

Herstellung und Charakterisierung von Polymernanopartikeln mit Aktivester-Oberfläche

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Marc Herold

aus
Hanau

Hauptberichter:	Prof. Dr. techn. H. Brunner
Mitberichter:	Prof. Dr. C. D. Eisenbach
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Juli 2004

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2004

Herstellung und Charakterisierung von Polymernanopartikeln mit Aktivester-Oberfläche

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Marc Herold

aus
Hanau

Hauptberichter:	Prof. Dr. techn. H. Brunner
Mitberichter:	Prof. Dr. C. D. Eisenbach
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Juli 2004

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2004

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. Brunner danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Fraunhofer IGB durchzuführen.

Besonders danke ich Dr. Günter E.M. Tovar für die sehr gute Betreuung der Arbeit und das interessante Thema.

Ich danke ausserdem Dr. Iris Kräuter für die Anfertigung der AFM-Aufnahmen, Dr. Thomas Schiestel für seine Hilfe bei den Fluoreszenz-Analysen, PD Dr. Klaus Dirnberger und Corinne Rost vom Institut für Angewandte Polymerforschung der Universität Stuttgart für die Durchführung der NMR-Analysen. Jürgen Schmucker danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den massenspektrometrischen Messungen. Dr. Iris Trick für die Durchführung des Tests auf antibakterielle Wirksamkeit. Dr. Achim Weber danke ich für die Unterstützung bei den Mikrokalorimetrie-Messungen. Sven Knecht danke ich für die Durchführung der Spotting-Versuche. Silvia Smolka, Nadja Reinhardt, Melanie Dettling, Jörg Alexander Pfeiffer und Jingcheng Li danke ich ganz herzlich für die Mitarbeit im Labor.

Bei Prof. Dr. Klaus Tauer (MPI für Kolloidforschung, Golm) und Dr. Carmen Gruber bedanke ich mich für hilfreiche Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN	3
INHALTSVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	7
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
2 SUMMARY	12
3 EINLEITUNG	17
3.1 Aufgabenstellung	19
4 METHODEN	21
4.1 Dynamische Lichtstreuung und Mikroelektrophorese	21
4.2 Polyelektrolyttitrationen	25
4.3 Tensiometrie und Bestimmung der Adsorptionsparameter	25
4.4 Matrixunterstützte Laser Desorptions/Ionizations Flugzeit- Massenspektrometrie	27
4.5 Rasterelektronenmikroskopie	29
4.6 Mikrokolorimetrie	30
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	31
5.1 Synthesestrategie für potentielle Surfmoleküle	31
5.1.1 Synthese von 11-(Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat	37
5.1.2 Synthese von 11-Acryloylaminoundecansäure und 11-Methacryloyl- aminoundecansäure	37
5.1.3 Synthese von p-(11(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsul- foniummethylsulfat (AUPDS) und p-(11(Methacrylamido)undecan- oyloxy)phenylmethylsulfat (MUPDS)	38
5.1.4 Synthese von 6-Acryloylaminohexansäure	41
5.1.5 Synthese von p-(6(Acrylamido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfonium- methylsulfat (AHPDS)	41

5.1.6	Synthese von p-(6-(Maleinimido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfonium-methylsulfat (MIHPDS)	42
5.1.7	Diskussion der Synthesen	44
5.2	Grenzflächenaktivität der Surfmere	46
5.2.1	Grenzflächenaktivität von (Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfonium-methylsulfat	46
5.2.2	Grenzflächenaktivitätsmessungen der potentiellen Surfmere AUPDS und MUPDS	46
5.2.2.1	Berechnung und Diskussion der Surfmer-Adsorptionsparameter	47
5.3	Surfmerreaktivität	49
5.3.1	Reaktivität von AUPDS gegenüber Ethanolamin	50
5.3.2	Reaktivität AUPDS gegenüber n-Butylhydrazid	52
5.3.3	Reaktion des Surfmers mit Streptavidin	53
5.4	Antibakterielles Verhalten der Surfmere	59
5.5	Polymerisationsverhalten der Surfmere	62
5.5.1	Homopolymerisationen	62
5.5.2	<i>Core-shell</i> Polymerisationen mit UPDS	64
5.5.3	Copolymerisation von AUPDS und MUPDS mit Methylmethacrylat	68
5.5.3.1	Initiatorvergleich	69
5.5.3.2	Nachweis der Copolymerisation von Methylmethacrylat und den Aktivester-Surfmeren	73
5.5.3.3	Kinetik der Copolymerisation von MMA und AUPDS	77
5.5.3.4	Kinetik der Copolymerisation von MMA mit MUPDS	84
5.5.3.5	Einfluss der Surfmer-Konzentration auf die Partikelgröße	87
5.5.3.6	Bestimmung der ionischen Gruppen auf der Oberfläche von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln	92
5.5.4	<i>Batch</i> -Copolymerisation von AUPDS und MUPDS mit Styren	101
5.6	Reaktionen an Aktivestersurfmer-Partikeloberflächen	106
5.6.1	Umsetzung mit Ethanolamin und Butylhydrazid	106
5.6.2	Umsetzung mit 6-Fluoresceinamin	109
5.6.3	Immobilisierung von Streptavidin	111
5.6.4	Hydrolysestabilität der Aktivester-Partikel auf p(St-co-AUPDS)-Oberflächen	115
5.6.4.1	Stabilität des Latex-Rohprodukts	115
5.6.4.2	Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit des partikelgebundenen Aktivesters vom pH-Wert der flüssigen Phase	120
5.6.5	Mikro-Spotting von Surfmer-Partikeln auf Siliziumoberflächen	122

6	AUSBLICK	126
7	MALDI-TOF-MS-DATEN	128
8	MATERIALIEN	133
9	GERÄTE	136
10	LITERATUR	140
11	LEBENS LAUF	153

Abkürzungen und Symbole

a_s	Platzbedarf eines Tensid-Moleküls an der Luft/Wasser-Grenzfläche
Γ_S	Grenzflächenkonzentration nach GIBBS
$[M+H]^+$	Bezeichnung des MS Signals eines einfach protonierten Analyten
AFM	Atomic force microscopy
AHPDS	p-(6-(Acrylamido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat
AIBA	2,2'-Azobis-(2-Methylpropionamidin)dihydrochlorid
AUPDS	p-(11-(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat
b_{AUPDS}	AUPDS-Molalität
$b_{AUPDS \text{ max}}$	theoretisch erreichbare AUPDS-Molalität bei 100% Copolymerisation
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
$c_{\Sigma M_i}$	Gesamtkonzentration der Monomere M_i
\bar{d}_{DLS}	Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser der dynamischen Lichtstreuung
Da	Dalton $/(g \text{ mol}^{-1})$
DBF	Di-Butylfumarat
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
FA	Fluoreszeinamin
IR	Infrarot
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K_a	Affinitätskonstante
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry
Me	Methyl
MIHPDS	p-(6-(Maleinimidio)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat
MMA	Methylmethacrylat
MOEA	2-Methoxyethylamin

MS	Massenspektrometrie
MUPDS	p-(11-(Methacrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat
MWCO	molecular weight cutoff
n	Stoffmenge /mol
n.b.	nicht bestimmbar
N_c	Partikelanzahl pro Volumen
NMR	Nuclear magnetic resonance
PCS	Photonen-Korrelations-Spektroskopie
PDADMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
PDS	(4-Hydroxyphenyl)-dimethylsulfoniummethylsulfat
PES	Natriumpolyethensulfonat
Ph	Phenyl
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R_p	Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit $/(mol\ L^{-1}\ s^{-1})$
SAv	Streptavidin
St	Styren
t	Zeit
TFA	Trifluoressigsäure
U	Umsatz $/(mol\ \%)$
UPDS	p-(11-Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat
VA-086	2,2'-Azobis [2-Methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamid]
WFR	Wiederfindungsrate
ΔH	Reaktionsenthalpie

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Syntheseweg für neue, modular aufgebaute Surfmere zur Nanopartikel-Herstellung entwickelt. ω -Aminosäuren wie 11-Aminoundecansäure und 6-Aminohexansäure wurden erfolgreich zur zweistufigen Synthese von p-(11-(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AUPDS), p-(11-(Methacrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MUPDS), p-(6-(Acrylamido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AHPDS) und p-(6-(Maleimidio)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MIHPDS) (s. Abbildung 5-3 auf S. 36) eingesetzt. Die Synthesen führten zu Ausbeuten im Bereich von 70 % bis 80 % und lieferten die Produkte in einer Reinheit von > 90 %.

Die Surfmere AUPDS und MUPDS besitzen grenzflächenaktive Eigenschaften und senken die Oberflächenspannung der Luft/Wasser-Grenzfläche auf $40,5 \text{ mN m}^{-1}$ (AUPDS) und $58,5 \text{ mN m}^{-1}$ (MUPDS). Beide Moleküle bilden bei einer charakteristischen Konzentration Mizellen in Wasser, wobei die kritische Mizellbildungskonzentration für MUPDS mit $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ niedriger ist als die für AUPDS mit $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Aus den Adsorptionsisothermen der Moleküle wurde ausserdem deren Platzbedarf an der Luft/Wasser-Grenzfläche bestimmt. AUPDS und MUPDS beanspruchen mit $1,42 \text{ nm}^2$ und $1,69 \text{ nm}^2$ mehr Fläche als das bereits bekannte Surfmer p-(11-Undecenoyloxy-phenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat (UPDS) mit $1,05 \text{ nm}^2$. Die Unterschiede in der Grenzflächenaktivität und dem Platzbedarf der untersuchten Moleküle wurden auf das im Vergleich mit UPDS größere Volumen der Acrylamid- und Methacrylamid-Gruppen zurückgeführt.

Die chemische Reaktivität von AUPDS und MUPDS wurde anhand von Umsetzungen der Surfmere mit Ethanolamin, n-Butylhydrazid und dem Protein Streptavidin untersucht. Die Aktivester-Verbindungen reagieren dabei in wässrigem, phosphat- oder boratgepufferten Medium bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8,5. Bei der Reaktion mit Streptavidin wurde zusätzlich mittels Massenspektrometrie herausgefunden, dass bei einem pH-Wert von 8,5 bis zu fünf Acylierungen des Proteins stattfinden, wohingegen bei pH 7,5 nur bis zu vier Moleküle AUPDS mit einem Streptavidin-Monomer reagieren. Eine Verlängerung der Reaktionsdauer von zwei auf 16 Stunden bewirkt ebenfalls eine verstärkte Acylierung. Unter denselben Reaktionsbedingungen erfolgten beim Einsatz von MUPDS zwei bis drei Acylierungen und bei Verwendung von MIHPDS nur ein bis zwei Acylierungen des Streptavidins. Die Reaktivität der Surfmere steigt also in der Reihenfolge MIHPDS < MUPDS < AUPDS an.

Wie durch mikrobiologische Experimente gezeigt werden konnte, besitzt unpolymerisiertes AUPDS sowohl gegen die gram-positiven *Mikrococcus luteus* als auch

gegen die gram-negativen *Escherichia coli* Bakterien antibakterielle Aktivität. Diese Eigenschaft korreliert mit der Anwesenheit der Sulfonium-Gruppe der Surfmere.

Das Polymerisationsverhalten von MUPDS und AUPDS wurde ausführlich untersucht. AUPDS und MUPDS können als polymerisierbare Tenside bei der Emulsionspolymerisation von Methylmethacrylat (MMA) oder Styren (St) eingesetzt werden. Mit beiden Comonomeren wurden unter Verwendung von 2,2'-Azobis-(2-Methylpropionamidin)dihydrochlorid (AIBA) als Initiator Polymer-Nanopartikel hergestellt. Der Einsatz anderer Initiatorien wie Kaliumperoxodisulfat oder 2,2'-Azobis (2-Methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamid) („VA-086“) führte im System p(MMA-co-AUPDS) oder p(MMA-co-MUPDS) entweder zu sehr niedrigen Umsätzen oder nicht zur Bildung von Partikeln. Das besondere Verhalten des AIBA wurde durch die positive Ladung im initiiierenden Radikal während des Kettenstarts und des Kettenwachstums erklärt. Möglicherweise findet eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem wachsenden Oligoradikal und den Initiator-Radikalen statt, durch die eine schnelle Radikal-Rekombination verhindert wird.

Die Copolymerisation von AUPDS und MMA zu p(MMA-co-AUPDS) wurde durch die ¹H-NMR Analyse der Emulsionspolymerisationsprodukte nachgewiesen. Ausserdem wurde anhand von Elementaranalyse und durch Polyelektrolyttitration zwischen dem copolymerisierten AUPDS im Partikelinnern und auf der Partikeloberfläche differenziert. Die Titrations lieferten das Ergebnis, dass 36 mol-% bis 62 mol % des eingesetzten AUPDS oberflächengebunden vorlag. Dabei nahm die Wiederfindungsrate mit steigender AUPDS-Konzentration der Ausgangsemulsion ab. Der mit der AUPDS-Konzentration ansteigende Anteil von eingeschlossenen Surfmern wurde mit der zunehmenden mizellaren Nukleation während des Polymerisationsvorgangs erklärt.

Die Berechnung der Oberflächenladungsdichte auf den Partikeln aus den Daten der Polyelektrolyttitration ergibt eine Fläche von 1,24 nm² bis 0,70 nm² pro Aktivester-Gruppe. Aus sterischen Abschätzungen des AUPDS-Flächenbedarfs wurde mit diesen Werten eine Flächenbelegung von 29 % bis 51 % berechnet. Der Vergleich von berechneter Oberflächenladungsdichte und den Ergebnissen der Tensiometrie zeigte jedoch, dass der Flächenbedarf der Moleküle an der Luft/Wasser-Grenzfläche größer ist, als auf der Oberfläche der Partikel.

Die Abhängigkeit der Partikelanzahl von der Surfmernkonzentration folgte für den Konzentrationsbereich unterhalb der CMC_{AUPDS} der von SMITH und EWART beschriebenen Proportionalität von $N \propto c_{AUPDS}^{0,6}$. Dagegen wurde für den Konzentrationsbereich oberhalb der CMC eine Abhängigkeit nach der Funktion $N \propto c_{AUPDS}^{0,38}$ ermittelt.

Die Kinetik der Copolymerisation von AUPDS und MMA folgt weitgehend dem Drei-Phasen-Modell nach HARKINS. Für die AIBA-initiierte Polymerisation mit 0,5 mol-%

AUPDS wurde eine konstante Partikelanzahl N_c von $2,5 \cdot 10^{16} \text{ L}^{-1}$ über den gesamten beobachteten Reaktionszeitraum gefunden. Für die Phase des Polymerisationsbeginns wurde ein Anstieg der Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit beobachtet, darauf folgte ein breites Maximum der Geschwindigkeit mit anschließendem Absinken zum Ende der Polymerisation. Aus den Informationen der Partikelanzahlbestimmung und der Polymerisationsgeschwindigkeit wurde geschlossen, dass die während der Nukleationsphase gebildeten Partikel zuerst durch herandiffundierendes und polymerisiertes Monomer wachsen. Wird kein weiteres Monomer nachgeliefert, sinkt die Polymerisationsgeschwindigkeit und die Partikelgröße ändert sich nicht mehr. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die hergestellten Partikel eine schmale Größenverteilung besaßen.

Die Abfolge der beschriebenen Polymerisations-Phasen blieb auch gleich, wenn die AUPDS Menge von 0,5 mol-% auf 1,2 mol-% erhöht wurde. Durch die größere Surfmer-Konzentration wurde die maximale Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit in der zweiten Phase erhöht und die Partikelanzahl vergrößert. Auch wenn MUPDS in gleicher Konzentration statt AUPDS zur Emulsionspolymerisation eingesetzt wurde, blieben die Parameter der Polymerisations-Kinetik weitgehend unverändert.

Der Einfluss der Surfmerkonzentration auf den Partikeldurchmesser und die daraus berechnete Partikelanzahl wurde für die Comonomersysteme p(MMA-co-AUPDS) und p(St-co-AUPDS) untersucht. Im Surfmer-Konzentrationsbereich von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ bis 50 mmol L^{-1} wurden p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit einem Durchmesser von 109 nm bis 167 nm hergestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Partikelgröße der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit steigender Surfmerkonzentration abnimmt. Diese Abnahme war oberhalb der $\text{CMC}_{\text{AUPDS}}$ weniger stark als unterhalb. Dieses Verhalten wurde auf eine zunehmende mizellare Nukleation oberhalb der Mizellbildungskonzentration zurückgeführt. Wurde Styren als Comonomer eingesetzt, entstehen im gleichen Konzentrationsbereich Partikel mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern von 58 nm bis 127 nm.

Die Aktivester-Funktionen der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel wurden mit Ethanolamin, n-Butylhydrazid, Fluoresceinamin und Streptavidin umgesetzt. Die Umsetzung mit Ethanolamin und n-Butylhydrazid wurde dabei qualitativ mit Mikroelektrophorese nachgewiesen. Die Reaktion führte beim Einsatz von Ethanolamin zu Partikeln, die ein ζ -Potential von -23 mV besaßen, und bei der Verwendung von n-Butylhydrazid zu Partikeln mit einem ζ -Potential von $(0 \pm 5) \text{ mV}$. Vom copolymerisierten Surfmer konnten 2,1 mol-% bis 13,3 mol-% mit 6-Fluoresceinamin umgesetzt werden. Diese Menge an Surfmer entspricht einem Gehalt von bis zu $9,6 \text{ } \mu\text{mol}$ reaktiven Aktivester-Gruppen pro 1 g Polymer.

Die Umsetzung der partikelgebundenen Aktivester-Funktionen mit Streptavidin wurde durch MALDI-TOF-MS Messungen belegt und durch Titration der Partikel mit Biotin-4-Fluorescein quantifiziert. Auf 1 g p(St-co-AUPDS)-Partikel wurden bis zu 28 mg Streptavidin immobilisiert. Ausserdem wurde mit dem durch dynamische Lichtstreuung gemessenen Durchmesser die Gesamtoberfläche der p(St-co-AUPDS)-Partikel berechnet. Damit wurde abgeschätzt, dass ein Streptavidin Tetramer einen Bereich von $(160 \pm 20) \text{ nm}^2$ belegt. Die Oberfläche der Partikel ist demnach nicht so dicht mit Streptavidin bedeckt wie planare Substrate. Ein Tetramer Streptavidin belegt bei 2D-Kristallisation eine Fläche von 31 nm^2 .

Die Langzeitstabilität der Latices bezüglich der Hydrolyse der Aktivester-Gruppen wurde kalorimetrisch untersucht. Die p(St-co-AUPDS)-Partikel wurden dazu mit dem durch eine aromatische Amin-Funktion nukleophilen Farbstoff Remazolblau titriert. Die Endpunktsbestimmung erfolgte mit isothermaler Titrations-Mikrokalorimetrie. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei einer Aufbewahrungstemperatur des Latex von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ als auch bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Hydrolyse der Aktivester-Funktionen der p(St-co-AUPDS)-Partikel stattfindet. Die Halbwertszeit der Hydrolyse konnte von 9 Tagen auf 65 Tage verlängert werden, wenn die Partikel statt bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt wurden.

Mikrostrukturierungsversuche mit p(St-co-AUPDS)-Partikeln zeigten, dass die Aktivester-Funktionen der Partikel auch nach dem Aufbringen auf eine Glasoberfläche reaktiv gegen Fluoresceinamin sind. Mit den Aktivester-Partikeln wurde daher zuerst eine Mikrostruktur erzeugt, die dann im nächsten Schritt durch Umsetzung mit Fluoresceinamin unter Fluoreszenzbedingungen sichtbar gemacht wurde. Die Partikel können aber auch zuerst mit einem Stickstoff-Nukleophil umgesetzt und dann zur Strukturierung verwendet werden.

Die Herstellung von Polymer-Nanopartikeln für die Biokonjugation wurde durch den Einsatz der Aktivester-Surfmerer stark vereinfacht, außerdem konnte wesentliche Erkenntnisse zum Reaktions- und Polymerisationsverhalten der neuen Moleküle gewonnen werden.

2 Summary

Polymer beads and latex particles have become important tools in modern biotechnology research^[1-7]. They are mainly used as solid phase carriers for handling proteins or peptides. Their high surface area allows for many binding sites for immobilization of the protein of interest. At the same time, they can also be used in fluid handling systems, e.g. microdispensers which allow for relatively easy use.

In order to bioconjugate with a protein, the particles must have a specific chemical function on their surface that is capable of binding with a functional group present on the protein molecule of interest. These functional groups must react chemically with each other under mild conditions to ensure that the protein's three-dimensional structure and hence its biological activity are retained.

Several routes to produce polymer particles displaying a chemically reactive surface for bioconjugation are in use today. Routes to polymer particles for bioconjugation with fewer reaction steps and without the need to use particle stabilizing surfactants would be very attractive. One way to achieve this is to use polymerizable surfactants or surfmers, bearing specific chemical functional groups for bioconjugation. Even though there are currently publications^[8-12] that describe particle preparation by co-polymerization of surfactant, little experimental work to date has been presented on this.

Nagai et al. opened a potentially attractive route by using surfmers bearing an activated ester function^[13-20]. They co-polymerized dialkylfumarates with undecenoyloxyphenyldimethylsulfonium methylsulfate (UPDS) on the surface of polystyrene particles having a diameter of 4.2 μm . The resulting *core-shell* particles featured an activated ester-group at the surface. Reaction of this group with 2-methoxyethylamine led to the formation of an amide functional surface.

The present work describes a straightforward synthetic route to the new designed modular active ester surfmers, p-(11-(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (AUPDS), p-(6-(Acrylamido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (AHPDS), p-(11-(Methacrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (MUPDS), p-(6-(N-Maleinimido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (MIHPDS) bearing activated ester groups. The chosen synthetic procedure proved to require only relatively simple reactions and resulted in the target molecules with a high yield. This synthetic route opens the way to a flexible choice of spacer length by choosing a ω -aminocarboxylic acid and an easy adaption for a large variety of polymerizable groups by varying the polymerizable acid chlorides. Thereby, the limitation of the existing route to the only known activated ester surfmer undecenoyloxyphenyldimethylsulfonium methylsulfate^[13], using a non-interchangeable alkenyl group with low reactivity was overcome by an attractive alternative.

The stability of the p-phenyldimethyl sulfonium group containing molecules against hydrolysis in aqueous media makes them useful for particle preparation by emulsion polymerization.

The determination of the surface activity and the critical micelle concentration (CMC) for MUPDS and AUPDS showed that AUPDS lowered the air-water surface tension to 40.5

mN m^{-1} , whereas MUPDS was less surface active (58.5 mN m^{-1}). Micellation occurs at surfmer concentrations of 3.2 and 6.0 mmol L^{-1} for MUPDS and AUPDS, respectively.

The built-in activated ester of AUPDS and MUPDS showed sufficient reactivity in aqueous solution against nitrogen-nucleophiles such as ethanolamine and n-butylhydrazide. The surfmeres are also able to acylate the lysine groups of the protein streptavidine up to five (AUPDS) or three times (MUPDS), which was determined using Mass-Spectrometry.

Mikrobiological experiments revealed the bactericidal effect of unpolimerized AUPDS. This effect was demonstrated by using gram+ *Mikrococcus luteus* and gram- *Echerichia coli* in growth inhibition experiments. It was supposed that the effect was evoked by the positively charged sulfonium group of the surfmer molecule.

The copolymerization behaviour of AUPDS and MUPDS with the comonomers methylmetacrylate (MMA) and styrene (St) was studied focused on the polymerization kinetics and the composition of the copolymers.

First we examined the ability of differently charged initiators to start the copolymerization between AUPDS or MUPDS and methylmetacrylate. The best results were obtained by using AIBA. We supposed this was due to the fact that the resulting polymer particles and the initiator are similarly charged.

The copolymerisation of AUPDS and MMA or St was clearly shown by $^1\text{H-NMR}$ of the resulting polymers.

The size of the resulting p(MMA-co-AUPDS) particles showed a clear dependence on the surfmer concentration. AUPDS starting concentrations from 0.5 mmol L^{-1} to 50 mmol L^{-1} led to particles with an average hydrodynamic diameter from 161 nm to 109 nm. Both scanning force and scanning electron microscopy proved a narrow size distribution of the particle charges. The full width at half maximum of the distribution was approximately 30 nm.

The particles showed a ζ -potential in the range from 20 mV to 24 mV as analysed by micro-electrophoresis which corresponded to the electrostatic stabilization by the positively charged sulfonium group of the surfmer. The surfmer groups were differentiated from initiator endgroups by polyelectrolyte titration and proved to be the determining charge containing species. Also the titration results quantified the molality of surfmer groups on the particle surface to an amount of 48 $\mu\text{mol g}^{-1}$ to 95 $\mu\text{mol g}^{-1}$. This corresponds to an AUPDS recovery rate which ranged from 36 mol-% to 62 mol-%.

Complementary to the determination of the surface-bounded ester-groups the total amount of copolymerized AUPDS was obtained by elemental analysis. The resulting data pointed out that the average AUPDS recovery rate averages 82 mol-%. Considering the

different recovery rates by the two methods, there has to be an effect that causes burying of the surfmer in the cores of the particles. This effect could be caused by micellar nucleation of the surfmer, when the copolymerization was carried out above the CMC.

