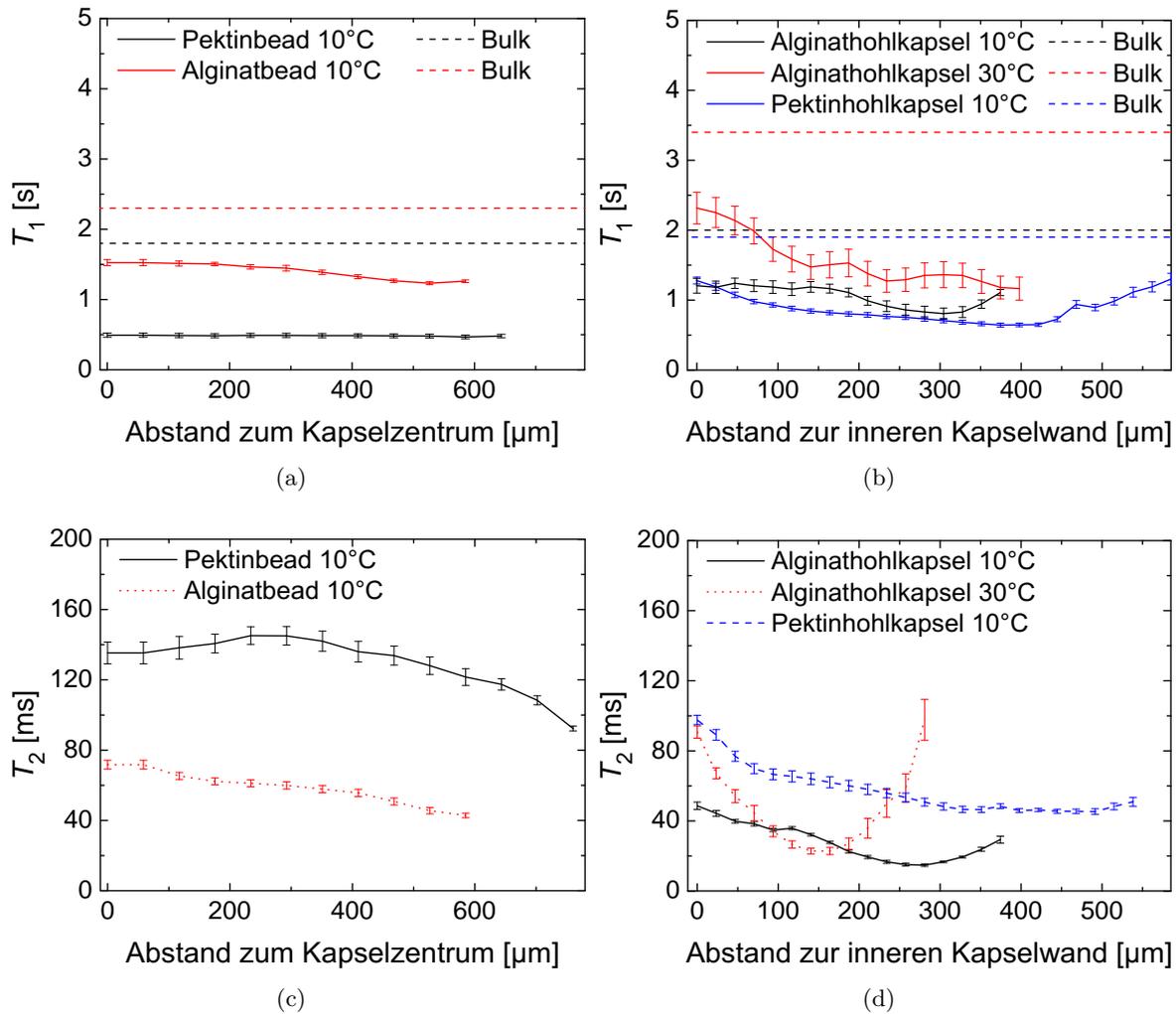


Abbildung 8.8.: Longitudinale und transversale Relaxationszeiten der Hydrogele in Alginat- und Pektinatkapseln als Funktion der Position im Hydrogel (Polymerkonzentrationen = 1,0%). Die Pektinat- und Alginatkapseln wurden mit Ausnahme des Polymermaterials identisch präpariert.

8.2. Charakterisierung der porösen Hydrogel-Struktur anhand der Relaxationszeiten

Viele bislang durchgeführte Studien zeigen, dass die Hydrogele aus denen die hier untersuchten Kapselsysteme bestehen, poröse Strukturen aufweisen [48, 93, 95–98]. Aufgrund der Sensitivität der Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten auf geometrische und physikochemische Eigenschaften der Poren, wird die NMR häufig zur Untersuchung poröser Strukturen verwendet [99–102]. Die Anwendungsgebiete reichen dabei von Porositätsbestimmungen in Gesteinen und Gläsern bis hin zu Pflanzen und Polymergelen.

Flüssigkeiten wie beispielsweise Wasser oder Öl erfahren in porösen Strukturen eine Herabsenkung der Relaxationszeiten. Zur Modellierung der Relaxation geht man allgemein davon aus, dass die Flüssigkeiten innerhalb der porösen Stoffe in verschiedenen Phasen mit unterschiedlichen Relaxationszeiten vorliegen. So findet man beispielsweise Phasen mit uneingeschränkter molekularer Beweglichkeit und somit langen Relaxationszeiten, welche auch als Bulk bezeichnet werden. Die Flüssigkeiten in diesen Phasen erfahren keine Änderung ihrer Relaxation. Dahingegen findet man auch Phasen, die eine zum Bulk abweichende Relaxation aufweisen, beispielsweise in der Nähe zu den Porenwänden. Da die genauen Ursachen für die veränderte Relaxation nicht immer bekannt sind, spricht man hier allgemein von Relaxations-Senken. Verursachende Faktoren dieser Relaxations-Senken sind paramagnetische Zentren innerhalb der Porenwände, lokale Magnetfeldgradienten infolge von Suszeptibilitätsunterschieden, Einschränkungen der molekularen Beweglichkeiten sowie Austauschprozesse zwischen Kernen der Flüssigkeit und der Porenwände [4, S.408].

Misst man die Relaxationszeiten eines Systems mit i verschiedenen Phasen, so ergibt sich unter der Annahme eines schnellen Austausches zwischen den verschiedenen Phasen mit ihren jeweiligen Anteilen f_i am Gesamtvolumen für das effektive $T_{1,eff}$ und $T_{2,eff}$ (im Folgenden $T_{1,2,eff}$) [103] :

$$\frac{1}{T_{1,2,eff}} = \sum_i \frac{f_i}{T_{1,2,i}} . \quad (8.4)$$

Im Falle eines schnellen Austausches zeigt sich also ein mono-exponentieller Zerfall der Magnetisierung. Schneller Austausch ist dann der Fall, wenn $T_{surf}^{-1} \cdot r^2/D \ll 1$ gilt, also die Porengrößen r klein in Bezug zur, in der Größenordnung der Relaxationszeit zurückgelegten, Diffusionslänge sind. Betrachtet man die Diffusion von Wasser mit einer Temperatur in der Größenordnung der Raumtemperatur als Grundlage, so erfolgt schneller Austausch und somit mono-exponentielle Relaxation bei Porengrößen von $r_{pore} \lesssim 1 \mu\text{m}$ [104]. Da man in Alginate- und Pektinat-Hydrogelen Porengrößen im Bereich weniger Nanometer erwartet [95], und die Messungen der Relaxationszeiten zudem mono-exponentiellen Zerfall zeigen, ist die Annahme eines schnellen Austausches hier gerechtfertigt.

Mit Hilfe der zuvor dargestellten Messungen der Relaxationszeiten in den Hydrogelen der Kapseln soll hier ihre Porenstruktur charakterisiert werden. Dazu wird vereinfachender Weise davon ausgegangen, dass das Wasser innerhalb der Poren des Gels in zwei verschiedenen Phasen vorliegt (siehe Abb. 8.9). Die erste Phase befindet sich im ausreichenden Abstand zu

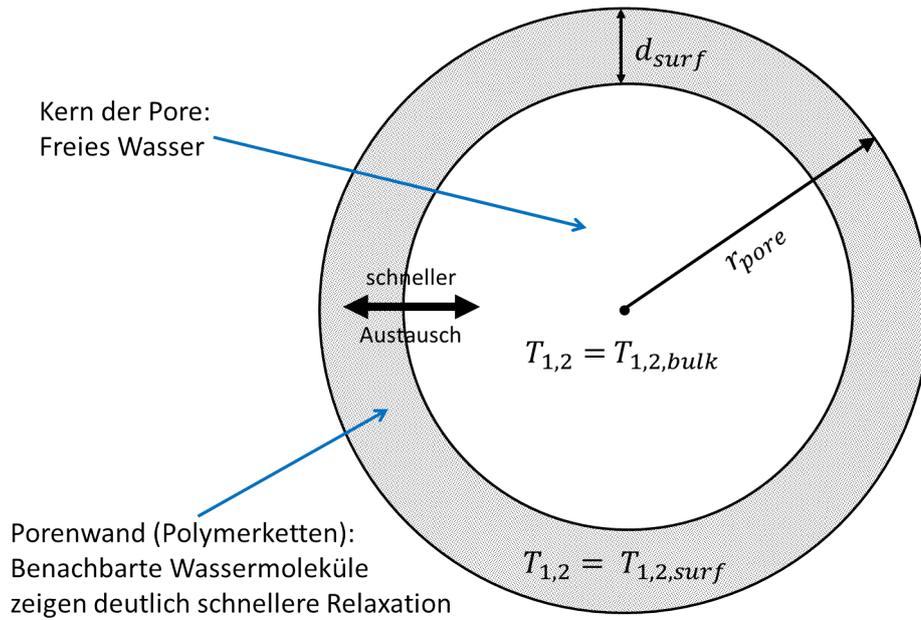


Abbildung 8.9.: Schematische Darstellung des hier verwendeten Relaxations-Modells der Wassermoleküle in den Poren von Alginat- und Pektinat-Hydrogelen.

den Porenwänden (Polymerketten) wodurch es bezüglich herkömmlicher freier Wassermoleküle keine Änderung der Relaxation erfährt. Diese Phase wird als Bulk bezeichnet und besitzt die Relaxationszeiten $T_{1,2,bulk}$. Die zweite Phase befindet sich in direkter Nähe zu den Polymerketten der Porenwände. Durch verschiedene Effekte, auf die hier noch nicht genauer eingegangen wird, weist dieses Wasser deutliche Veränderungen der Relaxation auf. Das Wasser dieser Phase besitzt die Relaxationszeiten $T_{1,2,surf}$ und wird als gebundenes Wasser bezeichnet. Beide Phasen sollen scharf abgegrenzt sein, wobei die Grenze im Abstand d_{surf} zu den Porenwänden liegt. Zwischen beiden Phasen findet ein Austausch der beiden Wasserspezies statt. In dem hier verwendeten Modell wird weiterhin davon ausgegangen, dass die Poren sphärisch sind, wobei der Radius der Poren r_{pore} eine radialsymmetrische Funktion des Ortes innerhalb der Kapsel sein soll.