Polymerization kinetics were examined by gravimetric analysis of the time dependent monomer-to-polymer conversion. Therefore we copolymerized AUPDS and MMA initiated by AIBA in an aqueous emulsion at 60 °C. In general, consistence was found with the HARKINS three stage model of emulsion polymerization^[21-24]. In the first stage an increasing conversion rate was observed caused by an increasing particle nucleation. The second stage was characterized by a maximum conversion rate up to 1 mmol s⁻¹ L⁻¹. In the last stage there was a declining conversion rate down below 1 mmol s⁻¹ L⁻¹.

Further investigations of the nucleation process led to the result that the particle number N in the polymerization process was nearly constant if an AUPDS concentration below the CMC_{AUPDS} was used. If the surfmer concentration was increased above the CMC_{AUPDS} particle agglomeration in the first stage was observed.

The concentration dependent particle nucleation also fulfills the SMITH-EWART predictions when the AUPDS concentration is below the CMC_{AUPDS}. In this concentration range a dependence in form of $N \propto C_{AUPDS}^{0.63}$ characterizes the increase of the particle number with the C_{AUPDS} . Above the CMC_{AUPDS} the relation changes to $N \propto C_{AUPDS}^{0.38}$ maybe due to the rising micellar nucleation.

36 mol-% to 62 mol-% of the AUPDS employed in the emulsion polymerization with MMA was copolymerized with the comonomer, and about 2.1 mol-% to 13.3 mol-% of these surfmer molecules reacted with fluoresceineamine as a nucleophile. This corresponded to a concentration of reactive sites of up to 9.6 µmol fluorescent dye per 1 g particles.

Further on the p(MMA-co-AUPDS) particles were reacted with ethanolamine and n-butylhydrazide. The conversion of the surface bound activated esters was analyzed by microelectrophoresis, and the observed ζ-potential shifts indicated the modification of the particle surface.

Up to 28 mg streptavidin was immobilized per 1 g p(St-co-AUPDS) particles as determined by fluorescence titration with a fluorescent biotin derivate. The reaction was carried out in a phosphate buffer with a pH of 7.5 and by shaking the reaction sample at room temperature over night.

The prepared nanoparticles may be an interesting new tool in nanobiotechnology for immobilization of amine-containing peptides or proteins. They exhibit a substantially larger surface than commercial microparticles or microbeads and hence a dramatically in-

creased binding capacity. The surfmer nanoparticles would therefore be of great value for use in bioconjugative chemistry and especially for protein immobilization.

Probably even more important is the easy control of the density of reactive surface functions on the nanoparticles simply by choosing a certain surfmer concentration in the feed. A simple one stage emulsion polymerisation and easy purification routine directly results in bioconjugative nanoparticles with a controlled binding surface.

The further exploitation of the interesting new class of surfmers for the preparation of bioconjugative latexes may require a variation of the molecular constitution of the surfmers. The modular design of the presented surfmers offers an easy route for the optimization of the spacer length or the polymerizable group.

3 Einleitung

Kolloide sind heute in der modernen Biotechnologie wichtige Werkzeuge, mit deren Hilfe Proteine immobilisiert, getrennt oder aktiviert werden^[1-7]. Um für diese Anwendung eine große Oberfläche zur Immobilisierung von Biomolekülen bereitzustellen werden Partikelsysteme mit Durchmessern vom Mikro- bis in den Nanometerbereich benötigt. Solche Partikel werden sowohl aus anorganischen Verbindungen wie Siliziumdioxid oder Titandioxid als auch aus organischen Verbindungen hergestellt. Bei der Synthese der Partikel werden hauptsächlich Fällungstechniken^[25-27], anorganische Polykondensations-Reaktionen^[28-30] oder die radikalische Polymerisation^[31,32] verwendet.

Die Partikelherstellung durch die Emulsionspolymerisation bietet dabei den Vorteil, Nanopartikel aus einer großen Menge an unterschiedlichen Materialien herstellen zu können.

Für die kovalente Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Erstens können Proteine über die Thiol-Funktion der Aminosäure Cystein immobilisiert werden^[13]. Zweitens werden Proteine durch den Einsatz von aktivierten Estern oder von Aldehyden über die nukleophilen Seitenketten des Arginins, oder des Lysins auf Oberflächen gebunden^[33]. Zudem können Proteine auch durch photochemische Reaktionen immobilisiert werden^[34].

Polymerpartikel besitzen jedoch nur in wenigen Fällen eine Oberfläche, an der direkt nach der Synthese eine Immobilisierung von stickstoffnukleophilhaltigen Proteinen stattfinden kann. So können zum Beispiel durch Emulsionspolymerisation von Styren und N-Acryloxysuccinimid Partikel mit aktivierten Esterfunktionen hergestellt werden^[35]. Die derzeit hauptsächlich angewendete Darstellung von Kolloiden für die Biokonjugation erfolgt aber vorrangig nach zwei anderen Strategien: Zum einen werden *core-shell*-Systeme^[14-16,36] aufgebaut und zum anderen wird die nachträgliche Aktivierung der funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche angewendet. So kann beispielsweise eine Carbonsäurefunktion auf der Partikeloberfläche durch 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid hydrochlorid (EDC) unter Verwendung von N-Hydroxysuccinimidderivaten oder anderen Reagentien aktiviert werden^[13,17,37,38]. Der dadurch gebildete Aktivester reagiert unter milden Bedingungen mit Stickstoff-Nukleophilen^[19,39].

Beide Strategien besitzen Nachteile: So kann das zur Herstellung der *core-shell*-Systeme verwendete Tensid die Partikeleigenschaften negativ beeinflussen, wenn eine Desorption dieser Moleküle vom Partikelkern stattfindet^[40,41]. Der Nachteil mehrstufiger Aktivierungs-Strategien liegt in ihrem hohen Herstellungsaufwand und der nur bedingt kontrollierbaren Oberflächendichte der aktivierten Gruppen. Die zunehmende Miniaturisierung, aber auch

Parallelisierung in der molekularen Biotechnologie, erfordert aber anpassungsfähige und optimierte Trägersysteme mit kontrollierbarer Oberflächendichte der funktionellen Gruppen.

Zur Lösung der bei der Emulsionspolymerisation auftretenden Probleme wie etwa der Tensid-Desorption wurden Moleküle synthetisiert, bei denen die Tensid-Eigenschaft mit einer zweiten Funktion kombiniert wurde. Das Ziel war dabei, die Tensid-Gruppen in die Polymerketten einzubauen. Dafür wurden Inisurfs^[42,43] (Wortschöpfung aus Initiator und Surfactant), Transsurfs^[44] (Transfer agents und Surfactant) und Surfmerer^[8-11,44-50] (Surfactant und Monomer) entwickelt. Dabei stellen die Surfmerer die am intensivsten weiter verfolgte Variante dar.

Für den polymerisierbaren Teil der Surfmerer werden hauptsächlich Acryl-^[51], und Acrylamid-^[52], Methacryl-^[10,53], Maleat-^[12] und Styren-^[54] Gruppen eingesetzt.

Bei den Tensid-Funktionen der Surfmerer finden sich analog zu den unpolymerisierbaren Tensiden anionische^[50], kationische^[12,39] und nichtionische^[55,56] Verbindungen. So wurden beispielsweise Maleinsäurederivate, Sulfonate und Acrylate für anionische Surfmerer, Pyridinium-Verbindungen für kationische und monofunktionalisierte Oligoethylenglycol-derivate für die nichtionischen Tenside verwendet.

Die Emulsionspolymerisationen der Surfmerer mit verschiedenen Comonomeren wie z.B. Styren oder verschiedenen Acrylaten liefern Partikel mit Durchmessern von ca. 100 nm bis zu einigen hundert Nanometern. Die Oberfläche dieser Partikel muss aber weiterhin mit Aktivierungsreagentien umgesetzt werden, um darauf Proteine immobilisieren zu können.

NAGAI et al. haben eine Syntheseroute untersucht, um durch Verwendung von Surfmeren mit aktivierter Esterfunktion Partikel herzustellen, die mit Stickstoff-Nukleophilen reagieren können^[39,57-62]. Die copolymerisierten Aktivester-Surfmerer auf der Partikeloberfläche können dann z.B. mit 2-Methoxyethanamin weiter funktionalisiert werden. Bei der Verwendung von p-(11-Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat UPDS zur Partikelherstellung ist man allerdings auf die Durchführung eines mehrstufigen Prozesses und eine sehr eingeschränkte Comonomer-Auswahl angewiesen. Ausserdem sind die hergestellten Polymerpartikel mit 4,2 µm Durchmesser größer als die typischen Produkte der Emulsionspolymerisation.

Ein Surfmerer welches diese Nachteile überwindet, sollte daher eine möglichst modular aufgebaute Struktur besitzen, um durch Variation der polymerisierbaren Gruppe mit verschiedenen Comonomeren verwendbar zu sein. Denn obwohl Surfmerer seit ungefähr 20 Jahren bei der Emulsionspolymerisation eingesetzt werden, gibt es erst seit kurzer Zeit Arbeiten, die sich der Vorhersage des Polymerisationsverhaltens dieser Verbindungen

widmen^[9,63] und so ist immer noch die Untersuchung von verschiedenen Copolymerensystemen notwendig, um dann das beste System auszuwählen.

Ein Teil der oben beschriebenen Emulsionspolymerisationen unter der Verwendung von Surfmern lässt sich beispielsweise qualitativ gut durch das auf HARKINS^[22] zurückgehende Drei-Stufen-Modell beschreiben. Die vorliegenden quantitativen Untersuchungen zum Nukleationsmechanismus der Surfmer-Copolymerisationen zeigen aber, dass eine große Varianz bei der Abhängigkeit der Partikelanzahl (N) von der Surfmerkonzentration (c_s) besteht^[9]. So besteht bei der Emulsionspolymerisation von 2-Sulfo-ethylmethacrylat mit Styren ein Zusammenhang von $N = c_s^2$ ^[64], werden jedoch Vinylacetat und ein anionisches Bernsteinsäure-Surfmer verwendet, wird $N = c_s^{0,4}$ ^[65] beobachtet.

Auch unter diesem Gesichtspunkt der Polymerisationskinetik und des Polymerisationsmechanismus ist die Untersuchung der Emulsionspolymerisation unter Einsatz von Surfmern ein bedeutendes Gebiet.

In dieser Arbeit wird eine neue Strategie zur vereinfachten Herstellung von Polymerkolloiden für die Biokonjugation vorgestellt, bei der Surfmer in der Emulsionspolymerisation verwendet werden, die in ihrer Struktur sowohl eine aktivierte Esterfunktion^[18,20,58,66,67] enthalten als auch durch ihren modularen Aufbau die Anpassung an verschiedene Copolymerensysteme erlauben.

3.1 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit besteht darin, einen flexiblen und einfachen Herstellungsweg von Polymerpartikeln mit Aktivester-Oberfläche zu entwickeln. Mit den hergestellten Partikeln sollen dann Proteine immobilisiert werden können.

Die Herstellung der Partikel soll durch den Einsatz von neuartigen polymerisierbaren Tensiden (Surfmere) erfolgen, die eine Aktivester-Funktion enthalten. Zusätzlich sollen die herzustellenden Surfmer so aufgebaut sein, dass ihre Polymerisations- und Grenzflächeneigenschaften ohne Änderung des gesamten Syntheseweges an unterschiedliche Copolymerensysteme angepasst werden können.

Im Einzelnen umfaßt die Aufgabenstellung folgende Schritte:

1. Entwicklung eines Synthesewegs für modulare Aktivester-Surfmer.
2. Untersuchung der Oberflächenaktivität der Aktivester-Surfmer.
3. Untersuchung der Reaktivität des aktivierten Esters mit kleineren organischen Molekülen und Proteinen.

4. Erforschung des Polymerisationsverhaltens der Surfmere und deren Einsatz bei der Emulsionspolymerisation.
5. Charakterisierung der hergestellten Polymerpartikel. Ermittlung der Copolymerisationsverhältnisse der Aktivester-Surfmere.
6. Versuche zur Immobilisierung von Proteinen auf den hergestellten Partikeln.
7. Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Aktivester-Gruppen auf der Partikeloberfläche.
8. Weiterverarbeitung der Aktivester-Nanopartikel für die Mikrostrukturierung von Oberflächen durch Mikrospotting auf verschiedenen Substraten.

4 Methoden

4.1 Dynamische Lichtstreuung und Mikroelektrophorese

Die dynamische Lichtstreuung ist eine Methode mit der die Durchmesser von Partikeln in Flüssigkeiten bestimmt werden können^[68]. Das Messprinzip beruht darauf, dass das Licht eines gepulsten Lasers an den Partikeln gestreut wird und aus der zeitlichen Veränderung der Streulichtintensität, die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel ermittelt wird. Das Streulicht wird im Winkel von 90° beobachtet (siehe Abbildung 4-1). Dadurch, dass die suspendierten Partikel in der Flüssigkeit der Diffusion unterliegen und in das beobachtete Streuvolumen ein und aus diffundieren, ändert sich die gemessene Streulichtintensität I . Misst man I über einen längeren Zeitraum (einige 100 ms), lässt sich der Mittelwert \bar{I} bestimmen.

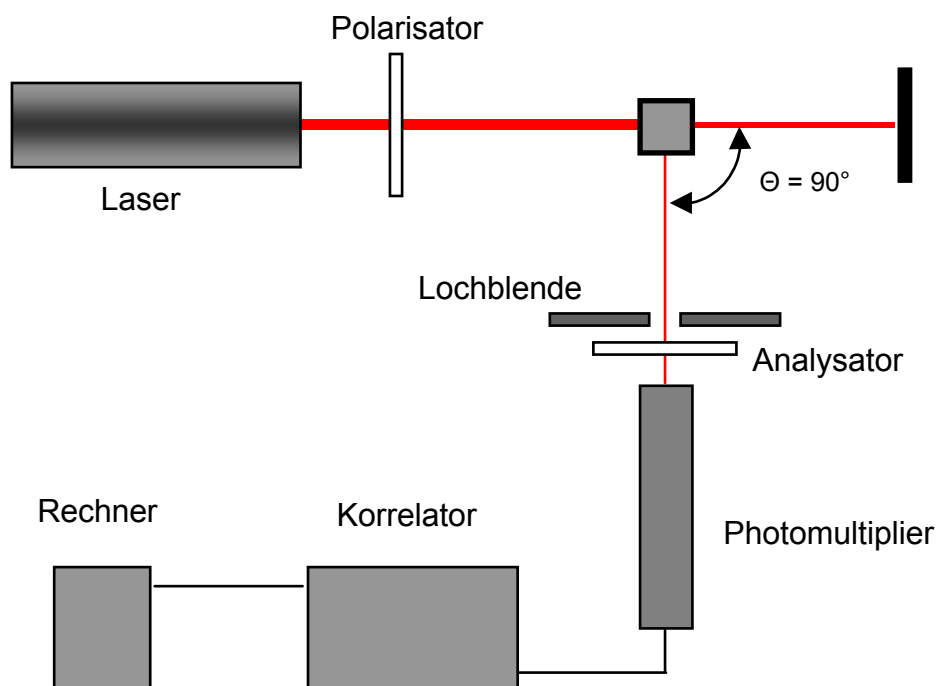


Abbildung 4-1 Messaufbau zur Partikelgrößenbestimmung im Malvern Zetasizer[®] 4000 HSA^[69].

Die Messung von I zu einem beliebigen Zeitpunkt τ_0 liefert eine von \bar{I} abweichende Streulichtintensität. Mit fortschreitender Zeit wird die Differenz zwischen I und \bar{I} immer kleiner – die aktuelle Streulichtintensität nähert sich immer mehr dem statistischen Mittelwert an. Die Zeit, die für diese Annäherung benötigt wird hängt vom Durchmesser der diffundierenden Partikel ab, wobei \bar{I} umso schneller erreicht wird, je kleiner die Partikel sind.

Um die Zeitabhängigkeit der Streulichtintensität mathematisch beschreiben zu können, werden Korrelationsfunktionen verwendet, mit denen die Ähnlichkeit zweier Signale quantifiziert werden können. Aus der berechneten zeitabhängigen Korrelationsfunktion G einer Lichtstreuung lässt sich mit (Gl. 1) der Durchmesser der Partikel ermitteln. Dazu wird

$$(G)(\tau) = \sum_{i=1}^n I_i e^{-Dq^2\tau} \quad (\text{Gl. 1})$$

(G) = Korrelationsfunktion

I_i = Intensitätsanteil der Partikelart i

τ = Zeitintervall des Korrelators

D = translatorischer Diffusionskoeffizient

$$q = \left(\frac{4\pi m}{\lambda_0} \right) \cdot \frac{\sin \Theta}{2}$$

m_i = Brechungsindex der Lösung

λ_0 = Wellenlänge des Lasers

Θ = Streuwinkel

die Exponentialfunktion G halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und linear gefittet.

Aus der Steigung der linearen Funktion lässt sich der translatorische Diffusionskoeffizient D ermitteln. Über die STOKES-EINSTEIN Gleichung (Gl. 2) lässt sich mit diesem Wert der hydrodynamische Partikeldurchmesser d_h berechnen.

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Gl. 2})$$

k = BOLTZMANN - Konstante

T = Temperatur /K

η = Viskosität des Lösemittels

d_h = hydrodynamischer Durchmesser

Der durch diese Methode berechnete mittlere intensitätsgewichtete Durchmesser wird auch als „z-Average“ bezeichnet.

Der Intensitätsanteil der Partikelart i , I_i lässt sich bei diesem Modell durch die MIE-Theorie oder die RAYLEIGH-Approximation beschreiben. Letztere gilt für Partikel mit einem Durchmesser, der kleiner als $\approx \lambda_0 / 10$ ist. In diesem Fall gilt für die Streulichtintensität und den Partikeldurchmesser folgender Zusammenhang:

$$I_i \propto d_h^6 \quad (\text{Gl. 3})$$

Für detaillierte Ausführungen zur Theorie der Lichtstreuung und der Mie-Theorie sei an dieser Stelle auf die Literatur^[70] verwiesen.

Zetapotentialmessungen mit Mikroelektrophorese

Die Oberflächenladung ist neben dem Durchmesser eine weitere charakteristische Größe für Partikel. Die Anwesenheit von Ladungen auf der Partikeloberfläche kann unterschiedliche Ursachen besitzen, beispielsweise das Vorhandensein ionischer Tenside, ionischer Polymer-Endgruppen oder ladungstragender Funktionen in der Polymerkette.

Aufgrund der Elektroneutralitätsbedingung werden positive oder negative Ladungen durch entsprechende Gegenionen kompensiert. Modelle für die Struktur einer solchen elektrischen Doppelschicht an einer fest/flüssig-Grenzfläche stammen von HELMHOLTZ, STERN und GOÜY-CHAPMAN^[71,72]. Im STERN-Modell (s. Abbildung 4-2) wird die Doppelschicht noch weiter in eine innere- und äussere HELMHOLTZ-Schicht unterteilt.

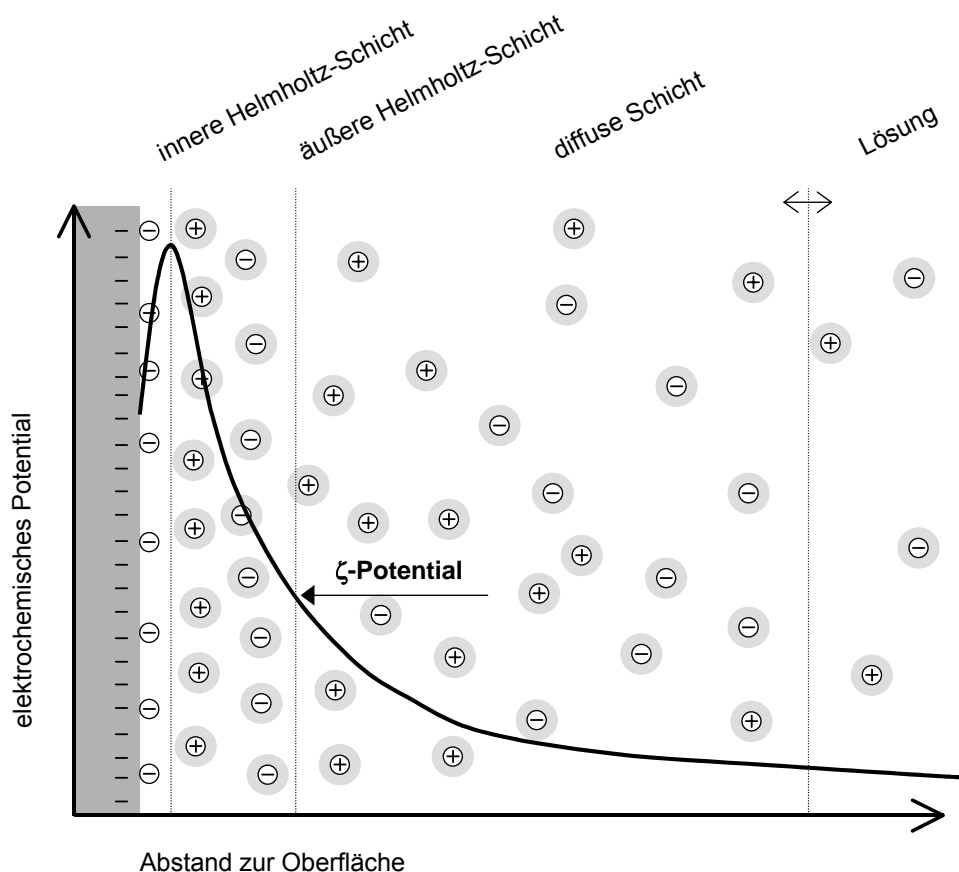


Abbildung 4-2 Aufbau der elektrischen Doppelschicht an einer negativ geladenen Festkörperoberfläche in einem elektrolythaltigen System nach STERN^[72,73]. Bei \oplus und \ominus handelt es sich um hydratisierte Kationen und Anionen. \ominus stellt ein nicht-hydratisiertes Anion dar.

Wobei die innere HELMHOLTZ-Schicht aus dehydratisierten Anionen und die äussere HELMHOLTZ-Schicht aus hydratisierten Gegenionen bestehen. Auf diese beiden Schichten folgt die diffuse Schicht, die bei relativer Bewegung der festen zur flüssigen Phase teilweise abgeschert wird. Zur quantitativen Beschreibung der Ladungsverhältnisse an Grenzflächen wird das ζ -Potential^[74-76] verwendet, welches dem Potential an der Grenzfläche zwischen der diffusen Schicht und der äusseren HELMHOLTZ-Schicht entspricht.

Messung des ζ -Potentials

Meßtechnisch ist das ζ -Potential von Partikeln durch die Mikroelektrophorese zugänglich, bei der die Geschwindigkeit der Partikel während ihrer Bewegung im elektrischen Feld gemessen wird. Der Proportionalitätsfaktor von Geschwindigkeit v und Feldstärke E ist dabei die elektrophoretische Mobilität μ_E (Gl. 4).

$$v = \mu_E \cdot E \quad (\text{Gl. 4})$$

Nach der experimentellen Bestimmung dieses Werts kann mit Hilfe der HENRY Gleichung (Gl. 5) das ζ -Potential berechnet werden, wenn für den Korrekturfaktor $f(\kappa_a)$ ein Wert von $1,5 \text{ m}^{-1}$ angenommen wird. Dieser Korrekturfaktor gilt für große Partikel ($\geq 100 \text{ nm}$) in polaren Medien^[77].

$$\mu_E = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa_a)}{6\pi\eta} \quad (\text{Gl. 5})$$

ε = Dielektrizitätskonstante des Mediums

ζ = ζ - Potential /V

$f(\kappa_a)$ = Korrekturfaktor $/(1/\text{m})$

η = Viskosität des Mediums $/(Pa \cdot s)$

An dieser Stelle muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass der auf diese Weise gewonnene Wert für ζ nur unter der Annahme gilt, dass die Abscherung der Ionenwolke um die Partikel im durchgeführten Experiment an der Grenzfläche zwischen diffuser und äusserer HELMHOLTZ-Schicht stattfindet (s. Abbildung 4-2). Zur experimentellen Bestimmung des ζ -Potentials wird durch zwei gekreuzte Laser die Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit der Partikel in einem elektrischen Feld gemessen (s. Abbildung 4-3).

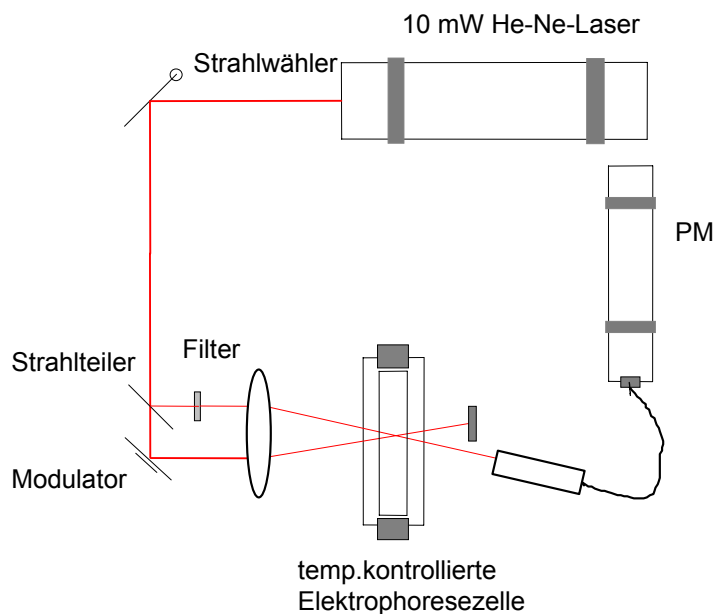


Abbildung 4-3 Aufbau der verwendeten Mikroelektrophorese-Einheit^[69] (Malvern®-Zetasizer 4000HS_A).