Misst man die Relaxationszeiten $T_{1,2,eff}$ von einem Volumenelement der Probe, in der die Poren identische Geometrien aufweisen, so ergibt sich gemäß des vorgestellten Modells mit dem Anteil des an der Porenoberfläche schneller relaxierenden Wassers f_{surf}

$$f_{surf} = 1 - \left(\frac{r_{pore} - d_{surf}}{r_{pore}} \right)^3 \quad (8.5)$$

aus Glg. 8.4

$$T_{1,2,eff}^{-1} = T_{1,2,bulk}^{-1} \cdot (1 - f_{surf}) + T_{1,2,surf}^{-1} \cdot f_{surf} \quad (8.6)$$

Die effektiven Relaxationszeiten hängen also von den vier unbekanntenen Parametern d_{surf} , r_{pore} und $T_{1,2,surf}$ ab. Unter der Annahme, dass diese Parameter im hier untersuchten

Temperaturbereich zwischen 10 °C und 50 °C nicht von der Temperatur θ abhängen³, können diese Parameter für gleiche Orte innerhalb der Hydrogele an die Messdaten optimiert werden. Dabei gehen als weitere feste Parameter die Relaxationszeiten $T_{1,bulk} = T_{2,bulk}$ bei den Temperaturen $\theta_1 = 10$ °C und $\theta_2 = 30$ °C in die Optimierung ein, welche an der Lösung außerhalb der Kapseln gemessen wurden. Das folgende Optimierungsproblem ist demnach zu lösen:

$$\begin{aligned}
 & \left| T_{1,eff}^{-1}(\theta = \theta_1) - T_{1,opt}^{-1}(d_{surf}, r_{pore}, T_{1,surf}) \right| \\
 + & \left| T_{2,eff}^{-1}(\theta = \theta_1) - T_{2,opt}^{-1}(d_{surf}, r_{pore}, T_{2,surf}) \right| \\
 + & \left| T_{1,eff}^{-1}(\theta = \theta_2) - T_{1,opt}^{-1}(d_{surf}, r_{pore}, T_{1,surf}) \right| \\
 + & \left| T_{2,eff}^{-1}(\theta = \theta_2) - T_{2,opt}^{-1}(d_{surf}, r_{pore}, T_{2,surf}) \right| \stackrel{!}{=} \min . \quad (8.7)
 \end{aligned}$$

Im letzten Abschnitt wurden die Relaxationszeiten $T_{1,2,eff}$ als Funktion des Abstandes zum Kapselzentrum bestimmt. Aufgrund des Gelierungsmechanismus der Kapseln kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Symmetrie die Porenstruktur ebenfalls eine Funktion des Abstandes zum Kapselzentrum ist. Daher wurden für jede Position die optimalen Parameter d_{surf} und $T_{1,2,surf}$ sowie die Porengrößen r_{pore} bestimmt.

In Abbildung 8.10 sind die an die Relaxationszeiten der Alginat-Hohlkapsel (0,5 % Polymerkonzentration) bei den Temperaturen 10 °C und 30 °C optimierten Parameter zu finden. Diese weisen in Abhängigkeit vom Ort innerhalb der Kapselwand deutliche Schwankungen auf. Abgesehen von der Porengröße sollten sie im Rahmen des hier verwendeten Modells allerdings konstant sein. Daher wurden zur genaueren Bestimmung der Porengröße die Mittelwerte (über den Abstand) der Parameter d_{surf} , r_{pore} und $T_{1,2,surf}$ verwendet, welche in Tabelle 8.1 dargestellt sind. Der Mittelwert $\langle d_{surf} \rangle \approx 0,3$ nm entspricht in etwa der Größe eines Wassermoleküls. Dies ist im Rahmen eines „bound-water“ Modells, bei dem die verstärkte Relaxation an den Porenwänden durch Wasserstoffbrückenbindungen verursacht wird, durchaus plausibel. Die Relaxationszeiten des gebundenen Wassers $\langle T_{1,surf} \rangle \approx 1,3$ s und $\langle T_{2,surf} \rangle \approx 4$ ms entsprechen in etwa den in der Literatur bekannten Werten [4, S. 234]. Mit diesen nun festen Parametern wurde erneut eine Optimierung der Porengröße an die gemessenen Relaxationszeiten durchgeführt, woraus der in Abbildung 8.11a dargestellte ortsabhängige Porenradius resultiert. Für die untersuchte Alginat-Hohlkapsel variiert der Porenradius zwischen 6,5 und 4,5 nm, wobei die Porengröße von der Mitte der Kapselwand zu den Rändern hin zunimmt. Die Größenordnung der Porengröße passt zu Werten, die durch elektronenmikroskopische Verfahren bzw. Diffusionsmessungen in Alginat-Hydrogelen

³Serp et al. [97] untersuchten die Temperaturabhängigkeit der Größe und Porenstruktur von Alginatbeads im Temperaturbereich von 25 bis 130 °C mittels Elektronenmikroskopie. Sie fanden heraus, dass ansteigende Temperaturen sowohl ein Schrumpfen der Beads (etwa 2 % Durchmessererringerung pro 10 K) als auch eine Verdichtung des Gelnetzwerkes bewirken. Da allerdings zum einen der hier untersuchte Temperaturbereich deutlich kleiner ist als der von Serp et al. untersuchte, und zudem unklar ist, ob die Veränderung der Porenstruktur auch erfolgt, wenn die Kapseln sich in wässriger Lösung befinden, kann die Annahme temperaturunabhängiger Porengrößen hier noch unter Vorbehalt gerechtfertigt werden.

Kapselart	$\langle d_{surf} \rangle$ [nm]	$\langle T_{1,surf} \rangle$ [s]	$\langle T_{2,surf} \rangle$ [ms]
Alginat-Hohlkapsel (0,5 %)	$0,28 \pm 0,8$	$1,25 \pm 0,70$	$4,0 \pm 7,0$
Alginat-Matrixkapsel (0,5 %)	$0,31 \pm 1,5$	$0,11 \pm 0,06$	$0,2 \pm 0,4$

Tabelle 8.1.: Mittelwerte der optimierten Parameter d_{surf} und $T_{1,2,surf}$ verschiedener Kapselarten.

bestimmt wurde [97, 105]. Mit diesen Porengrößen ergibt sich ein Anteil des Wassers mit veränderter Relaxation f_{surf} im Bereich von etwa 10 bis 20 %.

Eine analoge Optimierung wurde auch an die Messdaten der Alginat-Matrixkapsel (Abb. 8.7a und c) durchgeführt. Da hier die Relaxationsmessungen für drei verschiedene Temperaturen durchgeführt wurden, muss Glg. 8.7 um zwei weitere Terme ergänzt werden. Die optimierten Parameter zeigen auch hier deutliche Schwankungen. Daher wurden wieder die Mittelwerte berechnet, welche in Tabelle 8.1 zu finden sind. Im Gegensatz zum Parameter d_{surf} , der vergleichbar zu dem für die Hohlkapsel optimierten Wert ist, weichen die Parameter $\langle T_{1,surf} \rangle \approx 0,1$ s und $\langle T_{2,surf} \rangle \approx 0,2$ ms deutlich von denen der Hohlkapsel ab. Diese Abweichungen können möglicherweise mit einem hohen Alter der Kapseln bzw. einem suboptimalem Herstellungsprozess begründet werden. Eine weitere Erklärung könnte darin zu finden sein, dass sich das T_1 sowohl vom Hydrogel als auch vom Bulk hier deutlich von den Werten der Messung an der Alginat-Hohlkapsel unterscheiden und womöglich mit einer fehlerhaften Messung in Verbindung stehen. Die mit diesen gemittelten Parametern optimierte Porengröße (Abb. 8.11b) liegt durch die großen Parameter-Abweichungen zur Hohlkapsel bei deutlich höheren Werten im Bereich von 120 bis 220 nm. Nimmt man an, dass die anhand der Hohlkapsel-Daten ermittelten Parameter eher den tatsächlichen Werten entsprechen, ergibt sich durch Optimierung mit diesen festen Parametern die in Abb. 8.11b rot dargestellte Abhängigkeit der Porengröße vom Ort. Sie nimmt monoton von 12 nm im Zentrum der Kapsel zu 6 nm am Rand der Kapsel ab und passt von der Größenordnung somit zu den zuvor ermittelten Porengrößen der Hohlkapsel-Membran.

Eine weitere Optimierung wurde anhand der Messdaten der Alginat-Hohlkapsel (Abb. 8.8 b und d), welche mit höherer Alginatkonzentration (1 %) hergestellt wurde, durchgeführt. Aufgrund der im letzten Abschnitt beschriebenen Probleme bei der Auswertung der T_2 -Messung konnte die Optimierung hier nicht ortsabhängig durchgeführt werden. Daher wurden für die Optimierung jeweils die Minima der ermittelten Relaxationszeiten verwendet. Die damit optimierten Parameter sind mit einem Kreuz in Abb. 8.10 gekennzeichnet. Lediglich $T_{2,surf} = 18$ ms weist eine erwähnenswerte Abweichung zum Wert der Hohlkapsel mit geringerer Alginatkonzentration auf. Der optimierte Porenradius beträgt hier etwa 6,5 nm und ist damit vergleichbar zur Porengröße am Rand der niedriger konzentrierten Hohlkapsel.