4.2 Polyelektrolyttitrationen

Durch die Titration von Partikeln mit Polyelektrolyt-Lösungen lässt sich die Menge der Ladungen auf der Partikeloberfläche bestimmen^[78]. Dabei werden jeweils zu der auf der Oberfläche gebundenen Ladung entgegengesetzt geladene Polyelektrolyte verwendet. Chemische Funktionen mit negativer Ladung, wie beispielsweise Carboxylat-Funktionen, lassen sich mit Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) titrieren. Für positiv geladene Funktionen wird häufig Natriumpolyethensulfonat (PES) verwendet. Der während der Titration ablaufende Austausch von elektrostatisch gebundenen, einzelnen Gegenionen durch die Polyelektrolyte ist entropiegetrieben, da bei der Reaktion mehrere Einzelionen, die in die wässrige Phase übergehen, durch *ein* Polyelektrolyt-Molekül ersetzt werden.

Der Titrationsendpunkt lässt sich durch die Messung des ζ - oder des Strömungspotentials während der Zugabe des Titrants bestimmen. Das Strömungspotential entsteht, wenn durch mechanische Einwirkung das Dispersionsmittel die Hydrathülle um die Partikel abgeschert wird^[79].

4.3 Tensiometrie und Bestimmung der Adsorptionsparameter

Als Oberflächenspannung bezeichnet man die Grenzflächenspannung von Flüssigkeiten und Festkörpern gegenüber einer Gasphase oder der Luft.

Die Messung der Sulfmer-Lösungen erfolgt nach der WILHELMY-Platten-Methode. Bei dieser Messung hängt ein Platinplättchen an einem Wägebalken und wird senkrecht auf die Flüssigkeitsoberfläche gesetzt. Die Benetzung der Platte durch die Flüssigkeit führt zu einer in Abbildung 4-4 sichtbar konisch verlaufenden Flüssigkeits-Lamelle.

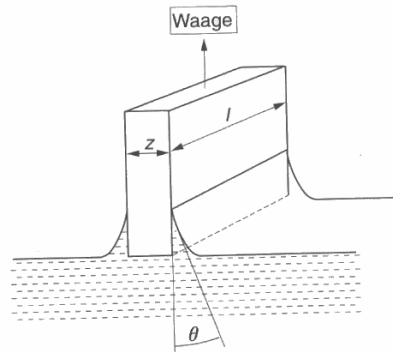


Abbildung 4-4 Wilhelmy-Platten-Methode; hierbei ist z die Dicke, l die Länge der Platte, und θ der Randwinkel. Die Abbildung wurde der Literatur^[80] entnommen.

Das Gewicht der Flüssigkeitslamelle G_L ergibt sich aus der Differenz des Plattengewichtes nach dem Aufsetzen auf die Flüssigkeitsoberfläche und dem an der Luft, durch:

$$G_L = 2(l + z)\sigma \cos \theta . \quad (\text{Gl. 6})$$

Gleichung 6 kann vereinfacht werden, indem für den Randwinkel 0° eingesetzt und durch Auswahl entsprechend dünner Platten ($z \ll l$) der Wert für z vernachlässigt werden kann, so dass

$$G_L \approx 2l\sigma \quad (\text{Gl. 7})$$

gilt. Durch Umformen der Gleichung nach σ kann die Oberflächenspannung bestimmt werden^[80].

Bestimmung der Adsorptionsparameter

Die Messung von σ in Abhängigkeit der Tensidkonzentration erlaubt die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration, wenn die Oberflächenspannung gegen die logarithmierte Konzentration des Tensids aufgetragen wird. Man beobachtet dabei ein Absinken von σ bis zu einem konstanten Wert. Die Berechnung des Schnittpunkts der beiden linearen Ausgleichsgeraden ergibt die Konzentration, bei der eine weitere Zugabe von Tensid zur Lösung nicht zur weiteren Absättigung der Luft/Wasser-Grenzfläche, sondern zur Bildung von Mizellen führt. Diese Konzentration nennt man die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC). Die CMC ist eine temperaturabhängige Kenngröße für Tenside.

Die Anwendung der GIBBS'schen Adsorptionsisotherme für ionische 1:1 - Tenside erlaubt es ausserdem, die Oberflächen-Konzentration, Γ_S der untersuchten Tenside bei Sättigung der Oberfläche zu berechnen^[81,82].

$$\Gamma_S = \frac{1}{2RT} \left(\frac{d\sigma}{d \ln c_S} \right)_T \quad (\text{Gl. 8})$$

Γ_S = Oberflächenkonzentration des Tensids S/(mol/m²)

R = molare Gaskonstante /(JK⁻¹ mol⁻¹)

T = Temperatur /K

σ = Oberflächenspannung /(N/m)

c_S = Tensidkonzentration des Tensids S/(mol/L)

Aus den Werten für Γ_S lassen sich ausserdem mit

$$a_S = \frac{10^{16}}{N \Gamma_S} \quad (\text{Gl. 9})$$

a_S = Fläche des Tensids S /nm²

N = Avogadro Konstante /(1/mol)

die Fläche berechnen, die ein Tensid an der Luft/Wasser-Grenzfläche beansprucht^[81].

4.4 Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionizations Flugzeit - Massenspektrometrie

MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) ist eine Analysenmethode mit der die Molekülmassen schwerer und/oder schwerflüchtiger Substanzen bestimmt werden können. Sie ist daher besonders geeignet, um große Biomoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren, aber auch synthetische Polymere zu identifizieren oder deren Struktur zu untersuchen. Vor allem in der Proteinanalytik hat sich die MALDI-TOF-MS als besonders empfindliche und zeitsparende Methode in den letzten Jahren etabliert^[83-88].

Generell erfordern massenspektrometrische Methoden, dass die zu untersuchende Substanz in einer Ionenquelle ionisiert wird und die entstandenen Ionen in das Hochvakuum des Massenanalysators eingebracht werden. Hier kann dann das Masse-zu-Ladungsverhältnis und damit die Molekülmasse der freien Ionen bestimmt werden.

Klassische Ionisierungsmethoden, wie die Elektronenstoßionisierung bewirken, dass die Substanzen einer mehr oder weniger starken Fragmentierung unterworfen werden. Dies

kompliziert die Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Verbindungen. In der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird nun eine sehr schonende Ionisierungsmethode angewendet, bei der im Prinzip nur unfragmentierte Ionen entstehen. Im Massenspektrum treten dadurch lediglich (Quasi)-Molekülpeaks auf, aus denen die gesuchten Moleküle identifiziert werden können.

In der MALDI-Methode wird die zu untersuchende Substanz in eine Matrix eingebettet. Dies geschieht vorzugsweise indem die im Überschuss vorliegenden Matrixmoleküle und der Analyt in gelöster Form miteinander gemischt werden und danach das Lösungsmittel entfernt wird. Matrix und Probe bilden im Idealfall eine kokristallisierte Schicht. Die Matrix besteht meistens aus organischen niedermolekularen Molekülen (z.B. Sinapinsäure oder Dihydroxybenzoesäure), die Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge eines Lasers absorbieren können. Wird nun das Probe/Matrix-Gemisch in der Ionenquelle mit Laser-Pulsen bestrahlt, werden die Matrixmoleküle angeregt und desorbieren explosionsartig. Dabei reißen sie die Moleküle des Analyten mit in die Gasphase. Durch den Laserpuls entsteht direkt über der Bestrahlungsstelle eine Wolke mit hoher Moleküldichte. Hier, so wird vermutet, können die thermisch angeregten Moleküle des Analyten ihre überschüssige Energie über Stoßreaktionen an die in Überzahl vorliegenden Matrixmoleküle abgeben. Auf diese Weise wird die Fragmentierung des Analyten verhindert^[86].

Gleichzeitig besitzt die Matrix noch die Aufgabe die Moleküle des Analyten zu ionisieren. Dies geschieht mittels chemischer Ionisation, indem Protonen oder Alkaliionen von der Matrix auf die Probenmoleküle übertragen werden. Die gebildeten Ionen werden anschließend über ein angelegtes elektrostatisches Feld beschleunigt und besitzen so eine ihrer Masse und Ladung entsprechende kinetische Energie. Direkt im Anschluss an die Ionenquelle schließt sich ein feldfreies Flugrohr an, welches die beschleunigten Ionen mit konstanter Endgeschwindigkeit durchfliegen. Am Ende des Flugrohrs treffen die Ionen auf einen Detektor mit dem die Flugzeit gestoppt wird. Aus der erhaltenen Flugzeit kann schließlich die ursprüngliche kinetische Energie und somit die Molekülmasse der Ionen ermittelt werden (Gl. 10).

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{l^2} t^2 \quad (\text{Gl. 10})$$

m = Molekülmasse / (g/mol)

z = Anzahl der Molekülladungen

U = Spannung /V

l = Flugrohrlänge /m

t = Flugzeit /s

e = Elementarladung /C

Durch den eingesetzten Flugzeitmassenanalysator (TOF) besitzt diese massenspektrometrische Methode eine sehr hohe Empfindlichkeit, weil praktisch alle durch den Laserpuls erzeugten Ionen auf den Detektor treffen und nicht wie bei anderen „scannenden Methoden“ mit Massenanalysatoren, wie z.B. einem Quadrupol- oder Sektorfeld-MS, nur ein Bruchteil dieser Ionen detektiert werden kann. Die Empfindlichkeit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie liegt bei den meisten Proteinen routinemäßig im unteren Pikomolbereich. Ein weiterer Vorteil des Flugzeitmassenanalysators ist, dass er theoretisch einen unbegrenzten Massenbereich besitzt und daher auch Molekülmassen von 1000 Da bis über 100 kDa bestimmt werden können.

Die unfragmentierte Ionisierung der Substanzen in Kombination mit dem Flugzeitmassenanalysator erlaubt häufig, dass Gemische von Substanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen in einer Analyse parallel bestimmt werden können, ohne dass vorher eine Auftrennung der Gemischkomponenten (z.B. durch Chromatographie) erfolgen muss. Dies bedeutet einen geringeren apparativen Aufwand und Zeitersparnis.

4.5 Rasterelektronenmikroskopie

Wie beim Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) wird auch beim Rasterelektronenmikroskop (REM) der Elektronenstrahl von einer beheizten Kathode als Strahlungsquelle erzeugt^[89]. Im REM wird jedoch nicht das ganze Objekt ausgeleuchtet, sondern der Elektronenstrahl wird auf einen kleinen Punkt an der Oberfläche des Objekts fokussiert. Die von diesem Punkt gestreuten Elektronen werden von einem Detektor gesammelt. Das dabei entstehende Signal wird verstärkt und auf einer Bildröhre als Punkt abgebildet. Ein Punkt auf dem Leuchtschirm der Bildröhre entspricht also einem Punkt auf der Oberfläche des Objekts.

Mit Hilfe einer Ablenkeinheit wird ein elektrisches Feld über den Elektronenstrahl im Mikroskop und über den Elektronenstrahl in der Bildröhre angelegt. Dadurch werden beide Strahlen um einen genau definierten Betrag ausgelenkt; ein anderer Punkt auf dem Objekt wird beleuchtet und auf der Bildröhre abgebildet. Ein Rastergenerator führt den

Elektronenstrahl des Mikroskops Punkt für Punkt über die Oberfläche des Objekts (deutsch: "rastern", engl.: "scanning") wobei auf dem Leuchtschirm ein Bild der Oberfläche entsteht. Ein Vergrößerungseffekt entsteht dadurch, dass über dem Elektronenstrahl der Bildröhre ein stärkeres elektrisches Feld angelegt wird als über dem Strahl im Mikroskop.

Um zu verhindern, dass sich das Präparat durch den Elektronenstrahl elektrisch auflädt, wird die gesamte Oberfläche mit einem dünnen Film einer leitenden Substanz (meistens Kohlenstoff oder Gold) bedampft. Im Elektronenstrahl laden sich unbeschichtete Objekte elektrisch auf und erzeugen Artefakte. Rasterelektronenmikroskope können ein Bild der Oberfläche des Objektes erzeugen, weil die Ausbeute an Sekundärelektronen (SE) davon abhängt, wie stark die abgebildete Fläche relativ zum einfallenden Primärelektronenstrahl (PE) geneigt ist. Dadurch entsteht ein Topographiekontrast: Mit zunehmender Flächenneigung nimmt die Ausbeute an Sekundärelektronen und damit die Helligkeit der Abbildung zu. Dieser Effekt beruht vor allem darauf, dass an stark geneigten Flächen mehr Rückstreuielektronen entstehen, die ihrerseits eine verstärkte Abstrahlung von Sekundärelektronen verursachen.

4.6 Mikrokolorimetrie

Der von CALVET^[90] entwickelte Mikrokolorimeter ermöglicht die Messung von Wärmeströmen im Mikrowatt- und im Nanowattbereich bzw. die Bestimmung kleinster Wärmemengen im μJ - und mJ -Bereich.

Die Mikrokolorimetrie erweitert dadurch das Anwendungsspektrum der Kolorimetrie auf Reaktionen bei denen wenig Wärme frei wird, auf Umsetzungen von Reaktionspartnern mit hohen Molekulargewichten und Reaktionen in kleinen Reaktionsvolumina. Beispiele sind Stoffwechseluntersuchungen an biologischen Systemen, Untersuchungen von Polymorphieerscheinungen und Bestimmung von Lösungswärmen und Bindungskonstanten.

Die als ITC bezeichnete isotherme Titrations-Mikrokolorimetrie ermöglicht die Ermittlung der Bindungskonstanten K , der Stöchiometrie n der Bindungspartner und der Enthalpieänderungen ΔH . Der isothermale Aufbau ermöglicht ausserdem die Berechnung der Entropie S und der freien GIBBS'schen Reaktionsenthalpie ΔG .

Für eine detaillierte Beschreibung der Methode sei an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur^[91-94] hingewiesen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Strategien und Ergebnisse der Surfmersynthese, der Surfmerreaktivitäts-Untersuchungen und der Polymerisationsversuche mit den hergestellten Surfmeren geschildert. Anschließend folgen die Versuche zur Immobilisierung von Aminen, Hydraziden und Proteinen.

5.1 Synthesestrategie für potentielle Surfmermoleküle

Die Struktur der Surfmer setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen. Dabei handelt es sich um einen polymerisierbaren Anteil, eine polare Gruppe und einem unpolaren Rest. Um das Surfmer zur Biokonjugation einsetzen zu können, muss eine dieser Untereinheiten eine reaktive Funktion tragen. Im folgenden Abschnitt wird eine Molekülstruktur entwickelt bei der die Untereinheiten so ausgewählt und zusammengestellt werden, dass ein zur Partikelherstellung geeignetes Surfmer entsteht.

Die Synthese eines Surfmers mit einer reaktiven Aktivester-Funktion wurde 1995 von TAKAHASHI beschrieben^[58]. Bei dem beschriebenen Molekül handelt es sich um 10-(Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat (UPDS), welches durch die Reaktion von 10-Undecensäure mit (4-Hydroxyphenyl)-dimethylsulfoniummethylsulfat (PDS) und Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt wurde (s. Abbildung 5-1).

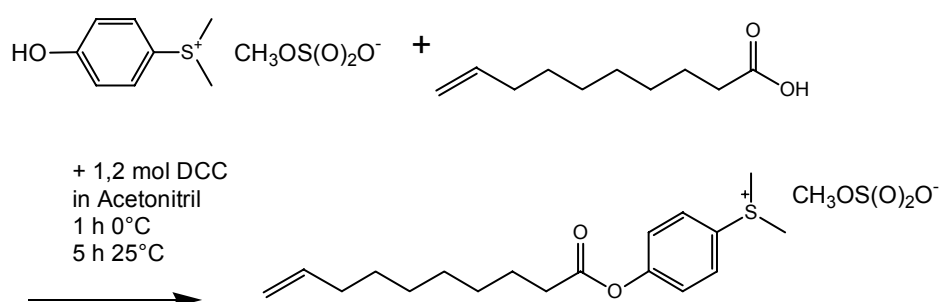


Abbildung 5-1 Synthese von UPDS aus (4-Hydroxyphenyl)-dimethylsulfoniummethylsulfat und Undecensäure unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[58].

UPDS besitzt den Vorteil, dass die im Molekül vorhandene Dimethylsulfonium-Gruppe zum einen zur Aktivierung der Esterfunktion beiträgt und zum anderen durch ihre positive Ladung den ionischen Teil eines Tensids darstellt. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften in einer Struktureinheit ist bis jetzt nur mit PDS als Aktivierungsreagens gelungen. Die Verwendung von Sulfo-N-Hydroxysuccinimid als ebenfalls ionisches

Aktivierungsreagens ist für Surfmere ungeeignet, da die aktivierten Ester während der Emulsionspolymerisation zum Großteil hydrolysieren würden^[13].

Der Nachteil bei der Verwendung von UPDS als Surfmer ist die Schwierigkeit seine Undecenoyl-Gruppe mit anderen Monomeren zu copolymerisieren. Die Ursache dieses Verhaltens ist die geringe elektrostatische und mesomere Stabilisierung von Radikalen, die aus terminalen Alkengruppen entstehen. Eine semiempirische Beschreibung dieses Verhaltens wird durch die Q- und e-Werte^[95] erfasst. Wobei der Q-Wert ein Maß für die Resonanzstabilisierung ist und der e-Wert die elektrostatische Stabilisierung quantifiziert. Als Bezugswert des Systems wird für Styren $e = -0,8$ und $Q = 1$ angenommen^[96,97]. Durch Bestimmung der Copolymerisationsparameter (s. a. S. 34 ff) können die Wertepaare für weitere Substanzen ermittelt werden. Für 1-Buten als Vertreter der terminalen Alkene werden Werte von $Q = 0,007$ und $e = -0,06$ angegeben^[98]. Weitere Wertepaare für synthesesrelevante Monomere dieser Arbeit finden sich in Tabelle 5-1.

Tabelle 5-1 Die Q-e Werte von Monomeren, welche für die Surfmersynthese und die Copolymerisation in Frage kommen.

Monomer	Q	e
N-Octadecyl-Acrylamid	0,66	1,64
Acrylamid	0,23	0,54
Methacrylamid	0,4	-0,05
MMA	0,78	0,4
Acrylsäure	0,83	0,88
Acrylsäuremethylester	0,45	0,64
t-Crotonsäure	0,017	0,89
Methacrylsäure	0,98	0,62
Styren	1	-0,8
UPDS	0,037	-0,45
Diethylfumarat	0,25	2,26
Methacrylsäure	0,88	3,76
n-Butyl-Maleinimid	0,86	3,69

NAGAI und TAKAHASHI lösten dieses Problem der niedrigen Polymerisationsneigung indem sie UPDS mit Dialkylfumaraten (DAF) polymerisieren. UPDS und Dialkylfumarate

reagieren nach Initiierung mit AIBA oder AIBN zu einem alternierenden Copolymer^[39]. Mit $Q = 0,25$ und $e = 2,26$ ^[99] für Diethylfumarat werden für UPDS Werte von $Q = 0,013$ und $e = -0,45$ berechnet.

Bei der Verwendung von UPDS als Surfmer ist man bisher auf das Comonomersystem UPDS/DAF angewiesen, wobei die Copolymerisation von UPDS und DAF zur Partikelbeschichtung auf der Oberfläche von Polystyrolpartikeln ($\varnothing = 4,2 \mu\text{m}$) durchgeführt wurde^[59]. Um die Beschränkung auf das Comonomer-Paar UPDS/DAF aufzuheben, sollte mit einer neuen Synthesestrategie der polymerisierbare Teil des UPDS verändert werden. Das geplante Surfmer soll außerdem modular aufgebaut sein (Abbildung 5-2). Diese Anforderungen werden erfüllt, wenn in der Surfmerstruktur ein Stickstoffatom am Ende der Alkylkette substituiert wird. Dieses Atom kann Teil von polymerisierbaren Amid- oder Imidfunktionen sein. Retrosynthetisch lässt sich diese Strukturveränderung durch den Einsatz von ω -Amino- anstelle von ω -Alkensäuren umsetzen. Die Aminofunktion lässt sich dann beispielsweise mit Säurechloriden oder anderen Acylierungsreagentien umsetzen.

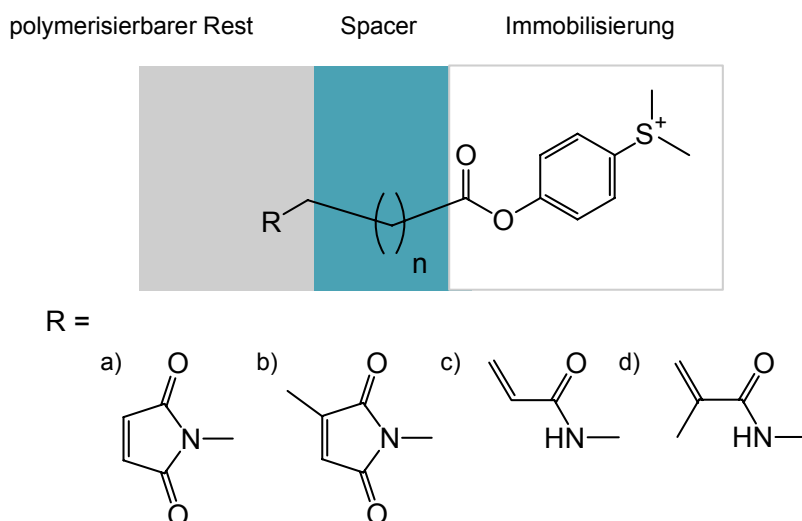


Abbildung 5-2 Zielstrukturen der Aktivester-Surfmer bestehend aus polymerisierbarem Rest, Spacer und Dimethylsulfoniumphenylester zur Immobilisierung von Biomolekülen. Varianten der polymerisierbaren Gruppen: a) Maleinsäureimid, b) Citraconsäureimid, c) Acrylamid, d) Methacrylamid.

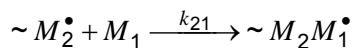
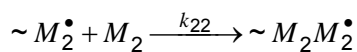
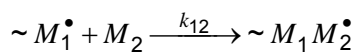
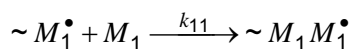
Synthetisch durchführbar ist auch der Einsatz von ω -Hydroxysäuren bei der Herstellung eines modularen Surfmers, allerdings wurde aus zwei Gründen auf deren Verwendung verzichtet: Amide und Imide besitzen eine bessere Hydrolysestabilität als die Ester der analogen Säuren. Ausserdem ist von den ω -Hydroxysäuren mit $(-\text{CH}_2-)_n$ $n > 4$ lediglich die 11-Hydroxysäure bei Fluorochem[®] (Derbyshire, UK) erhältlich.

Auf den Einsatz der homologen ω -Mercaptosäuren als Ausgangssubstanz für die Surfmere wurde auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit der zu synthetisierenden S-Thioester^[100,101] verzichtet.

Die Auswahl der ω -Aminosäuren hinsichtlich ihrer Alkylkettenlänge wurde durch den angestrebten Einsatz der daraus synthetisierten Moleküle als Tenside bestimmt. Für die Herstellung einer O/W-Emulsion sind Tenside mit einem HLB-Wert („*hydrophilic/lipophilic balance*“) von 8 bis 18 nötig^[102]. Zur Berechnung der HLB werden Systeme benutzt bei denen die Inkremente für den hydrophilen und die Werte für den hydrophoben Teil des Tensids addiert werden. Zur Abschätzung der HLB für die neuen Aktivester-Surfmere (Abbildung 5-2) wurde in Ermangelung eines Inkrements für die Dimethylsulfonium-Funktion der Wert für eine Dialkylammonium-Funktion verwendet.

Für kationische Tenside liegen die dazu benötigten Kettenlängen des Alkylteils im Bereich von 10 bis 12 CH₂-Gruppen. 11-Aminoundecansäure wurde daher für die Synthese der Surfmere ausgewählt. Um die Auswirkungen einer kürzeren Alkylkette auf die Oberflächenaktivität von Sulfoniumsurfmern zu untersuchen, wurde auch die Synthese des 6-(Acrylamidohexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfats (AHPDS) aus 6-Aminohexansäure und Acrylsäurechlorid durchgeführt.