Um die untersuchten Kapselsysteme untereinander zu vergleichen, wurden anhand der ortsabhängigen T_2 -Messungen mit Hilfe von Glg. 8.6 und den an der Alginat-Hohlkapsel (0,5 %) ermittelten Parametern ortsabhängige Porengrößen für alle Kapseln berechnet. Da sich Pektinat- und Alginatgele bezüglich der Polymermolekülstruktur nur geringfügig voneinander

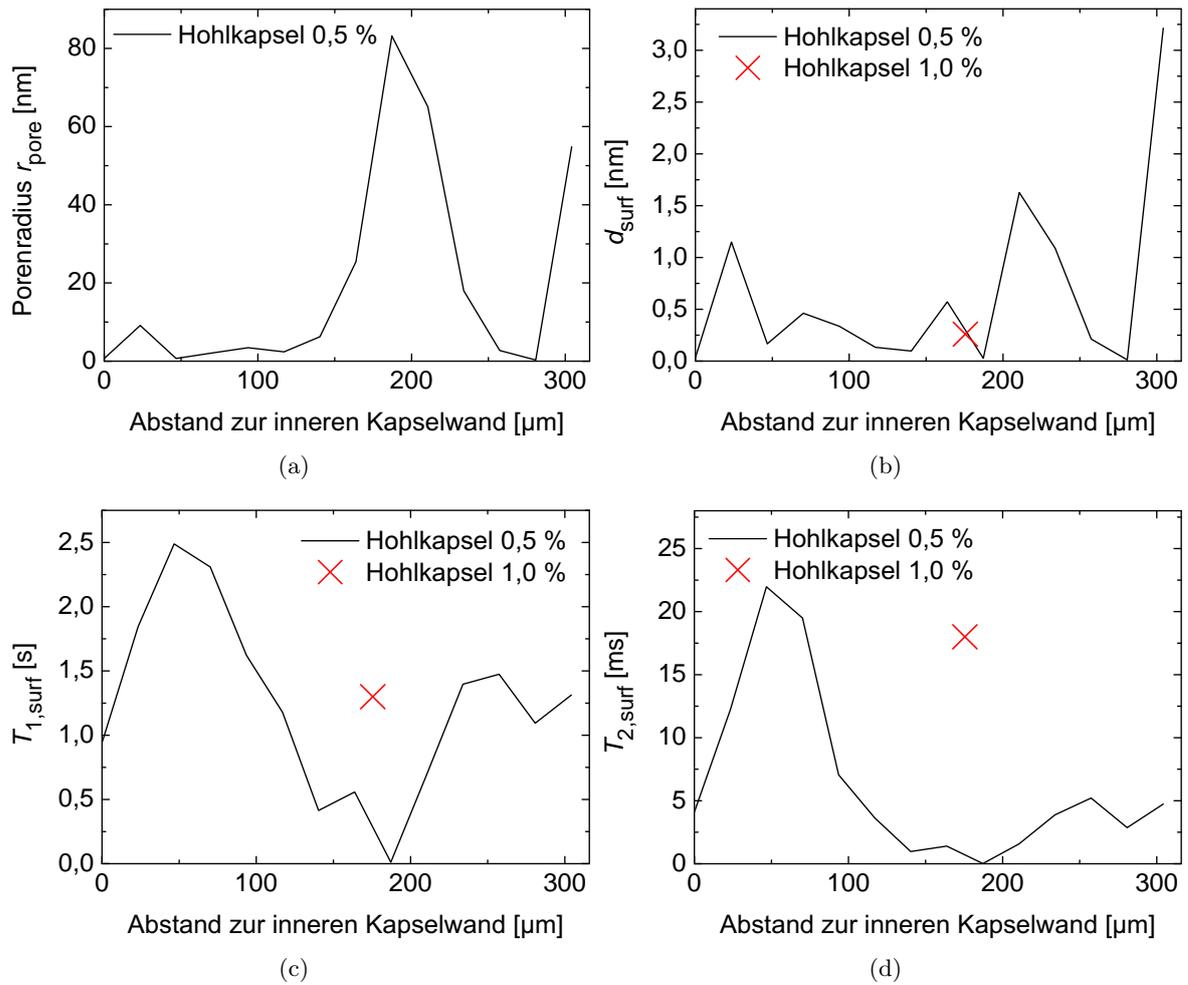


Abbildung 8.10.: Porenradius, d_{surf} und $T_{1,2,\text{surf}}$ als Funktion des Ortes innerhalb der Alginate-Hohlkapselmembran, welche sich aus den Optimierungen von Glg. 8.7 ergeben. Das Kreuz kennzeichnet die optimierten Parameter zu den Relaxationszeiten-Minima der 1,0%igen Hohlkapsel.

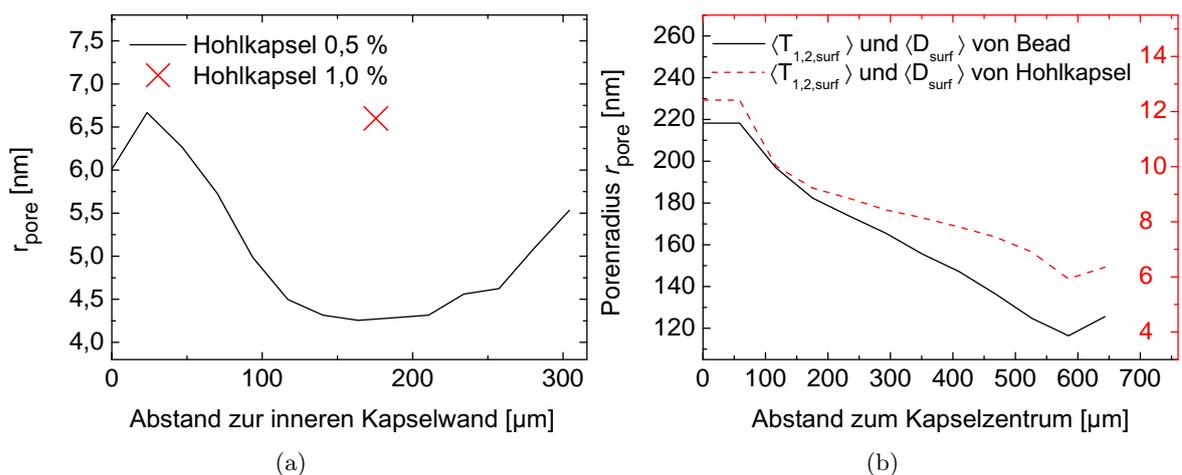


Abbildung 8.11.: Porengrößen von Hohlkapseln (a) und einer Matrixkapsel (b) als Funktion des Ortes. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung der (ortsunabhängigen) gemittelten Parameter $\langle d_{\text{surf}} \rangle$ und $\langle T_{1,2,\text{surf}} \rangle$.

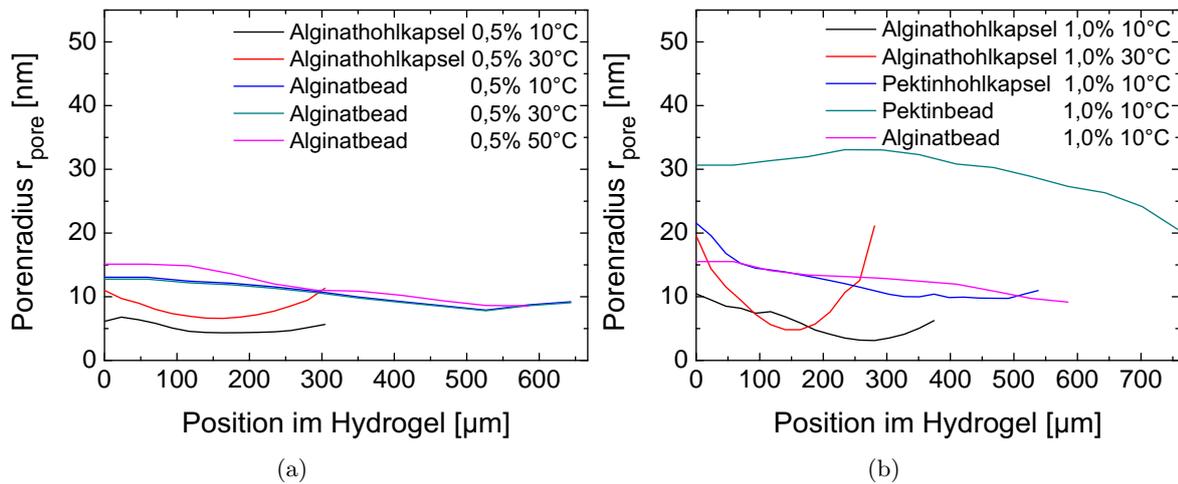


Abbildung 8.12.: Vergleich der Porendurchmesser als Funktion des Abstandes zur inneren Kapselwand bzw. zum Kapselzentrum (bei Matrixkapseln/Beads) von Pektinat- und Alginatkapseln mit unterschiedlichen Konzentrationen der zur Herstellung verwendeten Polymerlösung. Die Porenradien ergeben sich aus den gemessenen T_2 -Zeiten der jeweiligen Kapseln und den zu der Alginat-Hohlkapsel bestimmten Parametern $\langle d_{\text{surf}} \rangle$ und $\langle T_{2,\text{surf}} \rangle$.

unterscheiden, ist hier die Annahme identischer Relaxationszeiten an den Porenwänden gerechtfertigt. Wie in Abbildung 8.12 zu erkennen ist, zeigen alle Hohlkapseln eine Verringerung der Porengröße von den Rändern zur Mitte, wohingegen die Matrixkapseln eine Reduzierung der Porengröße vom Kapselzentrum zum Kapselrand aufweisen.

In Abb. 8.12a sind die Porengrößen von Matrix- und Hohlkapseln aus Alginat (0,5%) dargestellt, welche sich aus den temperaturabhängig gemessenen T_2 -Zeiten ergeben. Die erkennbare Temperaturabhängigkeit der Porengrößen ist vermutlich auf die Grenzen des verwendeten Modells zurückzuführen, insbesondere der Annahme konstanter Porengrößen. Bei einem Vergleich zwischen Pektinat- und Alginatkapseln zeigt sich, dass die Pektinatkapseln größere Poren aufweisen. Dies passt zu den in Abschnitt 4.3 anhand des Membranwachstums getroffenen Aussagen, dass die Alginatgele dichter vernetzt sind als die Pektinatgele.

8.2.1. Vergleich mit der BPP-Theorie

Bisher wurden die Ursachen für die verstärkte Relaxation an der Porenwand komplett vernachlässigt. Hier soll nun näher darauf eingegangen werden. Die Aufklärung der Mechanismen, welche für die verstärkte Relaxation verantwortlich sind, ist zur Zeit ein aktuelles Forschungsproblem und nicht hinreichend geklärt. Paramagnetische Zentren oder starke Magnetfeldgradienten aufgrund von Suszeptibilitätsunterschieden werden hier als Ursache vernachlässigt. So bleiben noch der Austausch zwischen Protonen der Wassermoleküle mit Hydroxy-Protonen der Polysaccharid-Moleküle oder eine Einschränkung der Mobilität der Wassermoleküle als Ursache übrig. Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Bewegungseinschränkung, z.B. infolge von Wasserstoffbrückenbindungen, die Hauptursache für die verstärkte Relaxation ist [106]. Allerdings existieren auch Studien, die dem chemischen Austausch der Protonen zwischen Wasser- und Polymermolekülen das Hauptgewicht zuordnen [107, 108].