Da es noch keine vollständige Theorie zur Kinetik der Emulsionspolymerisation mit polymerisierbaren Tensiden gibt^[63,103], erfolgte die Wahl der polymerisierbaren Gruppe des Surfmers nach Vergleich der Copolymerisationsparameter verschiedener synthesesrelevanter funktioneller Gruppen. Diese Parameter sind ein Maß für das Verhalten eines Monomerpaars M_1 und M_2 bei der radikalischen Polymerisation. Werden die Geschwindigkeitskonstanten k_{11} , k_{12} , k_{22} und k_{21} wie folgt zugeordnet,



$\sim M_i^\bullet$ = aktives Kettenende mit Monomer i

M_i = freies Monomer i

so erhält man für die Quotienten r_1 und r_2 die Gleichungen 11 und 12:

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}} \quad (\text{Gl. 11})$$

$$r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}} \quad (\text{Gl. 12})$$

Für den Fall $M_1 = \text{Comonomer}$ und $M_2 = \text{Surfmer}$, befindet sich der optimale Bereich für r_1 und r_2 nach SCHOONBROOD und ASUA^[9] bei $0,5 < r_1 < 10$ bzw. $r_2 \approx 0 (< 0,3)$. Dies bedeutet, zum einen, dass das Surfmer eine geringe Neigung zur Homopolymerisation aufweisen sollte. Zum andern muss das Comonomer ausreichend schnell polymerisieren, damit nicht bereits zu Anfang der Emulsionspolymerisation ein Großteil des Surfmers polymerisiert und im Kern der Partikel eingebettet wird.

Ein Vergleich der verfügbaren Copolymerisationsparameter von MMA und einiger surfmerrelevanter Verbindungen in Tabelle 5-2 zeigt, dass sich r_1 sowohl für Acryl- und Methacrylamid als auch für N-Alkyl-Acrylamide und N-Alkyl-Maleinimide im Bereich von 1,1 bis 4,1 befindet. Der Copolymerisationsparameter r_2 liegt für die betrachteten polymerisierbaren Amide zwischen 0,05 und 0,9. Der Wert von r_1 liegt damit für alle betrachteten Systeme im von ASUA und SCHOONBROOD geforderten Bereich^[9]. Die Werte für r_2 liegen teils über, teils unter dem geforderten Wert von 0,3. Hier muss das Experiment zeigen, ob gut stabilisierte Nanopartikel hergestellt werden können.

Die Verhältnisse der Copolymerisationsparameter für Acrylamid, Methacrylamid, einiger N-Alkyl-Acrylamide, und Styren sind den Copolymerisationsparametern mit MMA ähnlich (s. Tabelle 5-2). Allerdings sind die Werte für r_1 niedriger und für r_2 größer als bei der Verwendung von MMA. Die Verwendung von Styren als Copolymer der Acrylamid- und Methacrylamid-Surfmer sollte nach dieser Betrachtung von r_1 und r_2 etwas ungünstiger als die Verwendung von MMA sein. Die Maleinimide sind, nach den Werten des als Beispiel herangezogenen N-Hexyl-Maleinimid, ungeeignet für die Copolymerisation mit Styren, da r_2 mit -0,041 keiner als 0,5 ist.

Tabelle 5-2 Monomere aus deren Copolymerisationsparametern (r_1 und r_2) die Eignung von Acrylamid, Methacrylamid und N-Alkylamid-Derivaten bei der Surfmercopolymerisation abgeschätzt wurde.

Monomer 1	Monomer 2	r_1	r_2	[Lit.]
MMA	Acrylamid	2,5-3	0,53-0,9	[104,105]
MMA	N-Methyl-Acrylamid	1,14	0,05	[104]
MMA	N-Octadecyl-Acrylamid	4,1	0,42	[106]
MMA	Methacrylamid	1,39-1,65	0,4-0,49	[107-109]

Monomer 1	Monomer 2	r_1	r_2	[Lit.]
MMA	N-Hexyl- Maleinimid	1,9	0,1	[110]
Styren	Acrylamid	1,05-1,49	0,2-1,3	[98]
Styren	N-Octadecyl- Acrylamid	2,08	0,54	[98]
Styren	N-Octyl- Acrylamid	2,71	0,26	[98]
Styren	Methacrylamid	1,4	0,48 / 1,42	[98]
Styren	N-Hexyl- Maleinimid	-0,041	0,09	[111]

Im folgenden Teil der Arbeit wird sowohl die Synthese des nichtmodular aufgebauten UPDS als auch die Herstellung der vier neuen modularen Surfmere AHPDS, AUPDS, MUPDS und MIHPDS (s. Abbildung 5-3) beschrieben. Auf die Herstellung des Citraconsäureimid-Surfmers (s. Abbildung 5-2b) wurde in dieser Arbeit zunächst verzichtet, um zunächst synthetisch einfacher herstellbare Surfmere zu untersuchen.

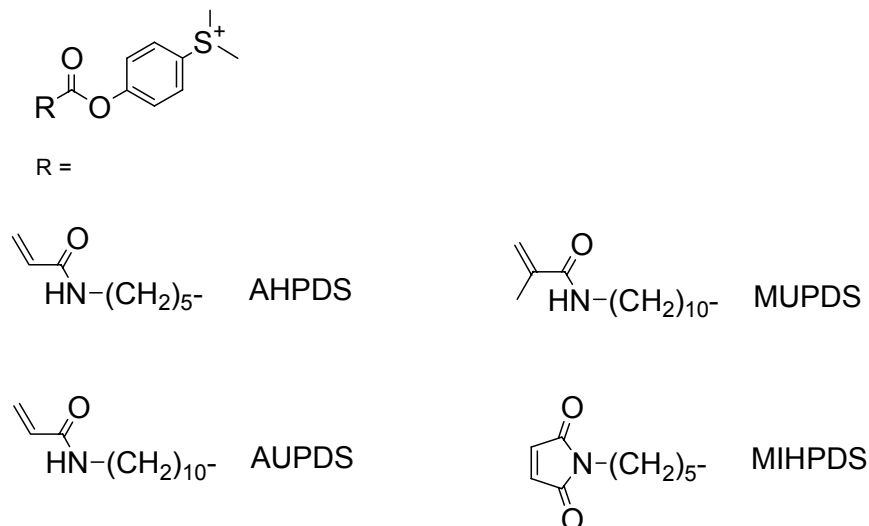


Abbildung 5-3 Die vier neuen Surfmere, deren Synthese in dieser Arbeit beschrieben wird: 6-(Acrylamidohexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AHPDS), p-(11-(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AUPDS), p-(11-(Methacrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MUPDS), und p-(6-(Maleinimidio)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MIHPDS).

5.1.1 Synthese von 11-(Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat

Durchführung

2,7 g 11-Undecensäure (15,7 mmol) wurden in 200 mL Acetonitril gelöst und zu einer Lösung aus 4 g (15 mmol) (4-Hydroxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat in 350 mL Acetonitril gegeben. Nachdem die Mischung auf 0 °C abgekühlt und gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von 3,5 g (17 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 100 mL Acetonitril. Nach 15 Minuten wurde das Kühlbad entfernt und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der weiße ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und zweimal mit Acetonitril gewaschen. Die Lösemittel der gesammelten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer entfernt und das verbliebene gelbe Öl wurde mit Petrolether gewaschen, um verbliebenes DCC zu entfernen. Der verbliebene zähe Feststoff wurde mit 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die entstandene Lösung wurde durch Zentrifugation vom ungelösten (4-Hydroxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat getrennt. Nachdem das Lösemittel des Extrakts am Rotationsverdampfer entfernt worden war, erfolgte die Trocknung des Rohprodukts am Ölpumpenvakuum. Nach Umkristallisieren in Essigsäureethylester verblieben 5,1 g (0,012 mol, 80 % Ausbeute) des weißen Produkts.

Die IR- und ¹H-NMR- Analysendaten stimmen mit den Literaturdaten^[58] von NAGAI et al. überein.

5.1.2 Synthese von 11-Acryloylaminoundecansäure und 11-Methacryloylaminoundecansäure

11-Acryloylaminoundecansäure und 11-Methacryloylaminoundecansäure wurden durch Reaktion von 11-Aminoundecansäure mit Acryloylchlorid und Methacryloylchlorid hergestellt. Diese Synthesen wurden in Anlehnung an eine Vorschrift von MASHELKAR^[112] durchgeführt. Wobei analog zu einer Anleitung von GALLOT^[113] wässrige Kaliumhydroxid-Lösung anstelle von Natriumhydroxid-Lösung verwendet wurde, um die Löslichkeit des ω-Aminocarboxylats in der wässrigen Phase zu erhöhen.

Durchführung

In einem 500 mL – Planflanschreaktor mit KPG-Rührer, Kühler und zwei Tropftrichtern wurden in 100 mL Kaliumhydroxid-Lösung ($c = 1,3 \text{ mol L}^{-1}$) 15 g (0,075 mol) ω-Aminoundecansäure gelöst. Nachdem die Temperatur der Lösung auf 0 °C eingestellt war,

wurden unter Rühren 6,8 g (0,075 mol) in 10 mL Dichlormethan gelöstes Acrylsäurechlorid, innerhalb einer Stunde zugetropft. Bei der Zugabe des letzten Drittels der Acrylsäurechlorid-Lösung wurde der pH-Wert gemessen. Durch Zugabe von Kaliumhydroxid-Lösung wurde der pH-Wert der Lösung bei einem Wert > 9 gehalten. Die Reaktionslösung wurde noch 1 h gerührt und dann mit Salzsäure (1 mol L⁻¹) auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Die entstandene weiße Suspension wurde dreimal mit 50 mL Essigsäureethylester extrahiert, um die Acrylsäure und das Dichlormethan zu entfernen.

Danach wurde die Lösung mit Salzsäure versetzt bis ein pH-Wert von 5,0 erreicht war. Dann wurde die Suspension erneut mit reichlich Essigsäureethylester (ca. je 150 mL) extrahiert. Diese gesammelten Extrakte wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer verblieben 14,5 g (0,057 mol, 76 % Ausbeute) weißes, feinkristallines Produkt.

Die Herstellung von 11-Methacryloylaminoundecansäure erfolgte analog und lieferte eine Ausbeute von 16,3 g (81 % Ausbeute) eines ebenfalls weißen Feststoffs.

Analytik

11-Acryloylaminoundecansäure

IR (KBr, Angaben in cm⁻¹): 3305 (s NH), 2922, 2852 (s CH), 1696 (s C=O), 1654 (s C=O Amid 1), 1625 (m C=C) 1542 (m NH Amid 2).

¹H-NMR (d₆-DMSO, Angaben in ppm): δ = 1,2-1,3 (m H³⁻⁸), 1,38-1,50 (m H²⁺⁹), 2,16 (t H¹ J_{1,2} = 7,25 Hz), 3,10 (m H¹⁰), 5,56 (dd H¹² J_{12,13} = 2,5 Hz, J_{11,12} = 11,5), 6,06 (dd H¹³ J_{11,13} = 17 Hz), 6,21 (dd H¹¹).

11-Methacryloylaminoundecansäure

IR (KBr): 3320 (s NH), 2921, 2854 (s CH), 1701 (s C=O), 1649 (m C=O Amid 1), 1613 (m C=C) 1531 (s NH Amid 2) 1477 cm⁻¹ (CH₂-Deformation).

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ = 1,2-1,3 (m H³⁻⁸), 1,39-1,45 (m H²⁺⁹), 1,97 (s H¹³ J_{11,13} = 1,5 Hz) 2,16 (t H¹ J_{1,2} = 7,25 Hz), 3,05 (m H¹⁰), 5,26 (d H¹¹), 5,59 (s H¹²).

5.1.3 Synthese von p-(11(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AUPDS) und p-(11(Methacrylamido)undecanoyloxy)phenylmethylsulfat (MUPDS).

4,2 g (15,7 mmol) 11-Acryloylaminoundecansäure wurden in 150 mL Dichlormethan gelöst und zu einer Lösung aus 4 g (15 mmol) (4-Hydroxyphenyl)dimethylsulfonium-

methylsulfat in 350 mL Acetonitril gegeben. Nachdem die Mischung auf 0 °C abgekühlt und gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von 3,5 g (17 mmol) DCC in 100 mL Acetonitril. Nach 15 Minuten wurde das Kühlbad entfernt und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der weiße ausgefallene N, N'-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und zweimal mit Acetonitril gewaschen. Die Lösemittel der gesammelten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer entfernt und das verbliebene zähflüssige gelbe Öl wurde mit Petrolether gewaschen, um verbliebenes DCC zu entfernen. Nach Umkristallisieren des Rohprodukts in Essigsäureethylester verblieben 6,0 g (12 mmol, 80 % Ausbeute) des weißen Feststoffs AUPDS. MUPDS wurde in derselben Weise unter Verwendung von 11-Methacryloylaminoundecansäure (anstelle von 11-Acryloylaminoundecansäure) hergestellt (5,45 g, 0,011 mol, 71 % Ausbeute)

Analytik

AUPDS

$C_{23}H_{37}NO_7S_2$ (503,67 Da) Angaben in % (m/m)

Berechnet, C 54,85 H 7,40 N 2,78 S 12,73;

Gefunden C 54,05 H 6,90 N 2,71 S 12,93

1H -NMR (d_6 -DMSO, Angaben in ppm): δ = 1,20-1,42 (m H^{5-11}), 1,63 (m H^{12}), 2,63 (t H^4 $J_{4,5}$ = 7,5 Hz), 3,10 (m H^{13}), 3,27 (s H^1), 3,38 (s H^{17}), 5,56 (dd H^{15} $J_{15,16}$ = 2,5 Hz, $J_{14,15}$ = 14,5), 6,06 (dd H^{16} $J_{14,16}$ = 17 Hz), 6,21 (dd H^{14}), 7,51 (d H^3 $J_{2,3}$ = 8,5 Hz), 8,14 (d H^2)

IR (KBr, Angaben in cm^{-1}): 3310 (s NH), 3027 (m PhH), 2920, 2852 (s CH), 1756 (s C=O), 1654 (s C=O Amid 1), 1628 (s C=C) 1588, 1479 (m Ph), 1537 cm^{-1} (s NH Amid 2); 1589, 1498 (m Ph), 1525 cm^{-1} (s NH Amid 2) (s. Abbildung 5-4)

MALDI-TOF-MS:

Matrix Sinapinsäure

$[M]^+$ = 392,5 Da

Exakte Masse AUPDS⁺ = 392,2 Da

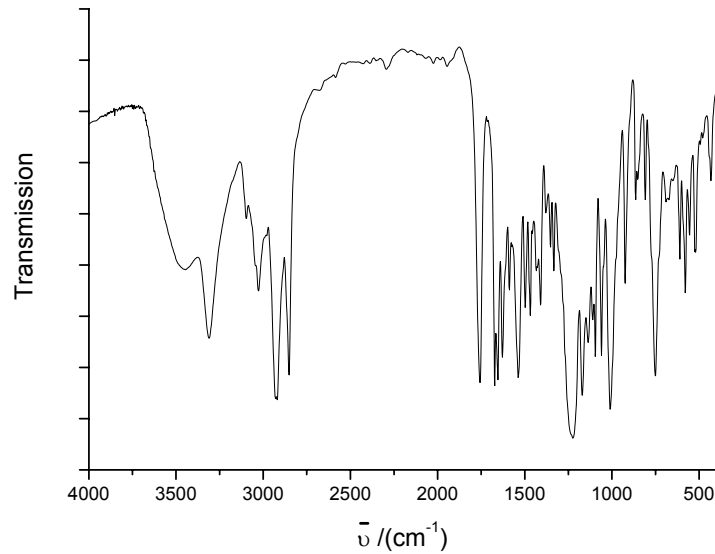


Abbildung 5-4 IR-Spektrum von p-(11-Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AUPDS) im KBr Pressling.

MUPDS

Elementaranalyse

$C_{24}H_{39}NO_7S_2$ (517,7 Da) Angaben in % (m/m)

Berechnet C 55,68 H 7,59 N 2,71 S 12,39;

Gefunden C 55,60 H 7,63 N 2,98 S 12,1

1H -NMR (d_6 -DMSO, Angaben in ppm): δ = 1,20-1,45 (m H^{5-11}), 1,64 (m H^{12}), 1,83 (s H^{16}), 2,63 (t H^4 $J_{4,5}$ = 7,3 Hz), 3,08 (m H^{13}), 3,27 (s H^1), 3,38 (s H^{17}), 5,30 (s H^{15}), 5,62 (s H^{14}), 7,51 (d H^3 $J_{2,3}$ = 8,5 Hz), 8,14 (d H^2).

IR (KBr, Angaben in cm^{-1}): 3326 (s NH), 3025 (m PhH), 2918, 2852 (s CH), 1762 (s C=O), 1653 (s C=O Amid), 1609 (s C=C) (s. Abbildung 5-5).

MALDI-TOF-MS:

Matrix Sinapinsäure

$[M]^+$ = 406,3 Da

Exakte Masse MUPDS = 406,2 Da

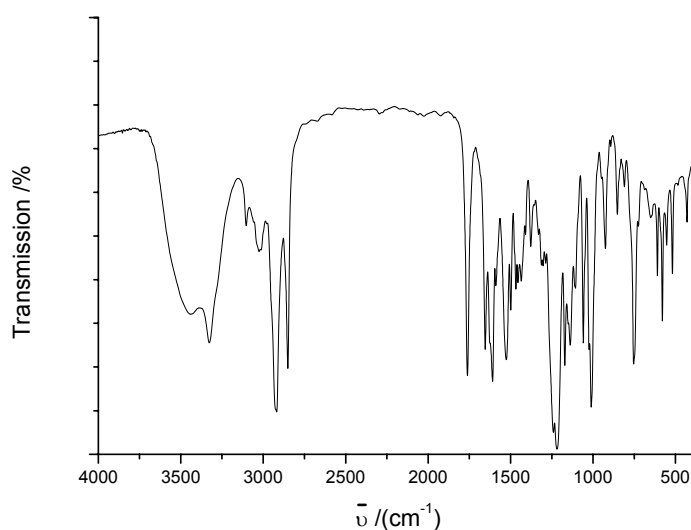


Abbildung 5-5 IR-Spektrum von p-(11-(Methacrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MUPDS) im KBr Pressling.

5.1.4 Synthese von 6-Acryloylaminohexansäure

6-Acryloylaminohexansäure wurde durch Reaktion von 11 g (0,075 mol) 6-Amino-hexansäure mit 6,65 g (0,075 mol) Acryloylchlorid hergestellt. Die Herstellung erfolgte nach der Vorschrift für 11-Acryloylaminoundecansäure (S. 37) mit einer Ausbeute von 10,8 g (0,058 mol, 78 %).

Analytik

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, Angaben in ppm): $\delta = 1,22$ - $1,32$ (m H^3), $1,39$ - $1,52$ (m $\text{H}^{2,4}$), $2,19$ (t H^1 $J_{1,2} = 7,3$ Hz), $3,10$ (m H^5), $5,56$ (dd H^7 $J_{7,8} = 2,8$ Hz, $J_{6,7} = 9,8$), $6,08$ (dd H^8 $J_{6,8} = 17$ Hz), $6,21$ (dd H^6).

IR (KBr, Angaben in cm^{-1}): 3287 (s NH), 3061 (m NH), 2947, 2862 (s CH), 1703 (s C=O), 1654 (s C=O Amid 1), 1623 (m C=C) 1547 (m NH Amid 2) 1239 cm^{-1} (m C-O).

5.1.5 Synthese von p-(6(Acrylamido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AHPDS)

2,9 g 6-Acryloylaminohexansäure (15,7 mmol) wurden in 130 mL Acetonitril gelöst und zu einer Lösung aus 4,0 g (4-Hydroxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat (15 mmol) in

300 mL Acetonitril gegeben. Nachdem die Mischung auf 0 °C abgekühlt und gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von 3,5 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (17 mmol) in 100 mL Acetonitril. Nach 15 Minuten wurde das Kühlbad entfernt und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der weiße, ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und zweimal mit Acetonitril gewaschen. Die Lösemittel der gesammelten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer entfernt und das verbliebene zähe gelbe Öl wurde mit Petrolether gewaschen, um verbliebenes DCC zu entfernen. Nach Umkristallisieren des Rohprodukts in Essigsäureethylester verblieben 5,1 g (75 % Ausbeute) des weißen Feststoffs p-(6(Acrylamido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AHPDS).

Analytik

¹H-NMR (d₆-DMSO, Angaben in ppm): δ = ca 1,36 (m H⁶), 1,64 (m H⁷), 2,64 (t H⁴ J_{4,5} = 7 Hz), 3,16 (m H⁸), 3,28 (s H¹), 3,38 (s H¹²), 5,56 (dd H¹⁰ J_{10,11} = 2,5 Hz, J_{9,10} = 9,5), 6,06 (dd H¹¹ J_{9,11} = 17 Hz), 6,21 (dd H⁹), 7,51 (d H³ J_{2,3} = 8,8 Hz), 8,14 (d H²)

5.1.6 Synthese von p-(6-(Maleinimido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MIHPDS)

1,5 g 6-Maleinimidohexansäure (7,1 mmol) wurden in 30 mL Acetonitril gelöst und zu einer Lösung aus 1,9 g (4-Hydroxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfat (7 mmol) in 50 mL Acetonitril gegeben. Nachdem die Mischung auf 0 °C abgekühlt und gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von 2 g DCC (9,5 mmol) in 100 mL Acetonitril. Nach 15 Minuten wurde das Kühlbad entfernt und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der weiße ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und zweimal mit Acetonitril gewaschen. Die Lösemittel der gesammelten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer entfernt und der verbliebene Feststoff wurde mit Petrolether gewaschen um verbliebenes DCC zu entfernen. Nach zweimaligem Umkristallisieren des Rohprodukts in Essigsäureethylester/Diisopropylether (5:1, v/v) verblieben 2,3 g (72 % Ausbeute) des weißen Feststoffs p-(6(Maleinimido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MIHPDS).

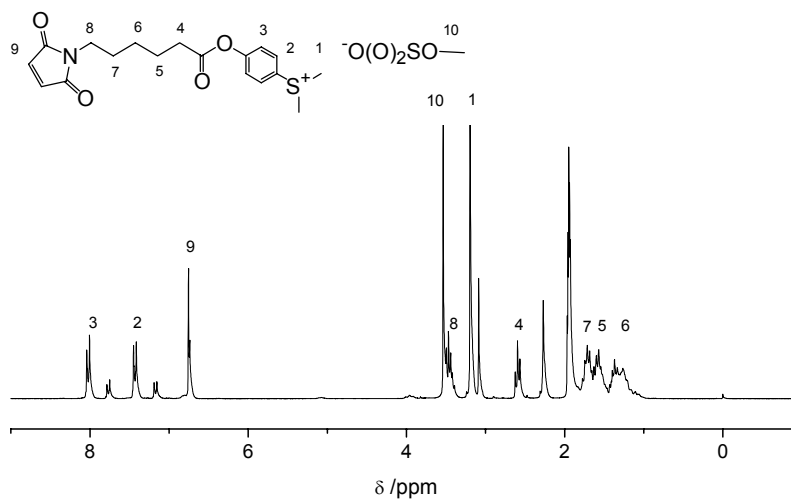


Abbildung 5-6 ^1H -NMR-Spektrum und Signalzuordnung von p-(6(Maleinimido)hexanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MIHPDS) in d_3 -Acetonitril.

Analytik

MALDI-TOF-MS

Matrix: Dihydroxy-Benzoessäure (DHB)

$[\text{M}]^+ = 348,3 \text{ Da}$

Exakte Masse MIHPDS = 348,4 Da

^1H -NMR (d_3 -Acetonitril, Angaben in ppm): $\delta = 1,36$ (m H^6), 1,58 (m H^5), 1,70 (m H^7), 2,59 (t H^4 $J_{4,5} = 7,5 \text{ Hz}$), 3,19 (s H^1), 3,47 (t H^8 $J_{7,8} = 7,0 \text{ Hz}$), 3,53 (s H^{10}), 6,76 (s H^9), 7,42 (d H^3 $J_{2,3} = 9,1 \text{ Hz}$), 8,02 (d H^2) s. Abbildung 5-6

IR (KBr, Angaben in cm^{-1}): 2933, 2857 (m CH_2), 1755 (m $\text{C}=\text{O}$), 1703 (s $\text{N}(\text{C}=\text{O})_2$), 1495 (w $\text{C}=\text{C}$, Ph) 696 (w. C-H Maleinimid), s. Abbildung 5-7

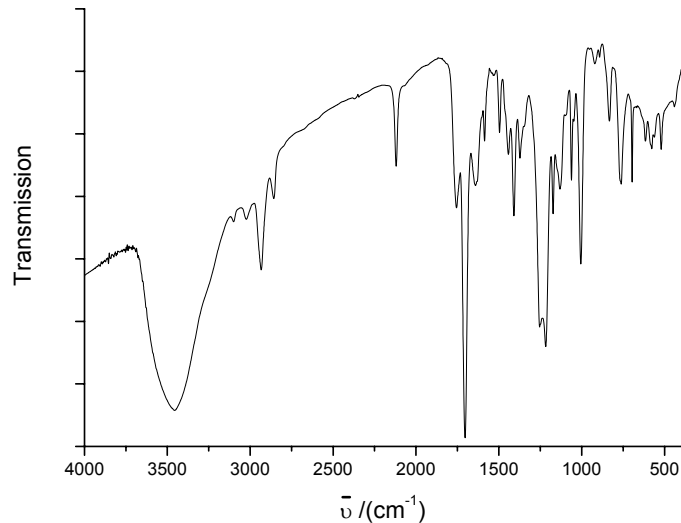


Abbildung 5-7 IR-Spektrum eines KBr-Presslings von p-(6(Maleinimido)hexanoyloxy)-phenyldimethylsulfoniummethylsulfat (MIHPDS).