Falls die Bewegungseinschränkung der Wassermoleküle die Hauptursache für die verstärkte Relaxation an den Porenwänden ist, dann sollten die zuvor bestimmten Parameter $T_{1,surf}$ und $T_{2,surf}$ mit der nach Bloembergen, Purcell und Pound genannten BPP-Theorie [109] im Einklang stehen. Nach dieser Theorie erfahren die Spins aufgrund ihrer Rotations- und Translations-Bewegung und den damit verbundenen zeitabhängigen Dipol-Wechselwirkungen mit anderen Spins zufällig fluktuierende lokale Magnetfelder. Diese fluktuierenden Magnetfelder induzieren Übergänge zwischen den Zeeman-Energiezuständen der Spins und resultieren so in einer Relaxation. Ohne tiefergehend auf die Herleitung einzugehen, die in vielen Büchern wie z.B. in [11] nachzulesen ist, gilt für die Relaxationszeiten von Protonen in Wassermolekülen mit der Spinquantenzahl $I = 1/2$ bei der Larmorfrequenz ω_0 unter Berücksichtigung homonuklearer Dipolwechselwirkungen

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma^4 \hbar^2 \frac{3}{2} I(I+1) \times \left[\frac{1}{4} J^{(0)}(0) + \frac{5}{2} J^{(1)}(\omega_0) + \frac{1}{4} J^{(2)}(2\omega_0) \right] \quad (8.8)$$

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma^4 \hbar^2 \frac{3}{2} I(I+1) \times \left[J^{(1)}(\omega_0) + J^{(2)}(2\omega_0) \right]. \quad (8.9)$$

Dabei charakterisieren die Spektraldichtefunktionen $J^{(n)}(\omega)$ mit dem intramolekularen Protonenabstand $r_{ij} = 1,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}$

$$\begin{aligned} J^{(0)}(\omega) &= \frac{24}{15r_{ij}^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \\ J^{(1)}(\omega) &= \frac{4}{15r_{ij}^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \\ J^{(2)}(\omega) &= \frac{16}{15r_{ij}^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \end{aligned} \quad (8.10)$$

das Frequenzspektrum der molekularen Bewegung. Die Korrelationszeit τ_c charakterisiert hier die molekulare Bewegung, welche die Dipolwechselwirkung moduliert.

In Abbildung 8.13 sind die nach den vorangegangenen Gleichungen berechneten Relaxationszeiten T_1 und T_2 als Funktion der Korrelationszeit τ_c bei einer Larmorfrequenz von 600 MHz dargestellt. Für hohe Mobilitäten, d. h. kurze Korrelationszeiten, gilt offensichtlich $T_1 = T_2$. Man spricht hier vom sogenannten „extreme narrowing“. Mit abnehmender Mobilität erfolgt die transversale Relaxation immer schneller, wohingegen die longitudinale Relaxationszeit bei $\tau_c = \omega_0^{-1}$ ihren Minimalwert von $T_1 \approx 200 \text{ ms}$ erreicht und anschließend mit abfallender Mobilität monoton ansteigt.

In Abbildung 8.13 sind weiterhin die Relaxationszeiten durch Punkte markiert, welche sich aus der Optimierung im letzten Abschnitt als Relaxationszeit der Wassermoleküle an den Porenwänden $T_{1,2,surf}$ ergeben. Die anhand der Messungen an Alginat-Hohlkapseln mit unterschiedlichen Ausgangs-Polymerkonzentrationen optimierten Relaxationszeiten würden einer Korrelationszeit τ_c von etwa 1 bis 10 ns entsprechen. Dies passt zu den von Chavez et al. [106] bestimmten Korrelationszeiten der dominanten Spezies gebundener Wassermo-

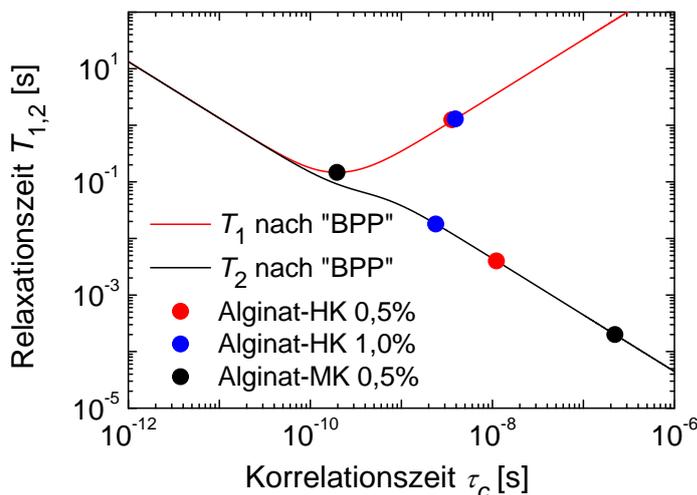


Abbildung 8.13.: Nach der BPP-Theorie (Gleichung 8.8 und 8.9) berechnete Relaxationszeiten T_1 und T_2 als Funktion der Korrelationszeit τ_c . Zur Bestimmung der Korrelationszeiten des an den Porenwänden gebundenen Wassers sind die an verschiedenen Kapselsystemen bestimmten Größen $T_{1,2,surf}$ auf den Kurven markiert. Der T_1 -Punkt der Alginat-Hohlkapsel 0,5% wird teilweise von dem T_1 -Punkt der Alginat-Hohlkapsel 1,0% überdeckt und ist daher nur schwer erkennbar. (Anmerkung: MK = Matrixkapsel; HK = Hohlkapsel).

leküle in Agarose-Hydrogelen. Anhand der eingezeichneten Relaxationszeiten $T_{1,2,surf}$ des gebundenen Wassers in Alginat-Matrixkapseln erkennt man, dass die den Relaxationszeiten entsprechenden Korrelationszeiten sehr weit auseinander liegen. Die Optimierung der Parameter $T_{1,2,surf}$ und $d_{2,surf}$ bei der Alginat-Matrixkapsel ergibt also physikalisch nicht sinnvolle Werte. Daher ist es gerechtfertigt, dass die an der Matrixkapsel optimierten Parameter für die Berechnung der Porengrößen nicht verwendet werden.

8.3. Diskussion und Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde dargestellt, wie die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten der Pektinat- und Alginat-Hydrogele von Matrix- und Hohlkapseln orts aufgelöst bestimmt werden können. In Abhängigkeit von der Position im Hydrogel, der Temperatur und von der Kapselart liegen die ermittelten transversalen Relaxationszeiten im Bereich zwischen 20 und 140 ms. Diese im Vergleich zum intrinsischen T_2 des freien Wassers von etwa 2 s (bei 10 °C) sehr schnelle Relaxation führt zu den guten Kontrasten zwischen den Kapselmaterialien und dem Wasser. Die longitudinalen Relaxationszeiten der Hydrogele betragen zwischen 30 % und 90 % des T_1 freien Wassers und zeigen somit geringere Differenzen zum intrinsischen T_1 .

Bei den Messungen der Relaxationszeiten offenbarten sich einige Schwierigkeiten. Da jede Messung etwa einen Tag dauerte und die Kapseln eine relativ instabile Position im Probenröhrchen einnahmen, bewegten sie sich häufig während der Messung. Dies führt zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Relaxationszeiten. Durch die Verwendung von Suszeptibilitäts-Plugs zur Positionierung der Kapseln könnten diese Probleme in Zukunft reduziert werden. Ein weiteres Problem besteht in der Form der Kapseln. Wenn diese von der idealen sphärischen

Form abweichen, treten bei der radialen Mittelung der Signalamplituden Fehler auf. Diese Fehler sind darauf zurückzuführen, dass Stellen in der Membran mit identischen Abstand zum Kapselzentrum dann nicht den gleichen Abstand zum Membranrand besitzen.

Da die Relaxationszeiten von einigen Kapseln als Funktion der Temperatur gemessen wurden, konnte im Rahmen eines einfachen Modells die Porengröße der Hydrogele bestimmt werden. Diese liegen in Abhängigkeit von der Kapselart zwischen 5 und 30 nm und passen somit zu mit anderen Methoden bestimmten Porengrößen [95, 105]. Vergleicht man diese Porengrößen mit den hydrodynamischen Radien⁴ der Gd-DTPA-Moleküle und Anthocyanin-Moleküle, von denen im Rahmen dieser Arbeit die Diffusionskonstanten in den Membranen der Hydrogele gemessen wurden, so liegen diese in der gleichen Größenordnung ($r_{hydrodyn.}(Gd-DTPA) \approx 5$ nm und $r_{hydrodyn.}(Anthocyanin) \approx 20$ nm). Die vergleichbaren Porengrößen und Diffusionsradien könnten also verlangsamte Diffusionen in den Kapselmembranen erklären.

Die ermittelten Porengrößen müssen allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da die für das Modell getroffenen Annahmen eine starke Vereinfachung darstellen. So ist es natürlich fraglich, ob die Porenstruktur im hier untersuchten Temperaturbereich ausreichend geringe temperaturabhängige Veränderungen aufzeigt. Weiterhin stellt die Annahme einer homogenen Struktur mit sphärischen Poren eine sehr grobe Näherung dar. Dies zeigt sich besonders, wenn man die elektronenmikroskopische Hydrogelstruktur von Alginat-Matrixkapseln in Abb. 8.14 betrachtet. Hier ist zu erkennen, dass die Struktur sehr heterogen ist. Eine weitere Einschränkung des Modells ergibt sich dadurch, dass hier nur von zwei verschiedenen Wasserphasen mit unterschiedlichen Relaxationszeiten ausgegangen wird.

Eine genauere Ermittlung der Porenstruktur wäre durch weitere Messmethoden möglich. So könnte zum Beispiel die Messung von $T_{1\rho}$ einen weiteren Parameter zur Lösung des Optimierungsproblems (Glg. 8.7) liefern. Ebenfalls wäre es von großem Vorteil, die Relaxationszeiten als Funktion der Magnetfeldstärke zu messen. Mit den angesprochenen Verfahren könnte auf temperaturabhängige Messungen verzichtet werden und so das Problem unbekannter Temperatureinflüsse auf die Hydrogele eliminiert werden. Es wäre weiterhin von Vorteil, wenn man die an einer Kapsel bestimmte Porenstruktur anschließend auch noch mit anderen Methoden, wie beispielsweise der Elektronenmikroskopie oder der Bestimmung von Diffusionskonstanten von Molekülen unterschiedlicher Größe, vergleichen bzw. validieren könnte.

Wie schon erwähnt wurde, besteht bislang noch keine Einigkeit über die physikochemischen Mechanismen, welche ausschlaggebend für die Relaxation der Wassermoleküle an den Porenwänden bzw. den Polymerketten sind. Als Hauptverursacher gelten der Austausch von Protonen zwischen Wassermolekülen und Hydroxygruppen des Polymers, sowie die Bewegungseinschränkung der Wassermoleküle an den Polymeren durch Wasserstoffbrückenbindungen. Um einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen zu liefern, wurden hier die ermittelten Relaxationszeiten des schnell diffundierenden Wassers in die sogenannte BPP-Theorie eingeordnet, welche die Relaxationszeiten als Funktion ihrer Mobilität charakterisiert. Diese Einordnung zeigt, dass die ermittelten Relaxationszeiten von Alginat-Hohlkapseln mit der BPP-Theorie im Einklang stehen und die so ermittelten Korrelationszeiten des gering-mobilen

⁴Auch Stokes-Radius genannt. Wird berechnet aus der Diffusionskonstante in Wasser. Im Allgemeinen ist dies nur ein sehr grober Richtwert für die Molekülgröße. Die tatsächliche Molekülgröße ist meistens größer.