5.1.7 Diskussion der Synthesen

Die Herstellung der Surfmervorstufen 11-Acryloylaminoundecansäure, 11-Methacryloylaminoundecansäure und 6-Acryloylaminohexansäure war nach der modifizierten Methode von MASHELKAR^[112] möglich. Die Ausbeuten der eigenen Synthesen waren mit 71 mol-% bis 80 mol-% höher als in der Literatur angegeben.

Auch die Veresterung der ω -Acryloylaminocarbonsäuren konnte mit dem DCC Verfahren^[114] in guten Ausbeuten durchgeführt werden. Verbesserungspotential besteht u.a. bei der Entfernung des nicht reagierten (4-Hydroxyphenyl)dimethylsulfoniummethylsulfats aus dem Rohprodukt der Synthesen. Das Umkristallisieren der beiden Surfmere MUPDS und AUPDS mit Essigsäureethylester könnte z.B. durch das Verwenden geeigneter Lösemittelmischungen noch verbessert werden, da je nach Synthese bis zu drei Umkristallisationen notwendig waren, um die den vorliegenden Analysedaten entsprechende Reinheit zu gewährleisten.

Auch bei der Synthese von MIHPDS stellt die Aufreinigung des Rohprodukts die größte Herausforderung dar. Wie aus dem ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 5-6) des Produkts ersichtlich, lässt sich das MIHPDS lediglich in einer Reinheit von 80 % bis 90 % gewinnen.

Alle synthetisierten Surfmere zeigten bei der Analyse folgende Eigenschaften, die für die Aktivester-Funktion charakteristisch sind:

Die Streckschwingung der Carboxyl-Funktion des Aktivesters liegt zwischen 1755 cm^{-1} und 1761 cm^{-1} . Die Absorption der Verbindungen in diesem Wellenzahlbereich wird durch den induktiven Effekt (– I-Effekt) der Dimethylsulfoniumphenyl-Funktion erreicht^[115].

Die chemischen Verschiebungen der Protonen des aromatischen Systems liegen bei ca. 7,5 und 8,1 ppm was sich durch den induktiven und mesomeren Effekt (– M-Effekt) des Dimethylsulfonium-Substituenten erklären lässt.

Die Dimethylsulfonium-Funktion bewirkt ausserdem durch ihre positive Ladung, dass die Aktivester-Surfmere im MALDI-TOF-Massenspektrum als unprotonierter Molekülionenpeak auftreten. Allerdings wird trotz dieses Verhaltens weiterhin eine Matrix, wie etwa Sinapinsäure oder 2,5-Dihydroxy-Benzoesäure, benötigt, um die Surfmere mit MALDI-TOF-MS untersuchen zu können. Die Funktion der Matrix besteht in diesem Fall nur darin, die Energie des Lasers aufzunehmen und so den Analyt unfragmentiert in die Gasphase zu befördern.

5.2 Grenzflächenaktivität der Surfmere

Ausser für den Fall des UPDS, finden sich in der Literatur keine Angaben zur Oberflächenaktivität von Sulfoniumsalzen. Deswegen wurde zunächst die Tensidwirkung der potentiellen Surfmere AUPDS und MUPDS im Vergleich zu UPDS untersucht.

Um die Luft/Wasser-Grenzflächenspannung einer wässrigen Tensidlösung zu bestimmen, wurde die WILHELMY-Methode (s. Kap. 4.3, S.25) angewandt. Weiterhin soll durch die Messung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit der Surfmerkonzentration die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) und die Adsorptionsparameter Γ_S und a_S bestimmt werden.

5.2.1 Grenzflächenaktivität von (Undecenoyloxyphenyl)dimethylsulfonium-methylsulfat

NAGAI et al. bestimmten mit verschiedenen Methoden Werte für die CMC von UPDS zwischen $3 \cdot 10^{-3}$ und $6,5 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ (Tabelle 5-3). Die Abweichung der einzelnen Meßergebnisse wurde dabei durch die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden verursacht. Zum Vergleich wurde von dieser Arbeitsgruppe die CMC des nichtpolymerisierbaren Undecanoxoxyphenyldimethylsulfoniummethylsulfats (LPDS) bestimmt^[58].

Tabelle 5-3 Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von UPDS, mit unterschiedlichen Methoden bestimmt^[58].

Methode	CMC /(mmol L ⁻¹)
Oberflächenspannung (WILHELMY-Methode)	4,1
Fluoreszenzspektrometrie ^[116]	6,5
Elektrische Leitfähigkeit	3,0

5.2.2 Grenzflächenaktivitätsmessungen der potentiellen Surfmere AUPDS und MUPDS

Die Grenzflächenaktivität von MUPDS und AUPDS wurde mit der Wilhelmy-Plattenmethode bestimmt. Dazu wurden bei Raumtemperatur gesättigte Lösungen der beiden Surfmere hergestellt und mit einem 0,45 µm Membranfilter filtriert. Die Lösungen wurden mit einem Titrator zu Reinstwasser gegeben.

5.2.2.1 Berechnung und Diskussion der Surfmer-Adsorptionsparameter

AUPDS und MUPDS zeigen beide eindeutige Tensid-Eigenschaften, indem beide die Oberflächenspannung an der Luft/Wasser-Grenzfläche deutlich herabsetzen. Die Veränderung der Oberflächenspannung von AUPDS- und MUPDS-Lösungen in Abhängigkeit von der logarithmierten Surfmerkonzentration findet sich in Abbildung 5-8. Für beide Verbindungen zeigt sich zuerst eine lineare Abnahme von σ mit steigender Surfmerkonzentration. Nach dem Erreichen der CMC lässt sich keine weitere Absenkung von σ feststellen. Bei MUPDS und AUPDS liegt dieser untere Grenzwert bei $(58,5 \pm 0,5)$ mN m^{-1} und $(40,5 \pm 0,5)$ mN m^{-1} .

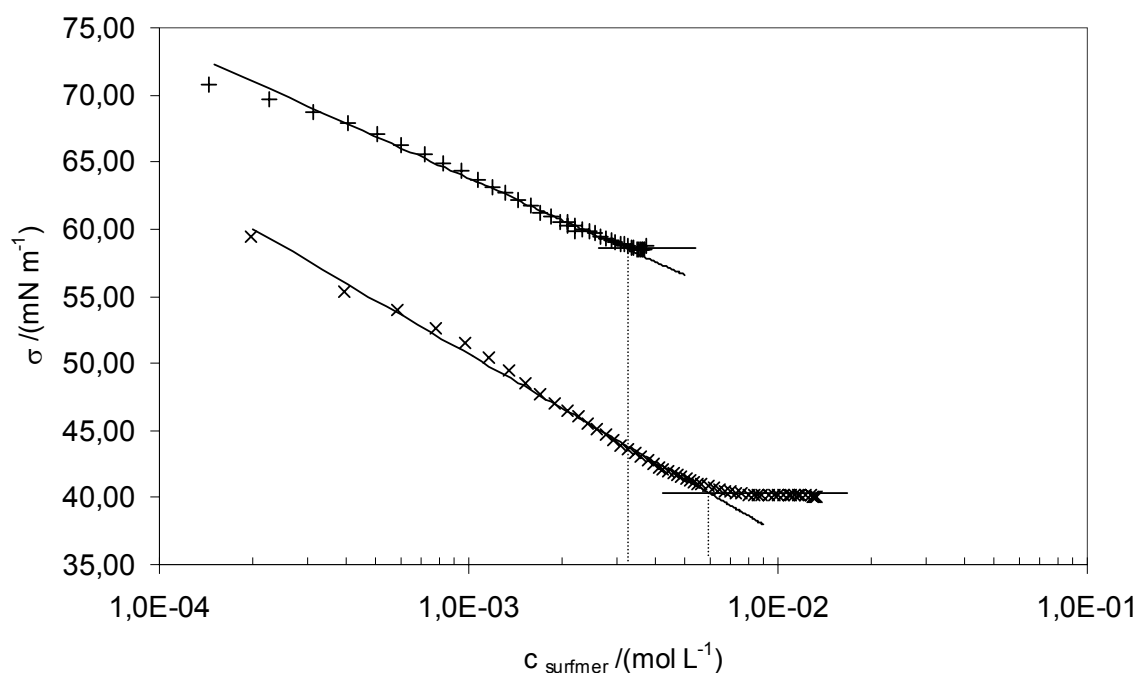


Abbildung 5-8 Abhängigkeit der Luft/Wasser-Grenzflächenspannung σ von der Surfmerkonzentration c_{AUPDS} (\times) und c_{MUPDS} (+). Eingezeichnet sind ausserdem die Ausgleichsgeraden aus deren Schnittpunkten die CMC berechnet wurde ($\text{CMC}_{\text{AUPDS}} = 6,0$ mmol L^{-1} , $R^2_{\text{AUPDS}} = 0,9958$, $\text{CMC}_{\text{MUPDS}} = 3,2$ mmol L^{-1} , $R^2_{\text{MUPDS}} = 0,9909$).

Für die Steigungen der Ausgleichsgeraden, die für den Bereich von $c_{\text{Surfmer}} \sim 0$ bis $\text{CMC}_{\text{Surfmer}}$ berechnet wurde, ergaben sich folgende Werte:

$$\left(\frac{d\sigma}{d \ln c_{\text{AUPDS}}} \right)_T = -(5,78 \pm 0,07) \text{ mN m}^{-1}$$

$$\left(\frac{d\sigma}{d \ln c_{\text{MUPDS}}} \right)_T = -(4,48 \pm 0,11) \text{ mN m}^{-1}$$

Aus diesen Werten lässt sich nach (Gl. 8) (s. S. 27) der Wert für die GIBBS'sche Adsorptionsisotherme Γ_S berechnen. Mit Hilfe von (Gl. 9) (s. S. 27) lassen sich ausserdem die Flächen berechnen, die von den Surfmermolekülen an der Luft-Wasser-Grenzfläche beansprucht werden. Die Ergebnisse für a_S und Γ_S sind in Tabelle 5-4 aufgeführt und zeigen, dass AUPDS und MUPDS ca. 35 % und 60 % mehr Fläche beanspruchen als UPDS.

Tabelle 5-4 Adsorptions-Parameter Γ_S und a_S von UPDS, AUPDS und MUPDS an der Luft/Wasser-Grenzfläche (24 °C).

Surfmer	Γ_S /(mol cm ⁻¹)	a_S /(nm ²)
UPDS	$1,59 \cdot 10^{-10}$	1,05
AUPDS	$1,17 \cdot 10^{-10}$	1,42
MUPDS	$0,98 \cdot 10^{-10}$	1,69

Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise durch die größeren Endgruppen der beiden Surfmer AUPDS und MUPDS im Vergleich zur Allyl-Endgruppe des UPDS erklären. Die Acrylamid- und Methacrylamid-Endgruppen beanspruchen mehr Fläche an der Luft/Wasser-Grenzfläche als die terminale Allyl-Funktion des UPDS. Dieser Ansatz würde auch erklären, warum das, eine Methyl-Gruppe mehr enthaltende, MUPDS wiederum mehr Platz als AUPDS benötigt.

Diskussion der kritischen Mizellbildungskonzentration von p-(11(Acrylamido)-undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat und p-(11(Methacrylamido)-undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat

Durch Berechnung des Schnittpunkts der beiden Ausgleichsgeraden (s. Abbildung 5-8) wurde die CMC von MUPDS und AUPDS zu 3,2 mmol L⁻¹ und 6,0 mmol L⁻¹ ermittelt. Die kritische Mizellbildungskonzentrationen der neuen Surfmer stehen dabei im Verhältnis 1,9 : 1 (AUPDS : MUPDS). Da sich die beiden Verbindungen nur durch eine zusätzliche Methyl-Gruppe beim MUPDS unterscheiden, sollten sich die unterschiedlichen CMC-Werte auf diesen Strukturunterschied zurückführen lassen. In der Literatur konnten allerdings keine Vergleiche von CMC-Werten für strukturanaloge Methacrylamid- und Acrylamid-Tenside gefunden werden. Eine entsprechende Verringerung der CMC wird

aber beobachtet, wenn der Alkylkette eines Tensids eine Methylengruppe hinzugefügt wird^[117]. Die damit erhöhte Hydrophobie des MUPDS im Vergleich zum AUPDS macht sich auch durch die schlechtere Wasserlöslichkeit des MUPDS bemerkbar. Während AUPDS eine Wasserlöslichkeit von $>7 \text{ g L}^{-1}$ besitzt, lassen sich von MUPDS lediglich 2 g L^{-1} lösen.

Tabelle 5-5: Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von MUPDS und AUPDS, mit der WILHELMY-Plattenmethode bestimmt ($n = 3$).

Surfmer	CMC $/(\text{mmol L}^{-1})$
MUPDS	$3,2 \pm 0,2$
AUPDS	$6,0 \pm 0,2$

Das Absinken der CMC durch Verlängern des hydrophoben Rests wird beim Übergang von UPDS zu AUPDS vermutlich durch einen anderen Effekt überkompensiert, da AUPDS mit $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ eine höhere CMC als UPDS besitzt. Die Ursache eines solchen Effekts kann das Einfügen der im Vergleich zur Alkyl-Gruppe polareren Amid-Gruppe sein. In der Literatur^[117] findet sich die Angabe, dass die CMC bei den Kaliumsalzen einiger Fettsäuren ansteigt, wenn ein Wasserstoff einer Methylen-Gruppe durch eine Hydroxy-Funktion ersetzt wird. Die bei den beiden Surfmeren vorhandene N-Alkylamid Gruppe könnte einen ähnlichen Effekt hervorrufen.

Es lässt sich schließlich zusammenfassen, dass sich die Grenzflächen- und Adsorptionseigenschaften von AUPDS und MUPDS mit der GIBBS'schen Theorie der Grenzflächenadsorption und der Mizellenbildung gut beschreiben lassen.

5.3 Surfmerreaktivität

Neben der Grenzflächenaktivität sollen die Surfmerer auch die Eigenschaft besitzen, Stickstoff-Nukleophile binden zu können, um Farbstoffe, Proteine, Peptide und andere Moleküle auf den Partikeln zu immobilisieren. Durch den Einbau einer Aktivester-Funktion in die Surfmerer soll dieses Ziel erreicht werden. NAGAI et al. konnten beispielsweise durch den Einbau einer Aktivester-Funktion 2-Methoxyethanamin (MOEA) auf Polystyrol-Partikeln immobilisieren.

Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente ist, die Reaktivität der neuen Surfmerer AUPDS und MUPDS gegenüber Stickstoff-Nukleophilen zu untersuchen. Zu diesem

Zweck wurden die beiden Surfmerer zunächst im unpolymersierten Zustand mit folgenden Verbindungen umgesetzt:

Ethanolamin

Mit dieser Verbindung kann eine Hydroxy-Funktion in das Molekül eingefügt werden.

n-Butylhydrazid

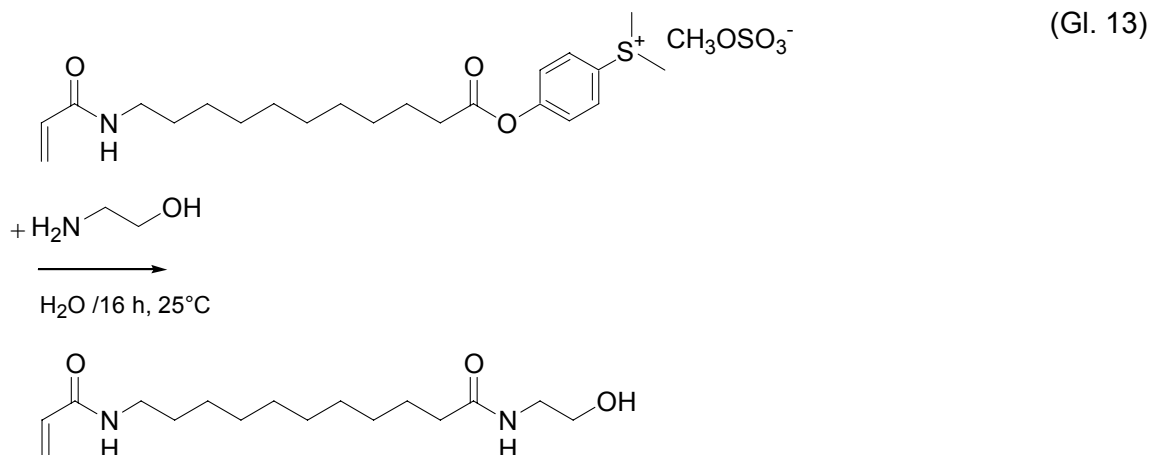
Mit dieser Verbindung ist es möglich einen unpolaren Rest an das Surfmer zu binden.

Streptavidin

Dieses Protein enthält in seiner Monomer-Sequenz^[118-120] bis zu achtmal die Aminosäure Lysin, über deren ω -Amino-Funktion die Bindung mit dem Surfmer erfolgen kann. Das Protein, welches ein Molekulargewicht von 13.000 Da besitzt, bildet ein Tetramer^[85,119,121] und reagiert mit Biotin (Vitamin H, 244 Da) zu einem stabilen Komplex.

5.3.1 Reaktivität von AUPDS gegenüber Ethanolamin

Reaktionsgleichung



Durchführung

Um die Reaktivität von AUPDS gegenüber Ethanolamin zu überprüfen, wurden 2 mL wässrige AUPDS-Lösung ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) mit 2 mL wässriger Ethanolamin-Lösung ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Anschließend wurde die Lösung samt

Niederschlag dreimal mit je 10 mL Essigsäureethylester extrahiert. Nachdem das Lösemittel der gesammelten und mit MgSO_4 getrockneten Extrakte mit dem Rotationsverdampfer entfernt worden war, erhielt man 41 mg (0,14 mmol; 70 % Ausbeute) eines weißen Feststoffs.

Analytik

IR (KBr): 3429 (s OH), 3303 (s NH), 3079 (s NH), 2921, 2851 (m CH), 1654, (m Amid I der Acrylamid-Gruppe), 1644 (m, Amid I der 2-Hydroxy-ethylcarbamoyl-Gruppe), 1626 (w C=C), 1546 (m Amid II der 2-Hydroxy-ethylcarbamoyl-Gruppe und Acrylamid-Gruppe), 1059 cm^{-1} (m -OH) s. Abbildung 5-9.

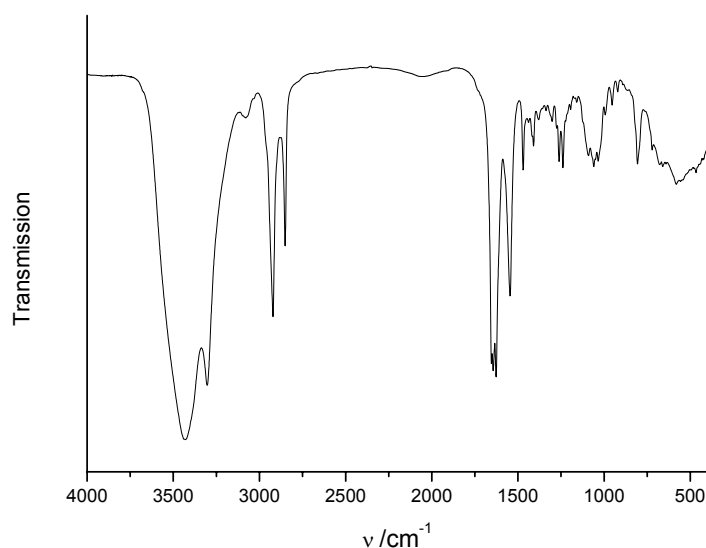


Abbildung 5-9 IR-Spektrum des Produkts der Reaktion von AUPDS und Ethanolamin, N-[10-(2-Hydroxy-ethylcarbamoyl)-decyl]-acrylamid.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): $\delta = 1,24\text{-}1,46$ (m H^{5-12}), 2,04 (t H^4 $J_{4,5} = 7,0$ Hz), 3,07-3,14 (m $\text{H}^{3,13}$), 3,36 (m $\text{H}^{1,2}$), 5,56 (dd H^{15} $J_{15,16} = 2,5$ Hz, $J_{14,15} = 14,5$), 6,06 (dd H^{16} $J_{14,16} = 17$ Hz), 6,21 (dd H^{14}) ppm.

Diskussion der Ergebnisse zur Surfmerreaktivität gegen Ethanolamin

Die gemessenen IR-Daten belegen die Reaktion der Aktivester-Gruppe mit der Amin-Gruppe des Ethanolamins durch das Auftreten von typischen Signalen einer Amid-Funktion bei 3303 cm^{-1} , 3079 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} und 1546 cm^{-1} ^[122]. Diese Werte stimmen ausserdem mit den von NAGAI gemessenen Wellenzahlen von 3320 cm^{-1} , 3090 cm^{-1} , 1640

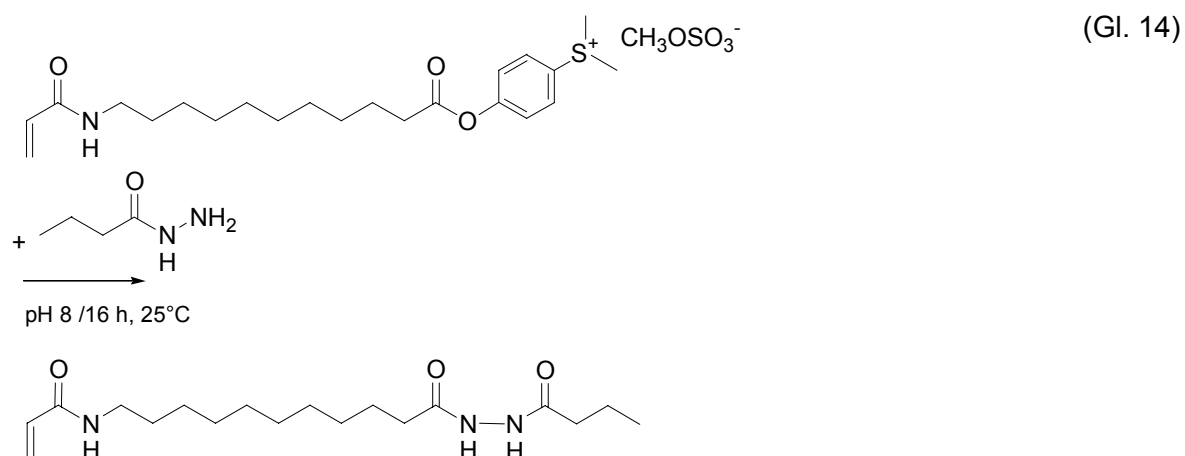
cm^{-1} und 1550 cm^{-1} für das Reaktionsprodukt aus UPDS und 2-Methoxyethylamin (MOEA) gut überein.

Die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigen zusätzlich, dass es sich beim hergestellten Produkt um N-[10-(2-Hydroxy-ethylcarbamoyl)-decyl]-acrylamid handelt. Die Auswertung des Spektrums wird hier lediglich durch die Überlagerung der Signale der Protonen H^3 und H^{13} bei $\delta = 3,07\text{-}3,14$ beeinträchtigt.

Die Ausbeute der durchgeführten Reaktion beträgt 70 %. Dieser Wert ist von Interesse, da von NAGAI für die zum Vergleich herangezogene Reaktion von UPDS und MOEA keine Ausbeute angegeben wird.

5.3.2 Reaktivität AUPDS gegenüber n-Butylhydrazid

Reaktionsgleichung



Durchführung

Um die Reaktivität von AUPDS gegenüber n-Butylhydrazid zu überprüfen, wurden 2 mL wässrige, mit Phosphatpuffer ($c_{\text{Phosphat}} = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) auf pH 8,0 eingestellte, AUPDS-Lösung ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) mit 2,5 mL ebenfalls gepufferter n-Butylhydrazid-Lösung ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Anschließend wurde der Niederschlag abzentrifugiert und dreimal mit je 10 mL Wasser gewaschen. Nachdem das Wasser im Vakuum entfernt worden war, erhielt man 40 mg (0,5 mmol, 50 % Ausbeute) eines weißen Feststoffs.

Analytik

IR (KBr): 3317 (s NH), 3079 (s, NH), 2927, 2852 (m CH), 1652 (m Amid I der Acrylamid-Gruppe), 1626 (s C=O N,N'-Diacylhydrazid), 1601, 1574 (m C=O Diacylhydrazid), 1539 (m Amid II der Acrylamid-Gruppe), 1243 cm^{-1} (m N,N'-Diacylhydrazid).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO): $\delta = 0,89$ (t H^1 $J_{1,2} = 6$ Hz), 1,23 (m H^{6-11}), 1,4- 1,7 (m $\text{H}^{2,3,5,12}$), 2,07 (t H^4 $J_{4,5} = 7,0$ Hz), 3,08 (t H^{13} $J_{12,13} = 5,8$ Hz), 3,36 (m $\text{H}^{1,2}$), 5,56 (dd H^{15} $J_{15,16} = 2,5$ Hz, $J_{14,15} = 14,5$), 6,08 (dd H^{16} $J_{14,16} = 17$ Hz), 6,20 ppm (dd H^{14}).