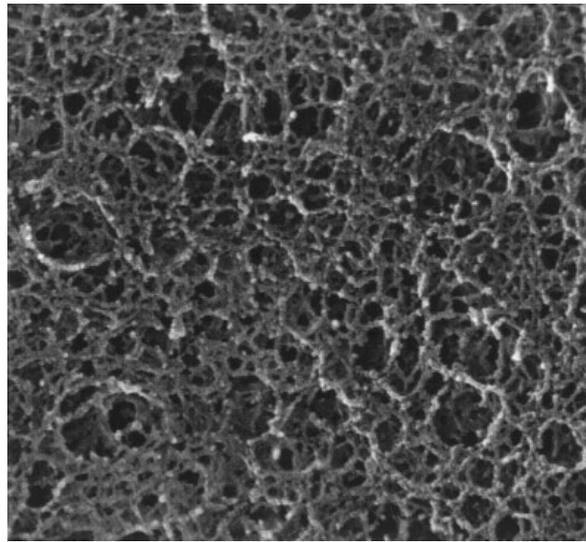


Abbildung 8.14.: Von Serp et al. [97] gemessene Raster-Elektronen-Mikroskopie von Alginat-Matrixkapseln. Kantenlänge 1,8 μm .

Wassers mit denen von Chavez et al. [106] bestimmten Korrelationszeiten von $\tau_c \approx 10$ ns übereinstimmen.

Eine Aussage, ob die Bewegungseinschränkung nun maßgeblich für die schnellere Relaxation an den Porenwänden verantwortlich ist, kann auf der Grundlage der durchgeführten Betrachtungen allerdings nicht getroffen werden. Hier könnten weiterführende Experimente wie beispielsweise feldabhängige Relaxationsmessungen oder T_2 -Messungen durch das *CPMG*-Verfahren mit variablem Pulsabstand weitere Erkenntnisse bringen. Diese Experimente sollten dann allerdings zur Vereinfachung nicht an Kapseln, sondern an homogen oder linear gelierten Proben durchgeführt werden.

Unabhängig von den Unzulänglichkeiten des verwendeten Modells und den molekularen Ursachen der Relaxation und den damit verbundenen Ungenauigkeiten bei der quantitativ korrekten Bestimmung der Porenstruktur, kann durch die Relaxationsmessungen zumindest die Netzwerkdicke der Hydrogele unterschiedlich präparierter Kapseln verglichen werden. Hier zeigt sich, dass Pektinat-Gele im Vergleich zu Alginat-Gelen längere transversale Relaxationszeiten als Alginat-Gele und somit geringere Netzwerkdichten aufweisen. Weiterhin zeigt sich auch, dass dies auch für den Vergleich von Matrix- zu Hohlkapseln gilt.

9. Bildgebende Messung der Diffusionskonstanten und -Tensoren in Kapselwänden

Neben der orts aufgelösten Messung von Relaxationszeiten bietet die bildgebende NMR auch die Möglichkeit zur Messung von Diffusionskonstanten und Diffusionstensoren [110,111]. In der medizinischen Bildgebung wird diese Technik als Diffusionstensorbildgebung (DTI) bezeichnet und dort u.a. zur Diagnostik von Schlaganfällen, der Visualisierung von Nervenbahnen und der Untersuchung weißer Gehirns substanz eingesetzt. Auch in der NMR-Mikroskopie wird diese Technik verwendet, beispielsweise zur Messung der Diffusionskonstanten von Wasser in bioadhesiven Verbindungen [112] und Alginatgelen [113].

Ähnlich wie die Relaxometrie kann die Diffusometrie auch zur Charakterisierung von porösen Strukturen verwendet werden, wobei die Diffusometrie auf größeren Längenskalen im Bereich von Mikrometern sensitiv ist [114]. Hier wird sie daher verwendet, um die Hydrogele in Matrix- und Hohlkapseln aus Pektinat und Alginat im Hinblick auf eine eingeschränkte Diffusion der Wassermoleküle durch poröse Strukturen zu untersuchen. Die Methoden und Ergebnisse dieser Charakterisierungen werden hier nur Zusammenfassend dargestellt. Umfassendere Ausführungen dazu können der Diplomarbeit von Daniel Edelhoff entnommen werden [92]. Die bildgebende Messung von Diffusionskonstanten kann auf einfachste Weise mit der in Abb. 9.1a dargestellten Pulssequenz durchgeführt werden. Diese stellt eine Kombination der in Abb. 8.1 verwendeten Pulssequenz zur Messung der transversalen Relaxationszeiten und der in Abb. 6.2 gezeigten Sequenz zur spektroskopischen Messung von Diffusionskonstanten dar. Die rot dargestellten Gradienten ermöglichen eine Diffusionsgewichtung der NMR-Bilder, die von der Stärke, der Dauer und dem Abstand zwischen den Gradienten abhängt. Durch die Aufnahme mehrerer Bilder, die mit unterschiedlich starken Diffusionsgradienten aufgenommen werden, ist es möglich, an jedes Pixel der Bilder die Stejskal-Tanner Gleichung 6.1 anzupassen und somit Diffusionskonstanten orts aufgelöst zu bestimmen. Dabei ist die Verwendung von nur einem Gradientenpaar entlang einer bestimmten Ortsachse erforderlich. Die Verwendung aller drei Gradientenpaare erlaubt ergänzend die Bestimmung von Diffusionstensoren, mit denen die Richtungsabhängigkeit der Diffusionskonstanten bestimmt werden kann. Dies ist sinnvoll, wenn die Diffusion in einschränkenden geometrischen Strukturen erfolgt und somit nicht mehr isotrop ist.

Oft ist es interessant, Diffusionskonstanten als Funktion der Diffusionszeit, das heißt der Zeitdauer zwischen den Gradientenpaaren, zu studieren. Hängen die Diffusionskonstanten von der Diffusionszeit ab, so können Aussagen über die Längenskalen einschränkender Geo-

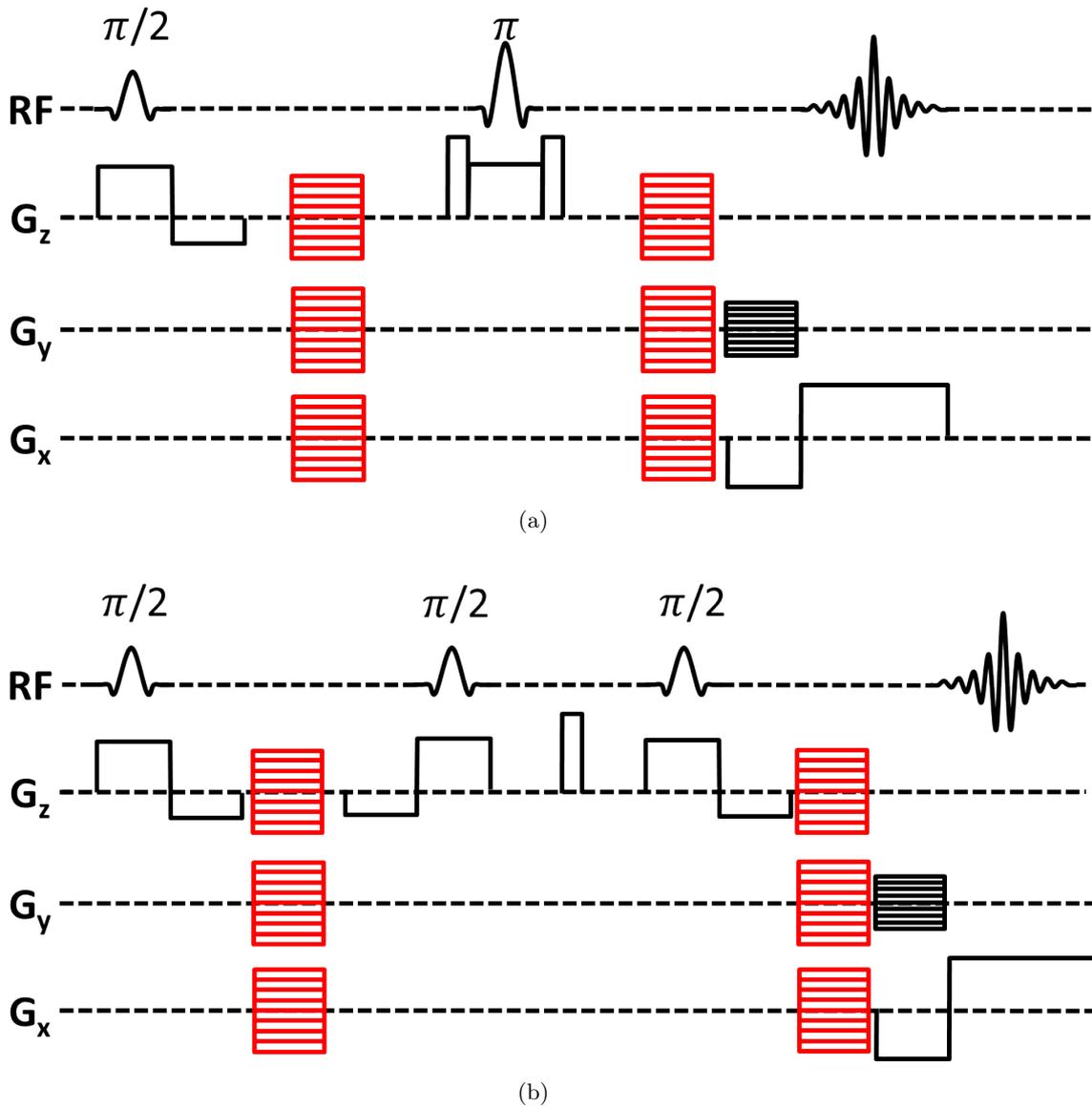


Abbildung 9.1.: Pulssequenzen zur bildgebenden Messung von Diffusionskoeffizienten und -Tensoren mit Hahn-Echos (a) und stimulierten Echos (b). Die schwarz dargestellten Gradienten dienen der Bildgebung und die rot dargestellten dienen der Diffusionskodierung. Zur Messung von Diffusionstensoren werden die Diffusionskodierungen entlang aller drei Raumachsen vorgenommen, wohingegen zur Messung von Diffusionskonstanten diffusionskodierende Gradienten nur entlang einer Raumachse geschaltet werden.

metrien getroffen werden. Da mit einer Verlängerung der Diffusionszeit bei der in Abb.9.1a dargestellten Sequenz auch eine längere Echozeit einhergeht, kommt es zu einem starken Signalverlust durch die transversale Relaxation. Dieser Signalverlust kann glücklicherweise durch die Verwendung von stimulierten Echos [115] umgangen werden, da hier die durch einen initialen $\pi/2$ -Puls erzeugte transversale Magnetisierung während einer Mischzeit zwischen zwei folgenden $\pi/2$ -Pulsen in longitudinaler Magnetisierung „gespeichert“ wird und dort nur der meist langsamer verlaufenden T_1 -Relaxation unterliegt. Diese Methodik der stimulierten Echos wird in der in Abb. 9.1b dargestellten Sequenz nach de Graaf [116] verwendet.

Mit diesen beiden Bildgebungssequenzen wurden die Diffusionskonstanten von Wassermolekülen in Membranen von Pektinat- und Alginatkapseln bestimmt. Dabei wurde die Diffusionszeit zwischen 15 und 150 ms variiert. Weder in Pektinat-, noch in Alginatgelen sind dabei signifikante Unterschiede zur Diffusionskonstanten freier Wassermoleküle festzustellen. Auf Größenskalen¹ im Bereich von etwa 10 bis 40 μm kann daher von einer uneingeschränkten Diffusion der Wassermoleküle in den Hydrogelen ausgegangen werden. Dies wird auch durch Messungen der Diffusionstensenoren unterstützt, die eine isotrope Diffusion der Wassermoleküle in den Hydrogelen hervorbrachten. Das Gelnetzwerk der Alginat- und Pektinat-Membranen scheint für die mit der Diffusometrie charakterisierbaren Zeitskalen keine Behinderung für Wassermoleküle darzustellen.

¹Die Diffusionslängen l stehen mit der Diffusionskonstanten D und der Diffusionszeit Δ über $l = \sqrt{6D\Delta}$ im Zusammenhang.

10. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NMR-Mikroskopie ein hervorragend geeignetes Werkzeug zur Charakterisierung von Mikrokapseln im Hinblick auf verschiedenste Aspekte darstellt. Hier wurden schwerpunktmäßig flüssig gefüllte Pektinat-Kapseln charakterisiert, die zum Teil mit einer externen Beschichtung aus Schellack modifiziert wurden. Aufgrund unterschiedlicher Relaxationszeiten lässt sich der Aufbau der Kapselhüllen sehr gut mit der NMR-Mikroskopie darstellen und untersuchen. Dies macht es möglich, die Morphologie unterschiedlich präparierter Kapseln zu studieren. Dadurch konnten hier Rückschlüsse auf chemische Prozesse und Eigenschaften gezogen werden, die dem Präparationsprozess zugrunde liegen. Die NMR-Mikroskopie hat sich dadurch auch als sehr nützlich bei der Neuformulierung, Konzeption und Modifikation von Präparationsprozessen erwiesen, da man durch ihren Einsatz schnell den Einfluss von Variationen der Herstellungsparameter auf die Kapselstruktur erkennen kann.

Eine Charakterisierung der mikroskopischen Struktur der Kapselwandmaterialien ist ebenfalls gelungen. Dies wurde durch bildgebende Messungen der transversalen und longitudinalen Relaxationszeiten sowie der Diffusionskonstanten der in den Hydrogelen der Membranen vorhandenen Wassermoleküle ermöglicht. Aus diesen Messungen konnte die Porengröße der Hydrogele bestimmt werden. Diese liegen in der Größenordnung von 5 bis 30 nm. Die genaue Ursache für die verstärkte Relaxation in Polysaccharid-Hydrogelen konnte nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden. Jedoch lassen sich die ermittelten Ergebnisse gut mit einer Bewegungseinschränkung der Wassermoleküle durch Wechselwirkungen mit den Polysaccharid-Ketten erklären. Wie groß der Einfluss von Austauschprozessen hierbei ist, konnte allerdings nicht geklärt werden.

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit lag darin, mit Schellack beschichtete Pektinat-Kapseln im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit zum darmgezielten Transport von flüssigen Wirkstoffen zu charakterisieren. Dazu wurde mit einer neu entwickelten Methode gezeigt, dass Schellack-Beschichtungen zu einer Versiegelung der Kapselmembran für kleine bis große Moleküle im sauren Milieu führen. Diese Methodik basiert darauf, dass die Konzentration von in die Kapseln hineindiffundierenden paramagnetischen Molekülen orts- und zeitaufgelöst gemessen wird. Für diese Moleküle konnten Diffusionskonstanten in den Kapselwänden ermittelt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Verfahren liegt darin, dass hiermit Permeabilitäten einzelner Kapseln gemessen werden und dadurch eine direkte Zuordnung zu den Strukturen der Kapseln möglich ist. Die Kombination dieser Ergebnisse mit dreidimensionalen Visualisierungen der Kapseln offenbarte, dass unterschiedliche Permeabilitäten von schellackbeschichteten Kapseln eine Folge von Beschichtungsdefekten sind. Diese Ergebnisse konnten weiterhin mit Messungen der Freisetzungen von kanzerogen präventiven Anthocyanen

in Zusammenhang gebracht werden. Dort sind signifikante Unterschiede der Freisetzungskinetiken in Abhängigkeit vom Beschichtungsprozess zu verzeichnen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Unterschiede nicht durch unterschiedliche Dicken oder Dichten der Schellackbeschichtung zu erklären sind. Vielmehr kann hier davon ausgegangen, dass der Präparationsprozess, insbesondere der zur Beschichtung verwendete pH-Wert, einen deutlichen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens von Beschichtungs-Defekten hat. Kapseln, die mit einem optimierten Präparationsprozess produziert werden, scheinen für einen geschützten Transport von Inhaltsstoffen durch das saure Milieu des menschlichen Magens also geeignet zu sein.

Nach dem geschützten Transport durch den Magen sollen die Kapseln ihren Inhalt gezielt im Darm freisetzen. Wie durch die zeitaufgelöste NMR-Mikroskopie an Kapseln unter simulierten Magen-Bedingungen gezeigt wurde, weist die versiegelnde Schellackbeschichtung unter sauren Bedingungen des Magens und Dünndarms keine strukturellen Veränderungen auf, wohingegen sie sich im leicht basischen Milieu des Dickdarms auflöst. Dadurch wird eine Freisetzung der Inhaltsstoffe im Dickdarm ermöglicht. Die studierten Kapseln bergen also großes Potential für den Einsatz als darmgezieltes Transportmittel für Medikamente und Nahrungsergänzungsmittel.

In Zukunft könnten die hier neu entwickelten Verfahren zur Beurteilung der Anwendbarkeit neuer Kapselsysteme verwendet werden. Weiterhin kann mit den vorgestellten Methoden versucht werden, die Porenstruktur der Hydrogele besser aufzuklären, und sie in einen Zusammenhang mit Diffusionskonstanten verschiedener Moleküle in den Kapselmembranen zu setzen.

Literaturverzeichnis

- [1] ANAL, A. und H. SINGH: *Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery*. Trends in Food Science & Technology, 18:240–251, 2007.
- [2] CHAMPAGNE, C. P. und P. FUSTIER: *Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods*. Current Opinion in Biotechnology, 18(2):184–90, 2007.
- [3] WANG, L. und G. D. STONER: *Anthocyanins and their role in cancer prevention*. Cancer letters, 269(2):281–290, 2008.
- [4] CALLAGHAN, P. T.: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [5] AGUAYO, J., S. BLACKBAND, J. SCHOENIGER, M. MATTINGLY und M. HINTERMANN: *Nuclear magnetic resonance imaging of a single cell*. Nature, 322:190–191, 1986.
- [6] DAMADIAN, R.: *Tumor detection by Nuclear Magnetic Resonance*. Science, 171(3976):1151–1153, 1971.
- [7] LAUTERBUR, P. C.: *Image Formations by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance*. Nature, 242:190–191, 1973.
- [8] HENNING, S.: *Charakterisierung von Alginat-Kapseln mit ortsaufgelöster NMR*. Diplomarbeit, TU Dortmund, 2009.
- [9] BLOCH, F., W. HANSEN und M. PACKARD: *Nuclear Induction*. Physical Review, 69:127, 1946.
- [10] PURCELL, E. M., H. C. TORREY und R. V. POUND: *Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid*. Physical Review, 69:37–38, 1946.
- [11] ABRAGAM, A.: *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford University Press, London, 1961.
- [12] HAHN, E. L.: *Spin Echoes*. Physical Review, 80(4):580–601, 1950.
- [13] MANSFIELD, P. und P. K. GRANNELL: *Diffraction and microscopy in solids and liquids by NMR*. Physical Review B, 12(9):3618–3634, 1975.
- [14] BERNSTEIN, M. A., K. F. KING und X. J. ZHOU: *Handbook of MRI Pulse Sequences*. Elsevier Academic Press, 2004.

- [15] KUHN, W.: *NMR-Mikroskopie - Grundlagen, Grenzen und Anwendungsmöglichkeiten*. Angewandte Chemie, 102(1):1–20, 1990.
- [16] HAASE, A., J. FRAHM, D. MATTHAEI, W. HÄNICKE und K. D. MERBOLDT: *FLASH Imaging: Rapid NMR Imaging Using Low Flip-Angle Pulses*. Journal of Magnetic Resonance, 67:258–266, 1986.
- [17] ERNST, R. R., G. BODENHAUSEN und A. WOKAUN: *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford University Press, 1987.
- [18] LEICK, S.: *Bildungskinetik, rheologische Eigenschaften und induzierter struktureller Abbau von biofunktionalen Hüllschichten und Mikrokapselfn*. Doktorarbeit, TU Dortmund, 2011.
- [19] MURANO, E.: *Use of natural polysaccharides in the microencapsulation techniques*. Journal of Applied Ichthyology, 14:245–249, 1998.
- [20] DAI, C., B. WANG und H. ZHAO: *Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 41:117–120, 2005.
- [21] BURGESS, D. J. und J. E. CARLESS: *Manufacture of gelatin / gelatin microcapsules coacervate*. International Journal of Pharmaceutics, 27:61–70, 1985.
- [22] SOON-SHIONG, P., E. FELDMANT, R. NELSON, R. HEINTZ, Q. YAO, Z. YAO, T. ZHENG, N. MERIDETH, G. SKJAK-BRAEK, T. ESPEVIK, O. SMIDSRØD und P. SANDFORD: *Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:5843–5847, 1993.
- [23] SLIWKA, W.: *Mikroverkapselung*. Angewandte Chemie, 87(16):556–567, 1975.
- [24] GRAF, E. und W. BOTHE: *Mikroverkapselung durch Zertropfen*. Pharmazie in unserer Zeit, 13(3):71–82, 1984.
- [25] TANAKA, H., M. MATSUMURA und I. VELIKY: *Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads*. Biotechnology and bioengineering, 26(1):53–8, 1984.
- [26] VANDENBERG, G. W., C. DROLET, S. L. SCOTT und J. DE LA NOÛE: *Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation*. Journal of Controlled Release, 77:297–307, 2001.
- [27] LIM, F. und A. M. SUN: *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 210:908–910, 1980.
- [28] CHANG, R., G. ITURRIOZ und C. LUO: *Preparation and evaluation of shellac pseudolatex as an aqueous enteric coating system for pellets*. International Journal of Pharmaceutics, 60:171–173, 1990.