Diskussion der Ergebnisse zur Surfmerreaktivität gegen n-Butylhydrazid

Die Reaktion des AUPDS mit n-Butylhydrazid ergibt das gemischte N,N'-Diacylhydrazid, N-[11-(N'-Butyryl-hydrazino)-11-oxo-undecyl]-acrylamid (s. (Gl. 14)). Das Reaktionsprodukt konnte anhand der IR- und NMR-Spektren identifiziert werden. Die Lage der Banden im IR-Spektrum des Produkts stimmt mit den in der Literatur^[122] für N,N'-Diacylhydrazid angegebenen Werten gut überein.

Durch die ähnliche chemische Umgebung der Protonen $\text{H}^{2,3}$ und $\text{H}^{4,5}$ ergibt sich ein NMR-Spektrum mit überlagerten und nicht eindeutigen Signalen im Bereich von $\delta = 1,4$ ppm bis 1,7 ppm. Die Zuordnung des übrigen Spektrums ist allerdings zweifelsfrei möglich.

Die hier durchgeführte Reaktion des Dimethylsulfoniumphenyl-Aktivesters bietet damit die Möglichkeit, N,N'-substituierte Hydrazide in wässriger Lösung herzustellen.

5.3.3 Reaktion des Surfmers mit Streptavidin

Um die Reaktivität der Surfmer gegenüber Proteinen zu untersuchen, wurden AUPDS, MUPDS und MIHPDS in wässriger Lösung mit Streptavidin umgesetzt (s. Abbildung 5-10). Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit MALDI-TOF-MS.

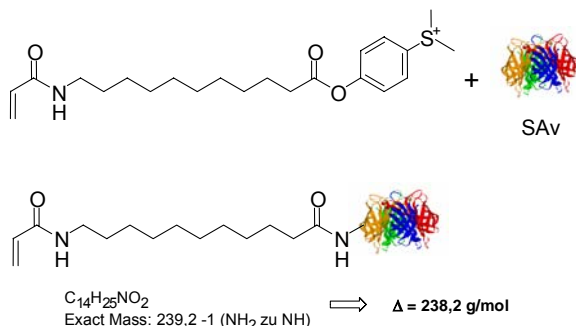


Abbildung 5-10: Reaktionsgleichung für die Umsetzung von Streptavidin (SAv) mit AUPDS. Nach der Acylierung einer Amino-Funktion erhöht sich das Molekulargewicht des Streptavidins um 238,2 g/mol.

Durchführung

Zu 30 μL einer wässrigen Streptavidin-Lösung ($c_{\text{Sav}} = 250 \mu\text{mol mL}^{-1}$) wurden 100 μL Puffer-Lösung (s. Tabelle 5-6) und 10 μL Surfmer-Lösung ($c = 8 \mu\text{mol mL}^{-1}$) gegeben. Nach 2 h Schütteln der Lösung bei Raumtemperatur wurden 50 μL entnommen und mit Millipore ULTRAFREE-Centrifugation-Tubes (MWCO 10 kDa) aufgereinigt. Die verbliebenen 50 μL Reaktionslösung wurden weitere 16 h geschüttelt und danach ebenfalls durch Zentrifugation aufgereinigt.

Tabelle 5-6 Pufferkonzentrationen für die Untersuchung der Surfmerreaktivität gegen Streptavidin. Die aufgeführten Surfmer wurden in getrennten Ansätzen umgesetzt.

pH	Puffersystem	Konzentration /(mol L ⁻¹)
5,9	NaOH / KH ₂ PO ₄	10
7,0	NaOH / KH ₂ PO ₄	10
7,8	NaOH / KH ₂ PO ₄	10
8,5	Borat-Puffer	10

Die aufgereinigten Reaktionslösungen wurden für die Analyse mit MALDI-TOF-MS wie folgt präpariert: Auf einem MALDI-TOF-MS Proben-träger wurde zunächst 1 μL Sinapinsäure-Lösung ($c_{\text{Sinapinsäure}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ in Acetonitril/Methanol/Wasser, v:v:v, 1:1:1) im Vakuum eingetrocknet. Auf die eingetrocknete Matrix wurde 1 μL aufgereinigte Reaktionslösung getropft. Nach erneuter Vakuum-trocknung ließ man auf der Probe 1 μL Sinapinsäure-Lösung ($c_{\text{Sinapinsäure}} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$ in Methanol/Wasser/Trifluoressigsäure 50:50:1) an der Luft eintrocknen.

Die interne Kalibrierung der Messungen erfolgte durch die Analyse einer Probe, bei der anstelle der Reaktionslösung eine Lösung mit Cytochrom C ($M_{[\text{M}+\text{H}]^+} = 12360 \text{ Da}$, $c = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) verwendet wurde (s. Abbildung 5-11). Ausserdem wurden der Matrixblindwert und eine Streptavidin-Lösungen ohne Surfmerzusatz gemessen.

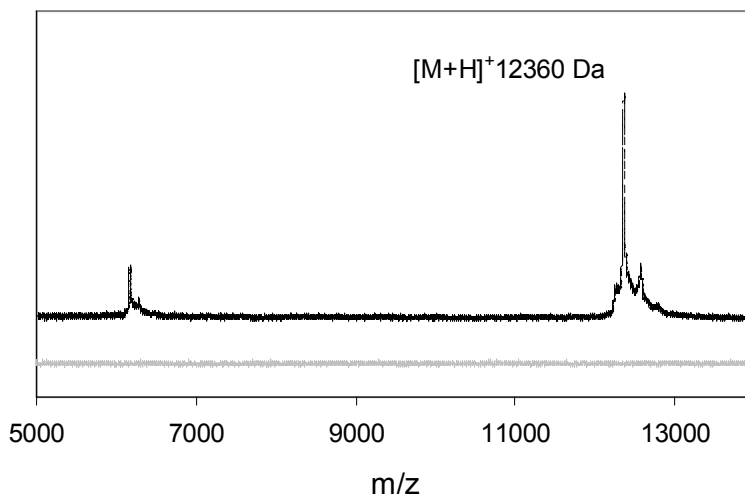


Abbildung 5-11 MALDI-TOF-MS Spektrum des Blindwerts der Sinapinsäure-Matrix (unten) und des Kalibranten Cytochrom C (oben). Neben dem $[M+H]^+$ Signal zeigt sich auch das $[M+2H]^{2+}$ Signal.

Ergebnisse und Diskussion zur Surfmerreaktivität gegenüber Streptavidin

Für die Streptavidin-Lösung ohne Surfmerzusatz nach 2 h Reaktion zeigt sich im Massenspektrum (Abbildung 5-12 und Tabelle 7-1) ein Doppelsignal¹ bei 12979 g mol^{-1} und 13050 g mol^{-1} . Das Auftreten eines Signals bei 12979 g mol^{-1} entspricht der von KARAS und HILLENKAMP bestimmten Masse des Kern-Streptavidins^[85,120]. Nach zweistündiger Umsetzung mit AUPDS bei den pH-Werten 7,0, 7,8 und 8,5 treten in den Massenspektren (s. Abbildung 5-12) zwei, drei und vier neue Doppelsignale im Messbereich über 13000 g/mol auf. Die Auswertung der Spektren (s. Abbildung 5-12) ergab, dass der Massen-Abstand von einem Doppelsignal zum nächsten ($238,5 \pm 2$) g/mol beträgt. Die Übereinstimmung dieses Massenunterschieds mit der für die Reaktion von AUPDS mit Streptavidin berechneten Differenz von $238,2 \text{ g mol}^{-1}$ (s. Abbildung 5-10) belegt die Reaktivität des Aktivesters mit den Amino-Gruppen des eingesetzten Proteins.

Neben der so bestätigten Reaktivität des Aktivesters lassen die Massenspektren auch vorsichtige Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte zu. Diese Quantifizierung ist bei der Auswertung der MALDI-TOF-MS-Daten zulässig weil die untersuchten Streptavidin-Reaktionsprodukte ein sehr ähnliches Desorptions- und Ionisierungsverhalten aufweisen sollten.

¹ Das Auftreten eines Doppelsignals konnte nicht vollständig erklärt werden. Möglicherweise handelt es sich hier um teilweise oxidiertes Streptavidin.

Das Massenspektrum der Reaktionsprodukte, die nach zweistündiger Umsetzung von Streptavidin mit AUPDS bei einem pH-Wert von 8,5 gewonnen wurden, zeigt (s. Abbildung 5-12), dass bis zu fünf N-(11-Oxyundecyl)-acrylamid-Gruppen an Streptavidin gebunden wurden.

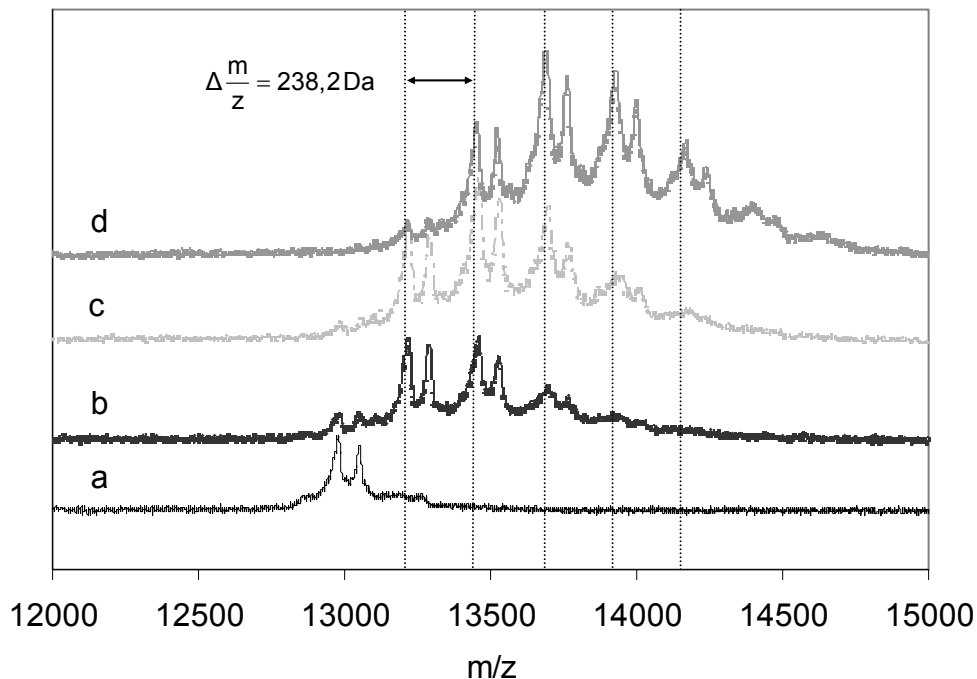


Abbildung 5-12 MALDI-TOF-MS Spektren der Reaktionsprodukte von Streptavidin und AUPDS nach 2 h Reaktion bei pH 7 bis 8,5 (von a bis d: SAV ohne Surfmerszusatz (a), mit AUPDS bei pH-Werten von 7,0 (b), 7,8 (c) und 8,5 (d)). Der Abstand der vertikalen Linien beträgt jeweils 238,2 Da.

Das intensivste Signal dieses Spektrums tritt bei drei übertragenen Gruppen auf. Der größte Anteil des Streptavidins hat bei pH 8,5 demnach mit jeweils drei Molekülen AUPDS reagiert. Wie aus Abbildung 5-12 ausserdem ersichtlich ist, reagiert der größte Anteil des eingesetzten Proteins bei pH 7,8 mit zwei und bei pH 7,0 lediglich mit ein bis zwei Molekülen des Surfmers. Die Anzahl der Acylierungen pro mol Streptavidin ist demnach vom pH-Wert der Reaktionslösung abhängig.

Auch nach 16 h Reaktion findet sich in den Spektren die vorhergesagte Massendifferenz der aufeinanderfolgenden Doppelsignale von $(238,2 \pm 1,0)$ g/mol (s. Abbildung 5-13 und Tabelle 7-2). Nach dieser Reaktionszeit reagieren bei pH 7,0 bis zu vier und bei pH 7,8 und 8,5 bis zu fünf Moleküle AUPDS mit einem Molekül Streptavidin.

Die Auswertung der Spektren, der nach sechzehnständiger Reaktion erhaltenen Produkte zeigt ausserdem, dass die Reaktionszeit einen Einfluss auf die Lage des Maximums der Verteilung besitzt (s. Abbildung 5-13). Liegt dieses Maximum nach zwei Stunden Reaktion

bei höchstens zwei Acylierungen, so ist der größte Anteil des Streptavidins nach 16 Stunden bei einem pH-Wert von 7,0 dreimal acyliert. Eine Erhöhung des pH-Wertes geht auch hier mit einer Verschiebung des Acylierungs-Maximums zu drei bis vier übertragenen N-(11-Oxyundecyl)-acrylamid-Gruppen einher.

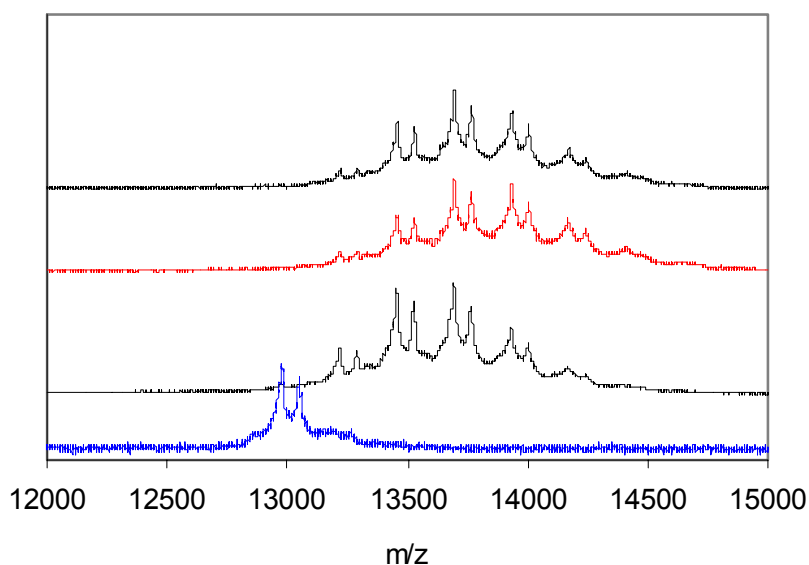


Abbildung 5-13 MALDI-TOF-MS Spektren der Reaktionsprodukte von Streptavidin und AUPDS nach 16 h Reaktion bei pH-Werten von 7 bis 8,5 (von unten nach oben: SAV ohne Surfmierzusatz, SAV mit AUPDS bei pH 7,0, 7,8 und 8,5).

Die Auswertung der Ergebnisse dieser Reaktivitätsversuche zeigen zum einen, dass die gewählten Reaktionsbedingungen für die Reaktion von Aktivester-Surfmeren mit Streptavidin geeignet sind. Zum anderen können mit AUPDS bis zu fünf Acylierungen an Streptavidin vorgenommen werden.

Wird statt AUPDS, MUPDS mit Streptavidin umgesetzt, zeigt sich, dass mit dem Methacrylamid-Surfmer nur zwei bis drei Acylierungen am Protein vorgenommen werden können (Abbildung 5-14 und Tabelle 7-3). Auch hier nimmt die Anzahl der übertragenen Gruppen mit steigendem pH-Wert zu.

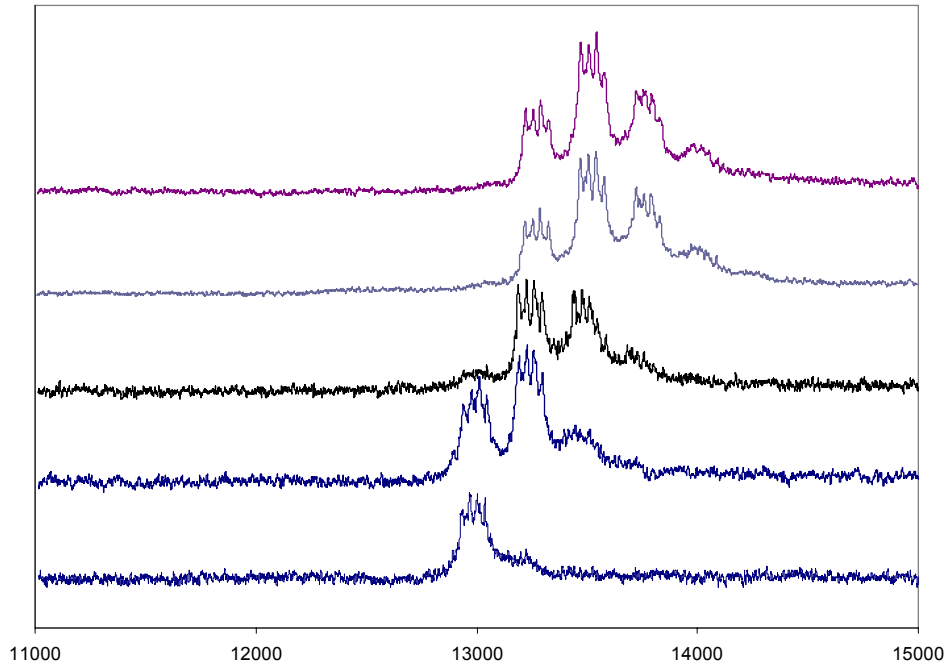


Abbildung 5-14 MALDI-TOF-MS Spektren der Reaktionsprodukte von Streptavidin und MUPDS nach 16 h Reaktion bei pH-Werten 5,9 bis 8,5. (von unten nach oben: SAV ohne Surfmerszusatz, SAV mit AUPDS bei pH 5,9; 7,0; 7,8 und 8,5). Die Doppelsignale haben einen Abstand von je 251 Da. Wie bei den MALDI-TOF-MS Ergebnissen der AUPDS-Umsetzung stimmt der gemessene Signalabstand von (251 ± 1) Da mit dem theoretisch erwarteten Wert von 251,2 Da gut überein (s. Tabelle 7-3).

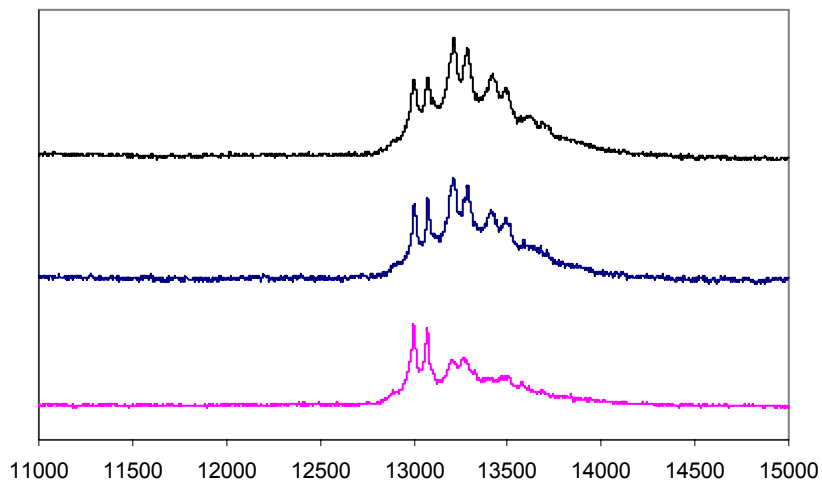


Abbildung 5-15 MALDI-TOF-MS Spektren der Reaktionsprodukte von Streptavidin und MIHPDS nach 16 h Reaktion bei pH-Werten von 5,9 bis 8,5 (von unten nach oben: SAV mit AUPDS bei pH 5,9; 7,8 und 8,5).

Die Analysen-Ergebnisse der Umsetzung von MIHPDS zeigen, dass mit diesem Surfmer lediglich ein bis zwei Streptavidin-Acylierungen vorgenommen werden können (s. Abbildung 5-15 und Tabelle 7-4).

Allerdings besteht ein Unterschied zwischen den Signalabständen bei pH 7,0 und denen bei pH 7,8 und pH 8,5. Während man bei pH 7,0 einen mittleren Signalabstand von (194 ± 5) Da fand, wurden für die Analysen-Ergebnisse der Reaktion bei pH 7,8 und pH 8,5 Abstände von (208 ± 8) Da und (211 ± 4) Da berechnet. Der Wert von 194 Da stimmt dabei gut mit dem erwarteten Wert von 193,1 Da überein.

Ein Signalabstand von 211 Da kann durch die Hydrolyse der Imid-Funktion des MIHPDS hervorgerufen werden, da durch die Addition der Masse eines Wassermoleküls (18 Da) zu den 193 Da des Surfmer-Rests genau eine Summe von 211 Da zustande kommt. Die hier vermutete basenkatalysierte Hydrolyse von Imiden wird auch von MATSUI und AIDA für N-Alkylimide beschrieben^[123].

Die Reaktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Surfmeren können auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Als erste Möglichkeit ist die unterschiedliche Reaktivität der aktivierten Esterfunktionen denkbar. Diese Ursache scheint aber wenig wahrscheinlich, da diese Funktion bei allen drei untersuchten Molekülen gleich ist. Die Variation der Spacerlänge und der polymerisierbaren Gruppe kann keine Reaktivitätsveränderung des Aktivesters begründen.

Die zweite denkbare Ursache sind sterische Effekte, die eine Reaktion der aktivierten Ester-Funktion mit den Amin-Funktionen des Streptavidins begünstigen oder verhindern. Diese sterischen Effekte können im Fall der Surfmer nur von den unterschiedlich voluminösen Spacer- und polymerisierbaren Gruppen herrühren. Dieser Erklärungsansatz erscheint wahrscheinlicher, da das reaktivste Surfmer AUPDS auch die am wenigsten voluminöse Acrylamid-Funktion besitzt. Die Reaktivitätsunterschiede können aufgrund der hier durchgeführten Experimente nicht vollständig erklärt werden.

Das wichtigste Ergebnis der Surfmer-Umsetzung mit Streptavidin ist die von MIHPDS über MUPDS nach AUPDS zunehmende Reaktivität der Surfmer. Aus diesem Grund konzentrieren sich die Untersuchungen zum Polymerisationsverhalten in Kapitel 5.5 auf AUPDS.

5.4 Antibakterielles Verhalten der Surfmer

Oberflächen auf denen sich positiv geladene Moleküle oder Ionen befinden, können antibakterielle Wirksamkeit zeigen^[124]. Bekannte antibakteriell ausgerüstete Oberflächen

basieren auf der Verwendung von Silber-Ionen^[125], quaternären Ammoniumsalzen^[124] oder Triiodid-Komplexen^[126].

Da die in dieser Arbeit vorgestellten Aktivester-Surfmerer eine positiv geladene Dimethylsulfonium-Gruppe enthalten und auf Oberflächen eingesetzt werden sollen, war es naheliegend auch die antibakteriellen Eigenschaften von AUPDS zu untersuchen. Bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit finden sich in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Sulfoniumsalzen^[127-129].

Eine antibakterielle Wirkung der mit den Surfmerern hergestellten Latices würde die Möglichkeit bieten die Partikel auf unterschiedliche Oberflächen aufzutragen und so antibakterielle Oberflächen auf einfachem Weg herzustellen.

Der Test auf antibakterielle Wirksamkeit wurde durch Einwirken einer AUPDS-Lösung auf die Bakterien *Mikrococcus luteus* (gram+) und *Escherichia coli* (gram-) erhalten. Gram negative und gram positive Bakterien unterscheiden sich dabei durch die Struktur ihrer Zellwand. Bei beiden Bakterientypen bildet das Peptidglycan Murein den strukturierenden Teil der Bakterienhülle. Während diese Hülle bei gram-positiven Bakterien aus einer ca. 25 nm dicken, mehrlagigen Murein-Schicht besteht, besitzen gram-negative Bakterien eine nur 3 nm dicke Murein-Membran die außerdem noch von einer Außenmembran umgeben ist^[130].

Ein Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Jod Komplex wurde bei den Tests als Vergleichssubstanz mit bekannter Wirksamkeit eingesetzt.

Durchführung

Die zellbiologischen Arbeiten für den Test auf antibakterielle Wirksamkeit wurde von Dr. Iris Trick (Fraunhofer IGB, Stuttgart) durchgeführt.

Als Medium für die Bakterien-Kulturen wurden Agarplatten aus je 25 mL Agar in Petrischalen hergestellt. Aus diesen Platten wurden in der Mitte Nöpfchen für die Testsubstanzen ausgestochen und die Bakterienkulturen in die Agarplatten geimpft (Suspensions-Lebendzellzahl: *M. luteus* $3 \cdot 10^7$ Zellen mL⁻¹, *E. coli* $5 \cdot 10^7$ Zellen mL⁻¹). Die Nöpfchen der Agarplatten wurden daraufhin mit 100 µL AUPDS-Lösung (c = 0,02 mol L⁻¹, pH 7,31 mit KOH eingestellt) befüllt. Ausserdem wurde zum Aktivitätsvergleich eine weitere Agarplatte mit wässrigem PVP-Iod (10 wt-% I₂)-Komplex (c = 10 g L⁻¹, pH = 7,0 eingestellt mit KOH) befüllt. Die befüllten Agarplatten wurden 24 h bei 30 °C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet.