-
- [29] RAVI, V., T. M. KUMAR und SIDDARAMAIAH: *Novel Colon Targeted Drug Delivery System Using Natural Polymers*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 70(1):111–113, 2008.
- [30] DRAGET, K. I., G. SKJAK-BAEK und O. SMIDSRØD: *Alginate based new materials*. International Journal of Biological Macromolecules, 21:47–55, 1997.
- [31] BRACCINI, I. und S. PÉREZ: *Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited*. Biomacromolecules, 2(4):1089–1096, 2001.
- [32] MCHUGH, D. J.: *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1987.
- [33] MARTINSEN, A., G. SKJAK-BRAEK und O. SMIDSRØD: *Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads*. Biotechnology and Bioengineering, 33:79–89, 1989.
- [34] MARTINSEN, A., I. STORRO und G. SKJAK-BRAEK: *Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties*. Biotechnology and Bioengineering, 39:186–194, 1992.
- [35] DRAGET, K. I., O. SMIDSRØD und G. SKJAK-BRAEK: *Alginates from Algae*. In: STEINBÜCHEL, A. und S. RHEE (Herausgeber): *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents*, Kapitel 1, Seiten 1–30. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [36] SRIAMORNSAK, P. und J. NUNTHANID: *Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies*. International Journal of Pharmaceutics, 160:207–212, 1998.
- [37] ATYABI, F., S. MAJZOUB, M. IMAN, M. SALEHI und F. DORKOOSH: *In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon*. Carbohydrate Polymers, 61(1):39–51, 2005.
- [38] REES, D. A. und E. J. WELSH: *Sekundär- und Tertiärstruktur von Polysacchariden in Lösungen und in Gelen*. Angewandte Chemie, 89(4):228–239, 1977.
- [39] SRIAMORNSAK, P., S. PUTTIPIPATKHACHORN und S. PRAKONGPAN: *Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads*. International Journal of Pharmaceutics, 156:189–194, 1997.
- [40] PENNING, M.: *Aqueous Shellac Solutions for Controlled Release Coatings*. In: KARSA, D. R. und R. A. STEPHENSON (Herausgeber): *Chemical Aspects of Drug Delivery Systems*, Seiten 146–154, Cambridge, 1996. RSC.
- [41] PEARNOCHOB, N., DASHEVSKY A., J. SIEPMANN und R. BODMEIER: *Shellac used as coating material for solid pharmaceutical dosage forms: understanding the effects of formulation and processing variables*. STP pharma sciences, 13(6):387–396.
-

- [42] ZUIDAM, N. J. und V. NEDOVIC: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, 2010.
- [43] PENNING, M.: *Schellack - ein nachwachsender Rohstoff mit interessanten Eigenschaften un Anwendungen*. Journal for Cosmetics, Aerosols, Chemical and Fat Products, 6:221–224, 1990.
- [44] TAQIEDDIN, E., C. LEE und M. AMIJI: *Perm-Selective Chitosan-Alginate Hybrid Microcapsules for Enzyme Immobilization Technology*. Pharmaceutical Engineering, 22(6):1–3, 2002.
- [45] CHAI, Y., L. MEI, G. WU, D. LIN und S. YAO: *Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules*. Biotechnology and Bioengineering, 87(2):228–233, 2004.
- [46] BLANDINO, A., M. MACIAS und D. CANTERO: *Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(6):686–689, 1999.
- [47] HILLS, B. P., J. GODWARD, M. DEBATTY, L. BARRAS, C. P. SATURIO und C. OUWERX: *NMR studies of calcium induced alginate gelation. Part II. The internal bead structure*. Magnetic Resonance in Chemistry, 38:719–728, 2000.
- [48] ZIMMERMANN, H., M. HILLGÄRTNER, B. MANZ, P. FEILEN, F. BRUNNENMEIER, U. LEINFELDER, M. WEBER, H. CRAMER, S. SCHNEIDER, C. HENDRICH, F. VOLKE und U. ZIMMERMANN: *Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging*. Biomaterials, 24(12):2083–2096, 2003.
- [49] CONSTANTINIDIS, I.: *Non-Invasive Evaluation of Alginate/Poly-L-lysine/Alginate Microcapsules by Magnetic Resonance Microscopy*. Biomaterials, 22(5):2438–2445, 2007.
- [50] WWW.DOTY-NMR.COM: *Doty Susceptibility-Matched Sample Plugs for High Resolution Liquids NMR*. http://www.dotynmr.com/acc/acc_susplugspg.htm, 2012.
- [51] MAO, X. und C. YE: *Understanding Radiation Damping in a Simple Way*. Concepts in Magnetic Resonance, 9(3):173–187, 1997.
- [52] TURNER, D.: *Phase Cycling*. In: *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, 2007.
- [53] LEICK, S., S. HENNING, P. DEGEN, D. SUTER und H. REHAGE: *Deformation of liquid-filled calcium alginate capsules in a spinning drop apparatus*. Physical Chemistry Chemical Physics, 12(12):2950–2958, 2010.
- [54] FRAHM, J. und W. HÄNICKE: *Single Voxel Localized Proton NMR Spectroscopy of Human Brain In Vivo*. In: *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, 2007.

- [55] BROWN, T. R.: *Chemical Shift Imaging*. In: *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, 2007.
- [56] POTTER, K. und E. W. MCFARLAND: *Ion transport studies in calcium alginate gels by magnetic resonance microscopy*. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 6(4):323–331, 1996.
- [57] GORDON, M. J., K. C. CHU, A. MARGARITIS, A. J. MARTIN, C. R. ETHIER und B. K. RUTT: *Measurement of Gd-DTPA diffusion through PVA hydrogel using a novel magnetic resonance imaging method*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(4):459–67, 1999.
- [58] THELWALL, P. E., A. A. NEVES und K. M. BRINDLE: *Measurement of Bioreactor Perfusion Using Dynamic Contrast Agent-Enhanced Magnetic Resonance Imaging*. *Biotechnology and Bioengineering*, 75:682–690, 2001.
- [59] KIRSCH, J. E.: *Basic principles of magnetic resonance contrast agents*. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 3(2):1–18, 1991.
- [60] WWW.SIGMA-ALDRICH.COM: *Diethylenetriaminepentaacetic acid gadolinium(III) dihydrogen salt hydrate*. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=381667|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC, 2012.
- [61] GRAUMANN, R., A. OPPELT und E. STETTER: *Multiple-spin-echo imaging with a 2D Fourier method*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 3(5):707–721, 1986.
- [62] FICK, A.: *Über die Diffusion*. *Annalen der Physik*, 170:59–86, 1855.
- [63] CRANK, J.: *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, Oxford, 1979.
- [64] CHEN, D., Z. LEWANDOWSKI, F. ROE und P. SURAPANENI: *Diffusivity of Cu²⁺ in calcium alginate gel bead*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:755–760, 1993.
- [65] ELST, V., A. SESCOYE, S. LAURENT und R. MULLER: *Can the Theoretical Fitting of the Proton-Nuclear-Magnetic-Relaxation-Dispersion (Proton NMRD) Curves of Paramagnetic Complexes Be Improved by Independent Measurement of Their Self-Diffusion Coefficients?* *Helvetica Chimica Acta*, 88:574–587, 2005.
- [66] JANG, L. K., W. BRAND, M. RESONG, W. MAINIERI und G. G. GEESEY: *Feasibility of using alginate to absorb dissolved copper from aqueous media*. *Environmental Progress*, 9(4):269–274, 1990.
- [67] PHAN THE, D., F. DEBEAUFORT, D. LUU und A. VOILLEY: *Moisture barrier, wetting and mechanical properties of shellac/agar or shellac/cassava starch bilayer biomembrane for food applications*. *Journal of Membrane Science*, 325(1):277–283, 2008.
- [68] BERLINER, L. J.: *Spin Labeling: Theory and Applications*. Academic Press, New York, 1976.

- [69] PRIOR, R. L. und X. WU: *Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities*. Free Radical Research, 40(10):1014–1028, 2006.
- [70] MAZZA, G. und E. MINIATI: *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*, Band 38. CRC Press, London, 1993.
- [71] GIUSTI, M. M. und R. E. WROLSTAD: *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. In: WROLSTAD, R. E., T. E. ACREE, H. AN, E. A. DECKE, M. H. PENNER, D. S. REID, S. J. SCHWARTZ, P. SPORNS und C. F. SHOEMAKER (Herausgeber): *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wiley-VCH, New-York, 2001.
- [72] STRACK, D. und V. WRAY: *The anthocyanins*. In: HARBORNE, J.B. (Herausgeber): *The Flavonoids Advances in Research Since 1986*, Seiten 1–23. Chapman and Hall, London, 1994.
- [73] PRIOR, R. L.: *Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential health effects*. In: MESKIN, M. S., W. R. BIDLACK, A. J. DAVIES, D. S. LEWIS und R. K. RANDOLPH (Herausgeber): *Phytochemicals: Mechanisms of Action*, Seiten 1–19. CRC Press, Boca Raton, 2004.
- [74] WEINGÄRTNER, H. und M. HOLZ: *NMR studies of self-diffusion in liquids*. Annual Reports Progression of Chemistry, Section C, 98:121–155, 2002.
- [75] PRICE, W. S.: *Pulsed field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory*. Concepts in Magnetic Resonance, 9(5):299–336, 1997.
- [76] PRICE, W. S.: *Pulsed field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part II. Experimental aspects*. Concepts in Magnetic Resonance, 10(4):197–237, 1998.
- [77] STILBS, P.: *Fourier Transform Pulsed-Gradient Spin-Echo Studies of Molecular Diffusion*. Progress in NMR Spectroscopy, 19:1–45, 1987.
- [78] STEJSKAL, E. O. und J. E. TANNER: *Spin diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient*. Journal of Chemical Physics, 42(1):288–292, 1965.
- [79] MILLS, R.: *Self-Diffusion in Normal and Heavy Water in the Range 1–45°*. Journal of Physical Chemistry, 77(5):685–688, 1973.
- [80] WYZGOSKI, F. J., L. PAUDEL, P. L. RINALDI, R. N. REESE, M. OZGEN, A. Z. TULIO, A. R. MILLER, J. C. SCHEERENS und J. K. HARDY: *Modeling relationships among active components in black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) fruit extracts using high-resolution (1)H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and multivariate statistical analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(6):3407–3414, 2010.