Nach dem Ende der Brutzeit wurde die Ausdehnung der Hemmhöfe um die Prüfsubstanznähpfchen gemessen (s. Tabelle 5-7), um die bakteriozide Wirkung zu quantifizieren.

Tabelle 5-7 Radius der Hemmhöfe (r_{HH}) und andere Charakteristika der Bakterienkulturen nach 24 Stunden Brutzeit mit AUPDS und PVP-Iod. Die Ausdehnung der Hemmhöfe ist ein relatives Maß für die antibakterielle Wirkung.

Bakterienart	Untersuchte Substanz	
	PVP-Iod	AUPDS
<i>E. coli</i>	deutlicher HH, farblos klar, vollkommen zellfrei, $r_{HH} = 3$ mm	deutlicher HH, farblos klar, vollkommen zellfrei, $r_{HH} = 2$ mm
<i>M. luteus</i>	deutlicher HH, farblos klar, vollkommen zellfrei, $r_{HH} = 3$ mm	deutlicher HH, farblos klar, vollkommen zellfrei, $r_{HH} = 4$ mm

Ergebnisse und Diskussion zur antibakteriellen Wirkung der Surfmerer

Mit AUPDS wird sowohl bei *M. luteus* als auch bei *E. coli* eine bakteriozide Wirkung beobachtet. Der Radius der Hemmhöfe (r_{HH}) ist im Fall des Versuchs mit dem gram-negativen *E. coli* kleiner als der Vergleichswert des PVP-Iod Versuchs. AUPDS zeigt jedoch beim gram-positiven *M. luteus* eine stärker bakteriozide Wirkung als das PVP-Iod.

Die bakteriozide Wirkung des AUPDS auf gram-positive und gram-negative Bakterien wird wahrscheinlich durch die Dimethylsulfonium-Gruppe des Surfmers hervorgerufen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von KANAZAWA^[129] et al. berichtet, die bei polymerem 1-(4-Vinyl-benzyl)-tetrahydro-thiopheniumtetrafluoroborat eine antibakterielle Wirkung beobachtet haben. Wie bei den Tests mit AUPDS wurde mit der positiv geladenen Thiophenium-Verbindung auf gram-positive Bakterien eine stärkere Wirkung als auf gram-negative Mikroorganismen beobachtet. Die unterschiedlich starke Wirkung auf gram-positive und gram-negative Bakterien wird auf die unterschiedliche Zellwandstruktur der beiden Mikroorganismen zurückgeführt^[124]. Die Murein-Wand der gram-negativen Bakterien ist im Gegensatz zur Außenwand der gram-positiven Bakterien durch die Außenmembranwand geschützt und ist dadurch weniger sensibel gegen antibakterielle Wirkstoffe^[130].

KANAZAWA^[129] et al. berichteten ausserdem, dass die Thionium-Polymere stärker biozid sind als die zugrunde liegenden Monomere. In diesem Zusammenhang wäre es sehr

interessant auch p(AUPDS) und p(MMA-co-AUPDS) zu untersuchen, da für diese Polymere eine gesteigerte Wirkung erwartet wird.

5.5 Polymerisationsverhalten der Surfmerer

Nachdem im den vorangegangenen Kapiteln die Synthese, Charakterisierung und Reaktivität der Aktivester-Surfmerer untersucht wurde, sollen in diesem Kapitel die Polymerisationseigenschaften dieser Verbindungen untersucht werden. Dafür wurden sowohl die Homopolymerisations- als auch die Copolymerisations-Eigenschaften betrachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen Aufschluss darüber liefern, ob und unter welchen Bedingungen UPDS, AUPDS und MUPDS zur Herstellung von Polymer-Nanopartikeln geeignet sind.

5.5.1 Homopolymerisationen

Bei einer radikalischen Emulsionspolymerisation mit zwei Monomeren können, abhängig von den verwendeten Reaktanden, zwei unterschiedliche Reaktionen ablaufen: Erstens die Copolymerisation der beiden Monomere und zweitens die Homopolymerisation der beiden Monomere zu separaten Homopolymeren. Bei der Herstellung von Nanopartikeln durch Emulsionspolymerisation ist die Homopolymerisation des Surfmerer eine unerwünschte Reaktion, da so das Surfmerer entweder durch Einschluss im Partikelkern oder durch Abtrennung des entstandenen Homopolymers während der Aufreinigung des Latex verloren geht. Im Extremfall führen diese Prozesse zur Ausflockung der Partikel, weil auf der Partikeloberfläche nicht genügend Tenside für eine ausreichende sterische oder elektrostatische Stabilisierung zur Verfügung stehen.

Ein Maß für das Copolymerisationsverhalten eines Monomers 1 in Gegenwart eines Comonomers 2 ist der Copolymerisations-Parameter r_1 (s. Gl. 11, S. 35). Für UPDS liegt dieser Wert bei 0,5 wenn DBF als Comonomer verwendet wird^[39].

Um das Homopolymerisationsverhalten bei AUPDS zu untersuchen, wurde dieses Surfmerer mit AIBA unter Reaktionsbedingungen eingesetzt, welche für Emulsionspolymerisationen üblich sind.

Durchführung

Die Homopolymerisation wurde in einem 100 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührstab und Argon-Zuleitung durchgeführt. Für den Ansatz wurden 25 mL Wasser durch wiederholtes Evakuieren und Belüften mit Argon entgast. 250 mg (0,5 mmol) AUPDS wurden in 5 mL Wasser emulgiert und mit einer Spritze durch ein Septum in den

Dreihalskolben injiziert. Nachdem die leicht milchige Emulsion auf 60 °C erhitzt worden war, erfolgte die Zugabe von 10,6 mg AIBA (0,038 mmol). Nach zweistündiger Reaktion und Rühren mit 400 U min⁻¹, wurde die entstandene klare Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, umgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Aliquot der Lösung wurde unmittelbar nach der Herstellung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Der so erhaltene Feststoff wurde in TFA-d₁ gelöst und mit ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert (s. Abbildung 5-16). Außerdem wurden der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser und das ζ-Potential der Partikel bestimmt.

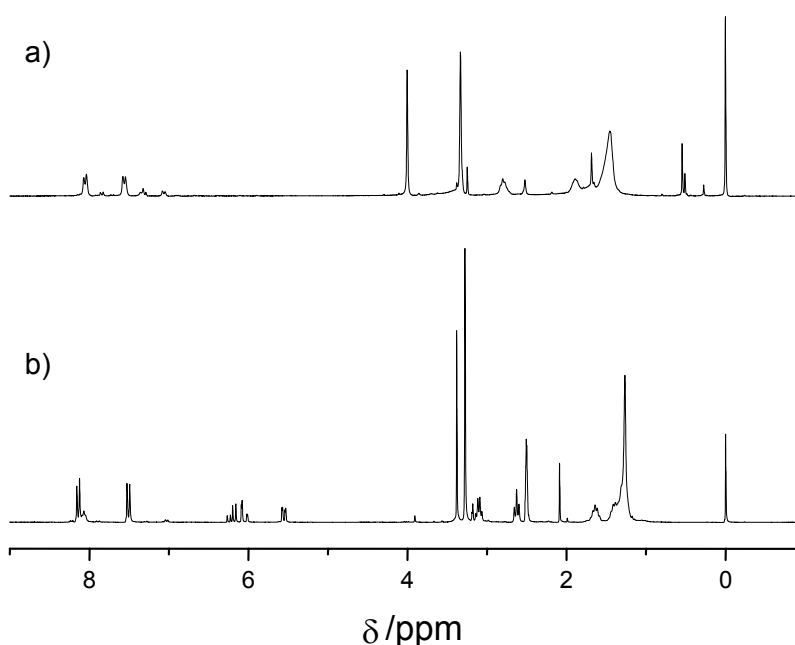


Abbildung 5-16 ¹H-NMR des Produkts der AIBA-initiierten Homopolymerisation von AUPDS in Wasser: a) pAUPDS (Lösemittel TFA-d₁). b) Zum Vergleich wurde darunter das ¹H-NMR-Spektrum von AUPDS dargestellt (Lösemittel DMSO-d₆). Die charakteristischen Signale der Acryl-Protonen des AUPDS bei 5,5 ppm und 6 ppm treten im Spektrum des pAUPDS nicht mehr auf.

Analytik

¹H-NMR(d₆-DMSO): δ = 1,35-1,65 (m H⁵⁻¹¹), 1,63 (m H¹²), 1,68 (m H¹⁵), 1,89 (m H⁴), 2,8 (t H¹³ J_{12,13} = 6,25 Hz), 3,25-3,37 (s H¹), 4,00 (s H¹⁷), 7,6 (d H³ J_{2,3} = 8,5 Hz), 8,1 (d H²).

Das Signal von H¹⁴ wird im Bereich von 1,9 ppm bis 2,1 ppm erwartet^[131] und dort aber von anderen Signalen überlagert.

Durch die Berechnung des Quotienten der relativen Signal-Integrale bei 8,1 ppm (Aktivester) und bei 7,6 ppm (Abgangsgruppe des Aktivesters) wurde die Hydrolyse des Aktivesters quantifiziert. Die Auswertung ergab, dass ca. 85 % des aktivierten Esters die Polymerisation unhydrolysiert überstanden haben.

0,2 mL der hergestellten Polymerlösung wurde mit Wasser auf 3 mL aufgefüllt; und mit dynamischer Lichtstreuung wurde ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von (17 ± 5) nm bestimmt. Mittels Mikroelektrophorese konnte ein ζ -Potential von (42 ± 3) mV bestimmt werden.

Ergebnisse

Das ¹H-NMR-Spektrum (s. Abbildung 5-16) des Reaktionsproduktes zeigt, dass das AUPDS unter den vorgegebenen Emulsionspolymerisationsbedingungen homopolymerisiert, weil die charakteristischen Signale der Acryl-Protonen bei 5,5 und 6 ppm im Spektrum des Reaktionsprodukts nicht mehr auftreten.

Ausserdem sind die typischen Protonen-Signale bei 7,6 ppm und 8,1 ppm noch vorhanden, was für die Erhaltung des aktivierten Esters unter den gegebenen Reaktionsbedingungen spricht.

Diskussion zur Homopolymerisation von AUPDS

Die Ergebnisse des Homopolymerisationsversuchs haben demnach gezeigt, dass AUPDS in der Lage ist ein Homopolymerisat zu bilden. Dieses Ergebnis führt zu der Forderung, dass bei den folgenden Versuchen zur Partikelherstellung Comonomere gewählt werden müssen, deren Copolymerisation schneller als die Homopolymerisation erfolgt.

5.5.2 Core-shell Polymerisationen mit UPDS

UPDS wurde bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit nur dazu verwendet, zusammen mit Dialkylfumaraten eine Schale um Polystyren-Beads mit einem Durchmesser von 4,2 μm zu polymerisieren^[59]. Der erste Schritt auf dem Weg zur Herstellung von Nanopartikeln mit Aktivester-Oberfläche war deshalb der Versuch, UPDS und Dibutylfumarat (DBF) auf der Oberfläche von Saatpartikeln zu polymerisieren.

Im Gegensatz zu AUPDS besitzt UPDS den Vorteil, unter Emulsionspolymerisationsbedingungen kein Homopolymer zu bilden.

Herstellung der Saatpartikel

In einem Planflanschreaktor mit Argonzuleitung, Kühler und Halbmondührer wurde in 250 mL Wasser und 1,0 g Tween 80® durch abwechselndes Evakuieren und Argondurchleiten der molekulare Sauerstoff entfernt. Nach der Zugabe von 18,13 g Methylmethacrylat wurde die Mischung bei 300 U min⁻¹ gerührt und auf 80 °C erhitzt. Nachdem diese Temperatur erreicht war, wurden 321 mg 2,2'-Azobis [2-methyl-N-(2hydroxy-ethyl) propionamid] (VA-086) zugegeben. Nach 4 h Reaktion wurde der erhaltene Latex auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch ein Sieb mit der Maschenweite von 315 µm wurden größere Agglomerate abgetrennt. Der Latex wurde anschließend noch durch Ultrafiltration gereinigt.

Die dynamische Lichtstreuung lieferte für die hergestellten Partikel einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von (200 ± 4) nm. Das ζ-Potential der Partikel betrug in Phosphatpuffer (c_{Phosphat} = 0,01 mol L⁻¹, pH 7,0) (-53 ± 2) mV.

Durchführung der core-shell Polymerisation

36 mL der pMMA-Saatpartikel (Feststoffgehalt des Latex = 0,65 % (m/v), entspricht 234 mg) wurden in einem Dreihalskolben mit Kühler entgast und unter Rühren auf 5 °C abgekühlt. Innerhalb einer Stunde wurden zu diesem Latex 100 µL (0,44 mmol) Dibutylfumarat zugegeben. Nach 1,5 h Rühren wurden der Mischung 191 mg (0,44 mmol) in 4 mL Wasser gelöstes UPDS zugefügt und es wurde bei 5 °C weitere 5 h bei 700 U min⁻¹ gerührt, um den beiden Comonomeren Gelegenheit zu geben, die Oberfläche der Partikel zu belegen. Das ζ-Potential der so vorbehandelten Partikelsuspension betrug (14 ± 2) mV.

Nach der Equilibrierungsphase wurde das Gemisch auf 80 °C erhitzt und es erfolgte die Zugabe von 34 mg VA-086 in 1,0 mL Wasser. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin 24 h bei 80 °C gehalten und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein Aliquot der Reaktionslösung wurde gefriergetrocknet und vom verbliebenen Feststoff wurde nach Auflösen in d₆-Aceton ein ¹H-NMR-Spektrum gemessen (Abbildung 5-17).

Der Rest des Latex wurde anschließend durch wiederholtes Zentrifugieren, Abtrennen des Überstands und anschließendes Dispergieren in Wasser gereinigt.

Die dynamische Lichtstreuung lieferte für das Produkt der Umsetzung einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von (205 ± 4) nm. Das ζ-Potential der Partikel betrug in Phosphatpuffer (c_{Phosphat} = 0,01 mol L⁻¹) (-15 ± 2) mV.

Die gereinigte Latex wurde ebenfalls gefriergetrocknet. Der verbliebene Feststoff wurde in d₆-Aceton gelöst und mit ¹H-NMR Spektroskopie analysiert (Abbildung 5-17 b).

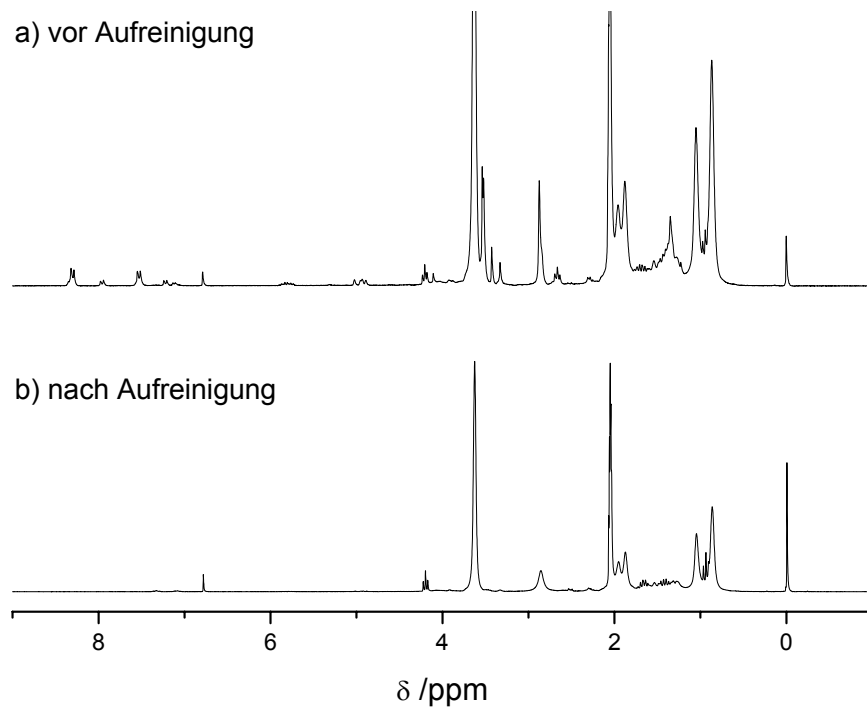


Abbildung 5-17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der ungereinigten (a) und gereinigten (b) Produkte der *core-shell* Polymerisation von DBF und UPDS auf pMMA Partikeln (Lösungsmittel Aceton- d_6). Die Signale des Phenyl-Protonen des Aktivesters bei 7,5 ppm und 8,2 ppm sind im Spektrum (b) nicht vorhanden. Auf den pMMA-Partikeln ist daher mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie kein UPDS nachweisbar.

Ergebnisse und Diskussion zur core-shell Polymerisation von UPDS auf pMMA-Partikeln

Die Messergebnisse der dynamischen Lichtstreuung zeigen keine signifikante Zunahme des Partikelradius nach Zugabe der beiden Comonomere und des Initiators. Bei der Entstehung eines *core-shell* Systems wird erwartet, dass der Partikeldurchmesser durch Polymerisation einer Schale um einen kugelförmigen Kern nach (Gl. 15) zunimmt.

$$r_2 = r_1 \cdot \sqrt[3]{\frac{V_2}{V_1}} \quad (\text{Gl. 15})$$

r_2 = Kugelradius nach core - shell - Polymerisation

r_1 = Kugelradius des Saatpartikels

V_2 = Kugelvolumen nach core - shell - Polymerisation

V_1 = Kugelvolumen des Saatpartikels

Dies ist bei dem beschriebenen Polymerisationsversuch mit pMMA-Partikeln und UPDS nicht der Fall. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung zeigen demnach, daß nach der Initiatorzugabe keine Bildung eines *core-shell*-Systems stattfand.

Das ζ -Potential der Saatpartikel betrug (-53 ± 2) mV und änderte sich nach Zugabe der beiden Comonomere auf $(+14 \pm 2)$ mV. Diese Änderung des Potentials wurde wahrscheinlich durch die Adsorption von UPDS auf der Partikeloberfläche hervorgerufen, da dieses Surfmereine positive Sulfonium-Gruppe besitzt.

Werden die mit UPDS und DBF belegten Partikel bei 80 °C mit dem Initiator umgesetzt und anschließend gereinigt, ließ sich für die verbliebenen Partikel lediglich ein ζ -Potential von (-15 ± 2) mV bestimmen. Wahrscheinlich reicht die auf der Oberfläche der Partikel verbleibende UPDS-Menge nicht mehr aus, um die Ladungsmenge der negativen Ionen auf der Partikeloberfläche zu kompensieren.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 5-17a) der Latex-Probe die unmittelbar nach der Polymerisation entnommen wurde, zeigt die Signale für pMMA bei einer chemischen Verschiebung von 3,6 ppm ($-\text{OCH}_3$) 1,53 ppm bis 1,95 ppm ($-\text{CH}_2-$) und 0,87 ppm bis 1,28 ppm ($-\text{CH}_3$)^[131]. Über die Integration der NMR-Signale der α - CH_3 Protonen des pMMA lässt sich ein Anteil von ca. 53 % syndiotaktischen (0,87 ppm), 39 % ataktischen (1,05 ppm) und 8 % isotaktischen (1,28 ppm) Triaden berechnen.

Ausserdem finden sich die Signale des aromatischen Anteils der Aktivester-Gruppe bei 8,29 ppm und 7,53 ppm. Daneben sind aber auch Signale bei 7,9 ppm und 7,2 ppm vorhanden, die dem p-Phenoldimethylsulfoniummethylsulfat zuzuordnen sind. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein Hydrolyse-Produkt des UPDS. Aus dem Quotienten der integrierten Signale des Hydrolyseprodukts und des nicht hydrolysierten Aktivesters lässt sich abschätzen, dass während der Polymerisation ca. 23 % des UPDS hydrolysiert werden.

Die Signale des DBF treten bei chemischen Verschiebungen von 6,8 ppm, 4,2 ppm, 1,67, 1,45 und 0,94 ppm auf. Interessant ist hierbei der Vergleich des Spektrums der

aufgereinigten Probe mit dem Spektrum der Probe, die direkt nach Versuchsende entnommen wurde, da in den Spektren beider Proben die Signale des DBF auftreten. In beiden Spektren ist überdies das Signal der Protonen der C=C-Doppelbindung (6,8 ppm) zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass DBF auf den Polymerpartikeln zwar adsorbiert aber nicht polymerisiert wird.

Weiterhin treten im Spektrum (Abbildung 5-17a) die Signale der allylischen Protonen bei 4,9 ppm und 5,8 ppm auf. Das UPDS wurde demnach nicht co- oder homopolymerisiert.

Diese Interpretation des ersten Spektrums wird auch durch das zweite Spektrum (Abbildung 5-17b) bestätigt, da sich hier lediglich die Signale des pMMA und schwache Signale des DBF finden. Das unpolymertierte UPDS wird demnach während der Aufreinigung der Partikel von der Partikeloberfläche entfernt.

Das durchgeführte Verfahren ist also nicht geeignet, pMMA-Saatpartikel mit einer Aktivester-Oberfläche zu versehen. Demnach ist das Verfahren von NAGAI^[59] nicht ohne weitere Modifikationen auf Polymernanopartikel übertragbar.

Nachdem der hier beschriebene Versuch und weitere hier nicht näher ausgeführte Experimente mit AIBA als Initiator oder mit anderen Saatpartikeln, nicht zum gewünschten Ziel führten, wurde die Entscheidung getroffen, die Struktur des Surfmers zu verändern, um grundlegend das Polymerisationsverhalten des Surfmers zu verbessern. Dabei sollte auch der Nachteil beseitigt werden, dass zur Herstellung von Aktivester-Oberflächen ein weiteres Comonomer, wie z.B. DBF, benötigt wird.

Die Lösung dieses Problems soll durch die Verwendung von Surfmeren erreicht werden, die unter Emulsionspolymerisations-Bedingungen copolymerisierbar sind. Die Surfmeren AUPDS und MUPDS besitzen aus diesem Grund eine Acrylamid oder Methacrylamid-Funktion.

5.5.3 Copolymerisation von AUPDS und MUPDS mit Methylmethacrylat

Die Copolymerisationsversuche von AUPDS und MUPDS wurden als *batch*-Versuche durchgeführt. Bei diesem Emulsionspolymerisations-Verfahren werden sämtliche Edukte miteinander gemischt, es wird eine Emulsion erzeugt und anschließend wird die Polymerisation durch Initiatorzugabe gestartet.

In diesem Kapitel wird zunächst der Einfluss des Initiators sowie der Surfmerkonzentration auf das Copolymerisationsverhalten untersucht. Abschließend werden kinetische Untersuchungen vorgestellt, mit denen der zeitliche Verlauf der Copolymerisation näher untersucht werden soll.

5.5.3.1 Initiatorvergleich

Drei verschiedene Radikalbildner wurden bei einer *batch*-Polymerisation eingesetzt, um die Copolymerisation der beiden Surfmeren AUPDS und MUPDS mit MMA zu starten. Dabei sollte untersucht werden, welcher Initiator hierfür am besten geeignet ist.

Bei den drei wasserlöslichen Verbindungen handelt es sich um 2,2'-Azobis (2-methylpropion-amidinium) dihydrochlorid (AIBA), 2,2'-Azobis [2-Methyl-N-(2-Hydroxy-ethyl)propionamid] (VA-086) und Kaliumperoxodisulfat (KPS). Diese Verbindungen wurden ausgewählt, weil durch sie drei Ladungsmöglichkeiten eines Radikals vertreten sind: AIBA besitzt eine Amidinium-Funktion, durch die die hieraus entstehenden Radikale positiv geladen sind. Aus Kaliumperoxodisulfat entstehen Radikal-Anionen und die N-(2-Hydroxyethyl)-2-butylamido-2-yl-Radikale, die sich beim Zerfall von VA-086 bilden, sind ungeladen.

Durchführung

Die Latexherstellung wurde in einem 100 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetrührstab und Argon-Zuleitung durchgeführt.

Tabelle 5-8: Umsatz, Partikelgröße \bar{d}_{DLS} und ζ -Potential, der durch Copolymerisation von AUPDS oder MUPDS mit MMA hergestellten Polymerpartikel bei Verwendung unterschiedlicher Initiatoren.