-
- [81] CHAI, Y., L. MEI, D. LIN und S. YAO: *Diffusion Coefficients in Intrahollow Calcium Alginate Microcapsules*. Journal of Chemical & Engineering Data, 49(3):475–478, 2004.
- [82] MOE, S. T., G. SKJAAK-BRAEK, A. ELGSAETER und O. SMIDSRØED: *Swelling of covalently crosslinked alginate gels: influence of ionic solutes and nonpolar solvents*. Macromolecules, 26:3589–3597, 1993.
- [83] HENNING, S., D. EDELHOFF, B. ERNST, S. LEICK, H. REHAGE und D. SUTER: *Characterizing permeability and stability of microcapsules for controlled drug delivery by dynamic NMR microscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 221:11–18, 2012.
- [84] HSU, EDWARD W., JOSEPH S. SCHOENIGER, RICHARD BOWTELL, NANJI R. AIKEN, ANTHONY HORSMAN und STEPHEN J. BLACKBAND: *A Modified Imaging Sequence for Accurate T2 Measurements Using NMR Microscopy*. Journal of Magnetic Resonance, Series B, 109:66–69, 1995.
- [85] MEIBOOM, S. und D. GILL: *Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times*. Review of Scientific Instruments, 29(8):688–691, 1958.
- [86] POON, C. S. und R. M. HENKELMAN: *Practical T2 quantitation for clinical applications*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2(5):541–553, 1992.
- [87] EDZES, H. T., D. VAN DUSSCHOTEN und H. VAN AS: *Quantitative T2 Imaging of Plant Tissue by means of multi-Echo MRI Microscopy*. Magnetic Resonance Imaging, 16(2):185–196, 1998.
- [88] WONG, S. T. und M. S. ROOS: *Effects of slice selection and diffusion on T2 measurement*. Magnetic Resonance in Medicine, 5:358–365, 1987.
- [89] DEENE, Y., C. WAGTER, W. NEVE und E. ACHTEN: *Artefacts in multi-echo T2 imaging for high-precision gel dosimetry: I. Analysis and compensation of eddy currents*. Physics in Medicine and Biology, 45:1807–1823, 2000.
- [90] FREEMAN, R. und H. HILL: *Fourier Transform Study of NMR Spin-Lattice Relaxation by Progressive Saturation*. Journal of Chemical Physics, 54(8):3367–3377, 1971.
- [91] VOLD, R. L., J. S. WAUGH, M. P. KLEIN und D. E. PHELBS: *Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems*. Journal of Chemical Physics, 48(8):3831–3832, 1968.
- [92] EDELHOFF, D.: *NMR-Mikroskopie an Mikrokapseln: Visualisierung der Auflösung und Charakterisierung der Wasserdiffusion in Kapsel-Wandmaterialien*. Diplomarbeit, TU Dortmund, 2011.
- [93] WRIGHT, P. J., E. CIAMPI, C. L. HOAD, A. C. WEAVER, M. VAN GINKEL, L. MARCIANI, P. GOWLAND, M. F. BUTLER und P. RAYMENT: *Investigation of alginate gel inhomogeneity in simulated gastro-intestinal conditions using magnetic resonance imaging and transmission electron microscopy*. Carbohydrate Polymers, 77(2):306–315, 2009.
-

- [94] WILMS, C.: *Bildgebende NMR an Flüssigkeiten und Mikrokapseln*. Diplomarbeit, TU Dortmund, 2010.
- [95] HEINZE, T., D. KLEMM, F. LOTH und B. PHILIPP: *Herstellung, Struktur und Anwendung von ionotropen Gelen aus carboxygruppenhaltigen Polysacchariden*. *Acta Polymerica*, 41(5):259–269, 1990.
- [96] PATHAK, T. S., J. YUN, J. LEE und K. PAENG: *Effect of calcium ion (cross-linker) concentration on porosity, surface morphology and thermal behavior of calcium alginates prepared from algae*. *Carbohydrate Polymers*, 81:633–639, 2010.
- [97] SERP, D., M. MUELLER, U. VON STOCKAR und I. W. MARISON: *Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca^{2+} -alginate beads*. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(3):253–259, 2002.
- [98] RAYMENT, P., P. WRIGHT, C. HOAD, E. CIAMPI, D. HAYDOCK, P. GOWLAND und M. BUTLER: *Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterisation*. *Food Hydrocolloids*, 23:816–822, 2009.
- [99] PEL, L. und H. HUININK: *NMR Imaging of Moisture and Ion Transport in Building Materials*. In: CODD, S. L. und J. D. SEYMOUR (Herausgeber): *Magnetic Resonance Microscopy*, Kapitel 28, Seiten 451–464. Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [100] DAVIES, S. und K. J. PACKER: *Pore-size distributions from nuclear magnetic resonance spin-lattice relaxation measurements of fluid-saturated porous solids. I. Theory and simulation*. *Journal of Applied Physics*, 67(6):3163, 1990.
- [101] HILLS, B. P. und J. SNAAR: *Water proton relaxation studies of pore microstructure in monodisperse glass bead beds*. *Molecular Physics*, 84(1):141–157, 1995.
- [102] TSUKAHARA, T., W. MIZUTANI, K. MAWATARI und T. KITAMORI: *NMR studies of structure and dynamics of liquid molecules confined in extended nanopores*. *Journal of Physical Chemistry B*, 113:10808–10816, 2009.
- [103] ZIMMERMANN, J. R. und W. E. BRITTIN: *Nuclear Magnetic Resonance Studies In Multiple Phase Systems: Lifetime of a Water Molecule in an Adsorbing Phase on Silica Gel*. *Journal of Physical Chemistry*, 61(4):1328–1333, 1957.
- [104] BROWNSTEIN, K. und C. TARR: *Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells*. *Physical Review A*, 19(6):2446–2453, 1979.
- [105] KLEIN, J., J. STOCK und K. D. VORLOP: *Pore Size and Properties of Spherical Ca-Alginate Biocatalysts*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18:86–91, 1983.

-
- [106] CHAVEZ, F. V., E. PERSSON und B. HALLE: *Internal water molecules and magnetic relaxation in agarose gels*. Journal of the American Chemical Society, 128(14):4902–4910, 2006.
- [107] HILLS, B. P., C. CANO und P. S. BELTON: *Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems*. Macromolecules, 24(10):2944–2950, 1991.
- [108] BELTON, P. S., B. P. HILLS und E.R. RAIMBAUD: *The effects of morphology and exchange on proton N.M.R. relaxation in agarose gels*. Molecular Physics, 63(5):825–842, 1988.
- [109] BLOEMBERGEN, N., E. PURCELL und R. POUND: *Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption*. Physical Review, 73(7):679–715, 1948.
- [110] TAYLOR, D. G. und M. C. BUSHELL: *The spatial mapping of translational diffusion coefficients by the NMR imaging technique*. Physics in Medicine and Biology, 30(4):345–349, 1985.
- [111] LE BIHAN, D., J. F. MANGIN, C. POUPON, C. A. CLARK, S. PAPPATA, N. MOLKO und H. CHABRIAT: *Diffusion tensor imaging: concepts and applications*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 13(4):534–546, 2001.
- [112] MARSHALL, P., J. E. SNAAR, Y. L. NG, R. W. BOWTELL, F. C. HAMPSON, P. W. DETTMAR und C. D. MELIA: *A novel application of NMR microscopy: measurement of water diffusion inside bioadhesive bonds*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 19(3-4):487–488, 2001.
- [113] DEGRASSI, A., R. TOFFANIN, S. PAOLETTI und L. D. HALL: *A better understanding of the properties of alginate solutions and gels by quantitative magnetic resonance imaging (MRI)*. Carbohydrate Research, 306:19–26, 1998.
- [114] SEN, P. N.: *Time-dependent diffusion coefficient as a probe of geometry*. Concepts in Magnetic Resonance, 23A(1):1–21, 2004.
- [115] FRAHM, J., K. MERBOLDT und W. HANICKE: *Localized proton spectroscopy using stimulated echoes*. Journal of Magnetic Resonance, 72(3):502–508, 1987.
- [116] DE GRAAF, R. A.: *In Vivo NMR Spectroscopy - Dynamic Aspects*. In: *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. John Wiley & Sons, 2. Auflage, 2007.

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen in Fachmagazinen

1. S. HENNING, D. EDELHOFF, S. LEICK, H. REHAGE und D. SUTER: *Permeability and Stability of Microcapsules*. Proceedings of the 11th International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food 2012, im Druck.
2. S. HENNING, D. EDELHOFF, B. ERNST, S. LEICK, H. REHAGE und D. SUTER: *Characterizing permeability and stability of microcapsules for controlled drug delivery by dynamic NMR microscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 221:11–18, 2012.
3. S. HENNING, S. LEICK, M. KOTT, H. REHAGE und D. SUTER: *Sealing liquid-filled pectinate capsules with a shellac coating*. Journal of Microencapsulation, 29(2):147–155, 2012.
4. S. LEICK, M. KOTT, P. DEGEN, S. HENNING, T. PÄSLER, D. SUTER und H. REHAGE: *Mechanical properties of liquid-filled shellac composite capsules*. Physical Chemistry Chemical Physics, 13(7):2765–2773, 2011.
5. S. LEICK, S. HENNING, P. DEGEN, D. SUTER und H. REHAGE: *Deformation of liquid-filled calcium alginate capsules in a spinning drop apparatus*. Physical Chemistry Chemical Physics, 12(12):2950–2958, 2010.

Vorträge auf internationalen Konferenzen

1. *Permeability and Stability of Microcapsules*. 11th International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food, Wageningen (Niederlande), Juni 2012.
2. *Measuring the Permeability of Microcapsules with NMR Imaging*. Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Miami (Vereinigte Staaten), April 2012.

Posterpräsentationen auf internationalen Konferenzen

1. *Quantitative Measurements of Diffusion into Microcapsules for Drug Delivery*. EUROMAR, Frankfurt (Deutschland), August 2011.

Danksagung

Die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen machte die Entstehung und das Gelingen dieser Arbeit erst möglich. Hier möchte ich mich deshalb bei einigen Personen bedanken.

Als Erstes ist dabei mein Doktorvater Prof. Dr. Dieter Suter zu nennen. Ihm danke ich dafür, dass er mir die Durchführung dieses Projektes an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat und ich zu jeder Zeit seine hervorragende wissenschaftliche Unterstützung erfahren durfte.

Prof. Dr. Heinz Rehage (Physikalische Chemie II, TU Dortmund) möchte ich für die Ermöglichung der überaus gelungenen Kooperation mit seinem Lehrstuhl und die Übernahme der Zweitgutachtertätigkeit danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Sabine Leick. Sie machte eine sehr erfolgreiche Zusammenarbeit möglich und stand mir jederzeit mit ihrer chemischen Fachkompetenz beratend zur Seite.

Dr. Sabine Leick, Dr. Wieland Worthoff und Diplom-Physiker Daniel Edelhoff danke ich für die Korrekturarbeit an meiner Dissertation.

Für ihre enorme Tatkraft während ihrer Laborarbeit und ihr Interesse an diesem Forschungsthema möchte ich mich bei den ehemaligen Diplomanden und Bachelorstudenten Daniel Edelhoff, Christoph Wilms, Benedikt Ernst, Marvin Heil und Tobias Päsler bedanken.

Allen aktuellen und ehemaligen Angestellten, Doktoranden und Studierenden am Lehrstuhl Experimentelle Physik III möchte ich für das tolle Arbeitsklima und die stetige Bereitschaft zur Hilfeleistung danken. Insbesondere habe ich mich dabei bei Daniel Edelhoff und Mirjam Holbach zu bedanken, die immer für eine gute Stimmung und kreative Ablenkungen in unserem Büro sorgten.

Bei technischen Problemen standen mir Anja Sapsford und Dr. Reiner Kuchler immer sofort helfend zur Seite, weshalb ihnen hiermit auch ein großer Dank ausgesprochen wird.

Ein weiteres Dankeschön muss auch der Technischen Universität Dortmund zugesprochen werden, die mich zwei Jahre durch ein Stipendium der Bestenförderung unterstützt hat.

Hervorzuheben ist natürlich auch die zu Dank verpflichtende wertvolle Ablenkung und moralische Unterstützung, die mir meine Familie und meine Freunde gegeben haben.