Probe	Initiator	Surfmer	Umsatz /%	\bar{d}_{DLS} /nm	ζ -Potential /mV
PVM	VA-086	MUPDS	0	k.P.	—
PVA	VA-086	AUPDS	0	k.P.	—
PKM	K ₂ S ₂ O ₈	MUPDS	21	265 ± 3	28 ± 3
PKA	K ₂ S ₂ O ₈	AUPDS	2	101 ± 3	28 ± 5
PAM	AIBA	MUPDS	47	133 ± 2	23 ± 3
PAA	AIBA	AUPDS	89	130 ± 2	21 ± 2

k.P. = keine Partikelbildung

Für die Ansätze (s. Tabelle 5-8) wurden in dieser Apparatur je 30 mL Wasser durch wiederholtes Evakuieren und Belüften mit Argon entgast. 85,6 mg (0,17 mmol) AUPDS oder 87,7 mg (0,17 mmol) MUPDS wurden in 2 mL Wasser gelöst und mit einer Spritze

durch ein Septum in den Dreihalskolben injiziert. Danach wurden 1,8 mL (17 mmol) Methylmethacrylat zu der Surfmerlösung gegeben und durch Rühren bei 400 U min^{-1} emulgiert. Nachdem die Emulsion auf 60 °C erhitzt worden war, erfolgte die Zugabe von 0,037 mmol Initiator. Nach 2 h Polymerisation bei dieser Temperatur und Rühren bei 400 U min^{-1} wurde die entstandene Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt, umgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Aus den Ergebnissen der gravimetrischen Feststoffgehaltsbestimmungen wurde nach (Gl. 16) der Umsatz berechnet.

$$U = \frac{m_{\text{Polymer}}}{m_{\text{Monomer}} + m_{\text{Surfmer}} + m_{\text{Initiator}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 16})$$

U = Umsatz der Polymerisation /%

m_{Monomer} = Masse des eingesetzten Monomers /g

m_{Surfmer} = Masse des eingesetzten Surfmers /g

$m_{\text{Initiator}}$ = Masse des eingesetzten Initiators /g

Ergebnisse

Bei Verwendung von VA-086 in der Emulsionspolymerisation, kommt es unter den vorgegebenen Bedingungen nicht zur Bildung von Partikeln (s. Tabelle 5-8).

Auch der Einsatz von Kaliumperoxodisulfat führt in Kombination mit AUPDS lediglich zu einem Umsatz von 2 mol-%. Wird statt AUPDS das Surfmer MUPDS verwendet steigt der Umsatz der Polymerisation auf 21 % an. Die bei Verwendung von MUPDS und Kaliumperoxodisulfat hergestellten Polymerpartikel besitzen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $(265 \pm 3) \text{ nm}$.

Die höchsten Umsätze liefern die Emulsionspolymerisationen, in denen MUPDS oder AUPDS mit AIBA als Initiator eingesetzt wurde. Durch Verwendung dieses Initiators konnten 47 % (MUPDS) oder 89 % (AUPDS) Umsatz erreicht werden. Die erhaltenen Partikel besitzen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 133 nm oder 130 nm und ein positives ζ -Potential.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Durchmesser der bei der Polymerisation **PAA** entstandenen Partikel einer gleichmäßigen Verteilung folgen (Abbildung 5-18). Durch Ausmessen von 130 Partikeldurchmessern auf Abbildung 5-19 konnte eine genauere Aussage über die Verteilung der Durchmesser getroffen werden.

Die Auswertung der Messungen ist in Abbildung 5-20 dargestellt. Das Maximum der Verteilung liegt nach dieser Auswertung zwischen 70 und 80 nm.

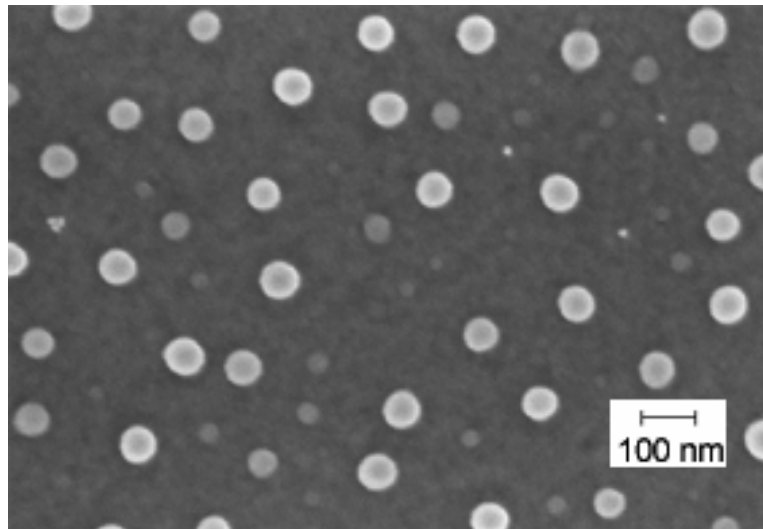


Abbildung 5-18 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel die durch Emulsionspolymerisation von MMA, AUPDS und AIBA entstanden sind (Probe **PAA**). Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Partikel liegt bei 130 nm.

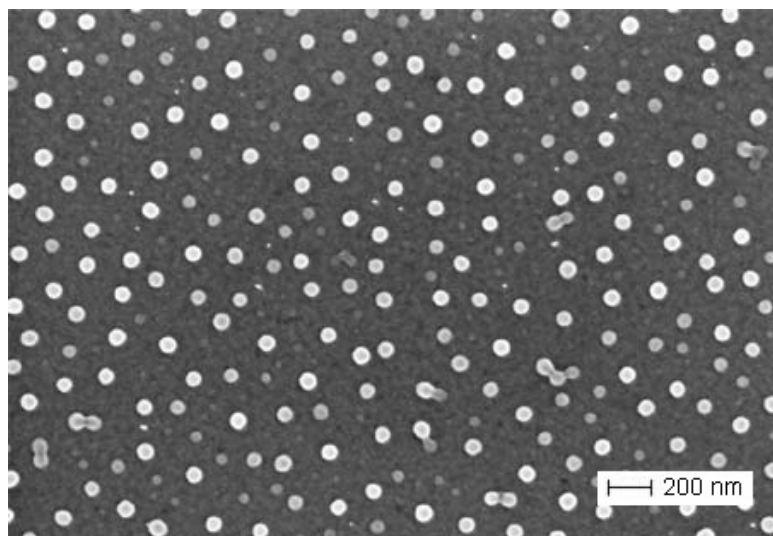


Abbildung 5-19 Rasterelektronenmikroskopische-Aufnahme einer größeren Partikelanzahl von **PAA**. Der mittlere Partikeldurchmesser liegt zwischen 70 nm und 80 nm (s. Abbildung 5-20).

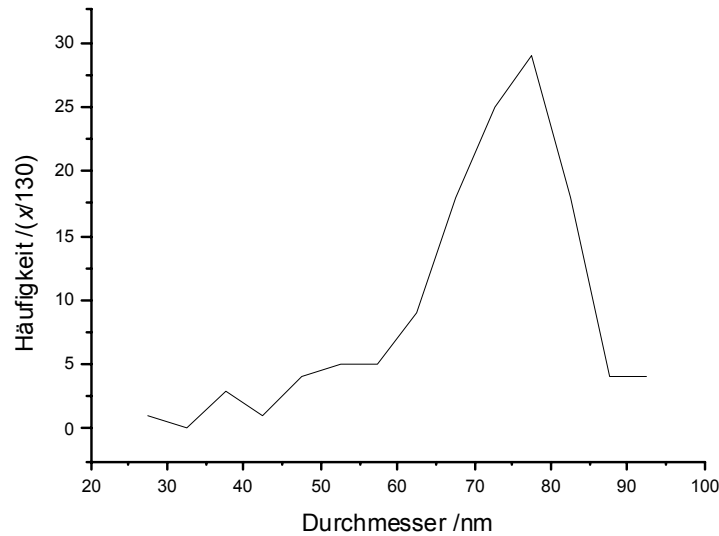


Abbildung 5-20 Häufigkeitsverteilung der REM-Aufnahme von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln (Probe **PAA**). Ausgewertet wurde die Abbildung von 130 Partikeln (s. Abbildung 5-19).

Diskussion der Ergebnisse zur Partikel-Herstellung mit verschiedenen Initiatoren

Der Umsatz der Emulsionspolymerisation mit Methylmethacrylat und MUPDS oder AUPDS ist stark von der Art des eingesetzten Initiators abhängig. Wie schon eingangs beschrieben, unterscheiden sich die verwendeten Initiatoren durch die Ladung des aus ihnen entstehenden Radikals und ihrer Zerfallsgeschwindigkeit.

VA-086 besitzt dabei mit $1,27 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ [132] die niedrigste Zerfallsrate (k_d bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$) der drei Verbindungen. Der entsprechende Wert für AIBA wird mit $4,03 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [133] angegeben, die Zerfallsrate von $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ beträgt $3,41 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ [134]. Die niedrige Polymerisationsausbeute bei der Verwendung von VA-086 könnte demnach durch die niedrige Zerfallsgeschwindigkeit und die dadurch geringere Menge an polymerisationsstartenden Radikalen verursacht werden.

Die geringe Polymerausbeute der mit Kaliumperoxodisulfat initiierten Experimente könnte auf die Rekombination der Radikal-Anionen in Gegenwart der positiv geladenen Aktivester-Surfmerer zurückgeführt werden. Möglicherweise wird das Kettenwachstum in den positiv geladenen Mizellen durch die Peroxosulfat-Radikalanionen abgestoppt. Wird stattdessen AIBA verwendet, kommt es zu einer Abstoßung zwischen den positiv geladenen monomergefüllten Mizellen und den ebenfalls positiv geladenen Radikalen, die aus dem Zerfall des AIBA entstehen.

Ähnliche Effekte werden von NAGAI^[39] postuliert, der beobachtete, dass die Copolymerisation von Undecenoyloxyphenyldimethylsulfoniummethylylsulfat und Diethylfumarat in Wasser schneller verläuft, wenn AIBA statt AIBN als Radikalstarter verwendet wird. Der Unterschied der Reaktionsgeschwindigkeit wurde von NAGAI ebenfalls auf vermindertes Radikal-*quenching* bei Verwendung des positiv geladenen Azoinitiators zurückgeführt.

Die Charakterisierung der Partikel mit dynamischer Lichtstreuung und Rasterelektronenmikroskopie lieferte unterschiedliche Partikeldurchmesser, wobei das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung mit 130 nm über dem der REM-Auswertung mit 70 nm bis 80 nm liegt (s. Abbildung 5-20). Diese Reihenfolge ist einerseits durch die starke Gewichtung größerer Partikel bei der Lichtstreuung (Kapitel 2.1 S.21 ff.) begründet, andererseits wird durch die dynamische Lichtstreuung der mittlere *hydrodynamische* und durch Rasterelektronenmikroskopie der *harte Kugel*-Durchmesser der Polymerpartikel bestimmt. Der, verglichen mit dem REM-Durchmesser, fast doppelt so große hydrodynamische Durchmesser wurde auch durch eine mögliche Quellung der Partikel in Wasser erklärt. Diese Quellung könnte möglicherweise durch die Wasseraufnahme der hydrophile Sulfonium-Bereiche im p(MMA-co-AUPDS) stattfinden.

5.5.3.2 Nachweis der Copolymerisation von Methylmethacrylat und den Aktivester-Surfmeren

Nach der Auswahl des Initiators soll untersucht werden, ob die Surfmeren mit Methylmethacrylat copolymerisieren oder ob es lediglich zu einer Adsorption von AUPDS und MUPDS auf der Oberfläche der Partikel kommt.

Dazu wurden zwei AIBA initiierte Polymerisationen mit je 8 mol-% AUPDS oder MUPDS und MMA durchgeführt und die gefriergetrockneten Copolymere mit ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht.

Durchführung

Die Latexherstellung aus MMA und AUPDS oder MUPDS erfolgte nach dem in Kapitel 5.5.3.1 beschriebenen Verfahren der Emulsionspolymerisation bei 60 °C, wobei zwei Polymerisationen mit je 0,9 mL MMA, 17 mL Wasser und 341 mg AUPDS oder 350 mg (0,68 mmol) MUPDS durchgeführt wurden. Die erhaltenen Polymere **PA** (AUPDS) und **PM** (MUPDS) wurden durch wiederholte Zentrifugation und Dispersion in Wasser von Monomerresten befreit.

Nach Gefriertrocknung von Aliquoten der Proben **PA** und **PM** wurden je 30 mg des verbliebenen weißen Polymers in einer 1:5 (v/v) Mischung aus d_1 -Trifluoressigsäure und d_6 -Aceton gelöst und mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht (s. Abbildung 5-21).

Tabelle 5-9 Reaktionsbedingungen zur Herstellung der Copolymer-Proben **PA** und **PM**.

Probenbezeichnung	Surfmer	Comonomer	Initiat or
	0,68 mmol	8,46 mmol	
PA	AUPDS	MMA	AIBA
PM	MUPDS	MMA	AIBA

Ergebnisse

Im Spektrum der Probe **PA** (Abbildung 5-21b und c) finden sich bei 8,1 ppm und 7,5 ppm die charakteristischen Signale der Aktivester-Funktion. Ausserdem fehlen in dem Spektrum die Signale bei 5,5 ppm und 6,5 ppm, die der Acryl-Endgruppe des eingesetzten AUPDS zugeordnet werden können. Desweiteren läßt sich das Signal bei 3,4 ppm in diesem Spektrum den Protonen der Dimethylsulfonium-Gruppe im p(MMA-co-AUPDS) zuordnen.

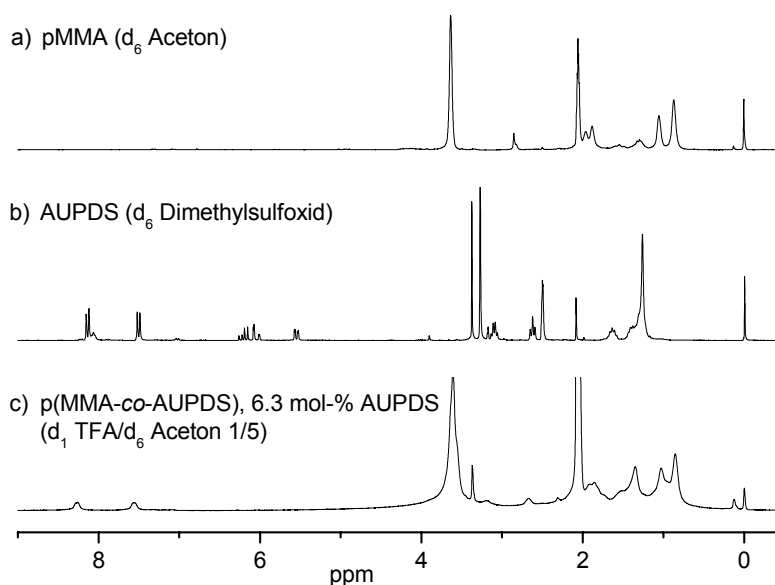


Abbildung 5-21 ^1H -NMR-Spektren von a) p(MMA), b) AUPDS und c) p(MMA-co-AUPDS), Probe **PA**. Im Spektrum von p(MMA-co-AUPDS) finden sich die Signale des pMMA und

die Signale des Aktivesters bei 8,1 ppm und 7,5 ppm. Die 5,5 ppm und 6,5 ppm Signale der Acryl-Gruppe des Surfmers treten in c) nicht auf.

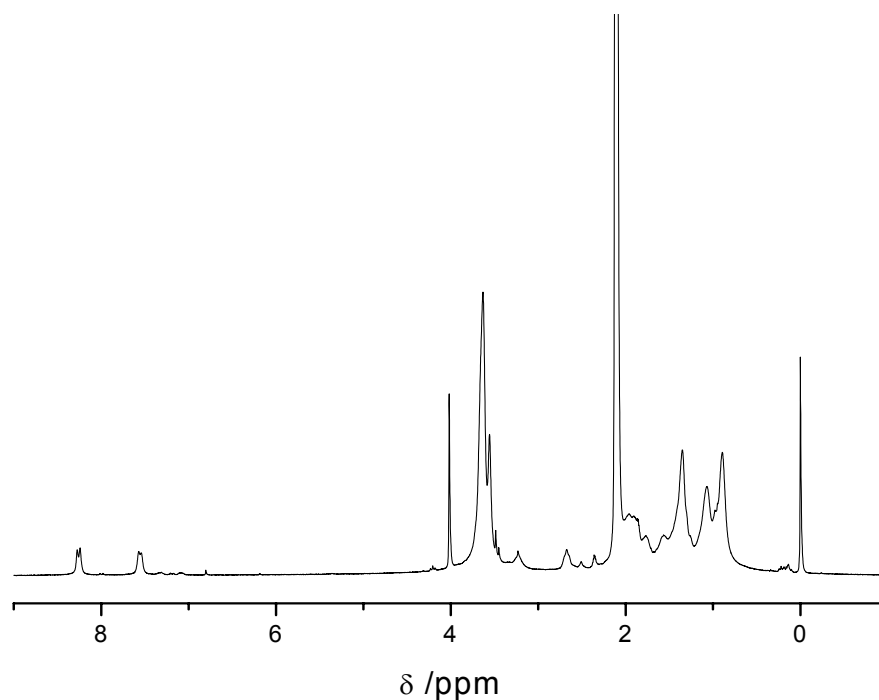


Abbildung 5-22 ¹H-NMR-Spektrum von p(MMA-co-MUPDS), Probe **PM**. Im Spektrum finden sich die Signale des pMMA und die Signale des Aktivesters bei 8,1 ppm und 7,5 ppm. Die 5,5 ppm und 6,5 ppm Signale der Acryl-Gruppe des Surfmers treten nicht auf.

Im Spektrum von **PM** (Abbildung 5-22) finden sich, wie für die Probe **PA**, keine Signale der Acrylamido-Protonen. Die Signale der Protonen des Aktivesters sind bei 7,5 ppm und 8,2 ppm auch im Spektrum der p(MMA-co-MUPDS)-Probe vorhanden.

Die Abwesenheit der sp²-Protonen-Signale in den Spektren der Emulsionspolymerisationsprodukte zeigt, dass die beiden Surfmerer unter den gewählten Versuchsbedingungen polymerisiert wurden. Da davon ausgegangen werden kann, dass die wasserlöslichen Homopolymere aus AUPDS oder MUPDS bei der Aufreinigung des Polymerisationsprodukts entfernt wurde, muss es sich bei dem entstandenen Produkt um ein Copolymer aus MMA und AUPDS oder MUPDS handeln.

Aufgrund von Überlagerung der Alkylprotonen-Signale des Surfmers (d 1,2-1,3 ppm) mit den Signalen der (mm)-Methylprotonen des pMMA lässt sich durch Integration der Copolymer-Spektren lediglich das Verhältnis der syndiotaktischen und ataktischen Triaden abschätzen. Dabei ergibt sich für diese Relation ein Wert von 1,7:1 (rr:rm).

Die Vergrößerung des Bereichs der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (s. Abbildung 5-23), in dem die Protonen-Signale des Polymerrückgrats der Copolymere erscheinen (1,5 ppm bis 3,5 ppm), zeigt keine Signale die nicht auch in AUPDS oder pMMA auftauchen.

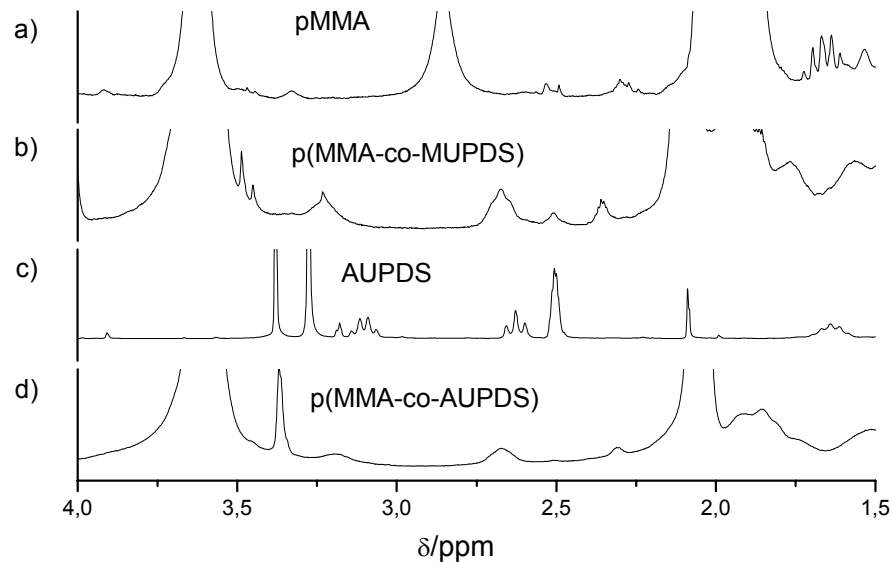


Abbildung 5-23 Detailansicht der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von a) pMMA, b) p(MMA-co-MUPDS) c) AUPDS und d) p(MMA-co-AUPDS). Die Ansicht des Bereichs der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in dem die Protonen-Signale des Polymerrückgrats der Copolymere (b und d) erscheinen sollten (1,5 ppm bis 3,5 ppm), zeigt keine Signale die nicht auch in a) pMMA oder c) AUPDS auftauchen.

Diskussion der Ergebnisse zur Surfmer-Copolymerisation mit MMA

Die Emulsionspolymerisation von MMA mit AUPDS oder MUPDS führt unter den gewählten Bedingungen der Emulsionspolymerisation (mit AIBA als Initiator) zu p(MMA-co-AUPDS) oder p(MMA-co-MUPDS). Die beiden neuen Surfmerer besitzen demnach nicht nur die Eigenschaft Polymerpartikel elektrostatisch zu stabilisieren, sondern sind auch Bestandteil des Polymergerüsts.

Die Untersuchung der Copolymere mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ergab ausser einer Abschätzung der Taktizitätsverhältnisse der pMMA Triaden keine weiteren Ergebnisse.

Ein grundlegendes Problem der NMR-Untersuchungen der Surfmer-Copolymere stellt deren geringe Löslichkeit im verwendeten Lösungsmittel (TFA/Aceton 1:5) und die damit verbundene niedrige Signalintensität dar. Hier könnten evtl. NMR-Untersuchungen bei höheren Temperaturen in anderen Lösungsmitteln weiterhelfen, die Polymercharakteristika zu analysieren.

5.5.3.3 Kinetik der Copolymerisation von MMA und AUPDS

Während im vorangegangenen Unterkapitel die Copolymerisation der Aktivester-Surfmerer mit anderen Comonomeren und die quantitative Zusammensetzung der entstandenen Polymerisate untersucht wurde, soll in diesem Kapitel die Copolymerisations-Kinetik analysiert werden. Bei den beobachteten kinetischen Parametern handelt es sich um die Partikelgröße, die Polymerisationsgeschwindigkeit und den Polymerisations-Umsatz.

Experimentell wurde zur Bestimmung der Polymerisationsgeschwindigkeit die Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit R_P (Gl. 17) ermittelt. Dazu wurde gravimetrisch die zeitliche Abnahme der Monomerkonzentration $c_{\Sigma M_i}$ bestimmt.

$$-\frac{dc_{\Sigma M_i}}{dt} = R_P \quad (\text{Gl. 17})$$

$c_{\Sigma M_i}$ = Gesamtkonzentration der Monomere M_i / (mol L⁻¹)

t = Polymerisationssdauer /s

R_P = Brutto - Polymerisationsgeschwindigkeit / (mol L⁻¹s⁻¹)

Ausserdem sollte die Frage beantwortet werden, nach welcher Polymerisationsdauer die Polymerisation beendet war. Ein Kriterium welches zur Beantwortung dieser Frage herangezogen werden kann, ist die Anzahl der Aktivester-Gruppen bezogen auf die Oberfläche der Polymerpartikel. Dieser Wert kann von der Polymerisationsdauer abhängig sein, wenn das Surfmer auf der Oberfläche während des Polymerisationsverlaufs an- oder abgereichert wird

Experimentell soll diese Fragestellung durch Polyelektrolyttitration beantwortet werden. Dazu werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben des Latex entnommen, mit Inhibitor zur Verhinderung der weiteren Polymerisation versetzt und unpolymerisierte Monomere entfernt. Schliesslich wurde mit einem anionischen Polyelektrolyt titriert, um die Menge der positiv geladenen Aktivester-Gruppen auf der Partikeloberfläche zu bestimmen.

Durchführung

Die Latexproben für die kinetischen Messungen wurden in einem 100 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Magnetührstab und Argon-Zuleitung hergestellt. Für zwei Ansätze mit 1,2 mol-% und 0,5 mol-% AUPDS wurden in dieser Apparatur 50 mL Wasser durch wiederholtes Evakuieren und Belüften mit Argon entgast. 167 mg (0,33 mmol) oder 71 mg (0,14 mmol) AUPDS wurden in je 2 mL Wasser gelöst und mit einer Spritze durch ein Septum in den Dreihalskolben injiziert. Danach wurden 3 mL (28,1 mmol) MMA zu der

Surfmerlösung gegeben und durch Rühren bei 400 U min^{-1} emulgiert. Nachdem die Emulsion auf $60 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt wurde, erfolgte die Zugabe von 10 mg 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid. In regelmäßigen Zeitabständen wurde je 1 mL Reaktionslösung mit einer Kanüle entnommen, in einen ausgewogenen Porzellantiegel gegeben und sofort mit $0,1 \text{ mL}$ wässriger Hydrochinon-Lösung ($1,5 \text{ mg/mL}$) versetzt. Nach zweistündigem Trocknen der Latices bei $120 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Proben abgekühlt, gewogen und $c_{\Sigma M_i}$ mit (Gl. 17) berechnet (s. Abbildung 5-24). Zusätzlich wurde für ausgewählte Proben vor der Trocknung der Partikeldurchmesser (\bar{d}_{DLS}) mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

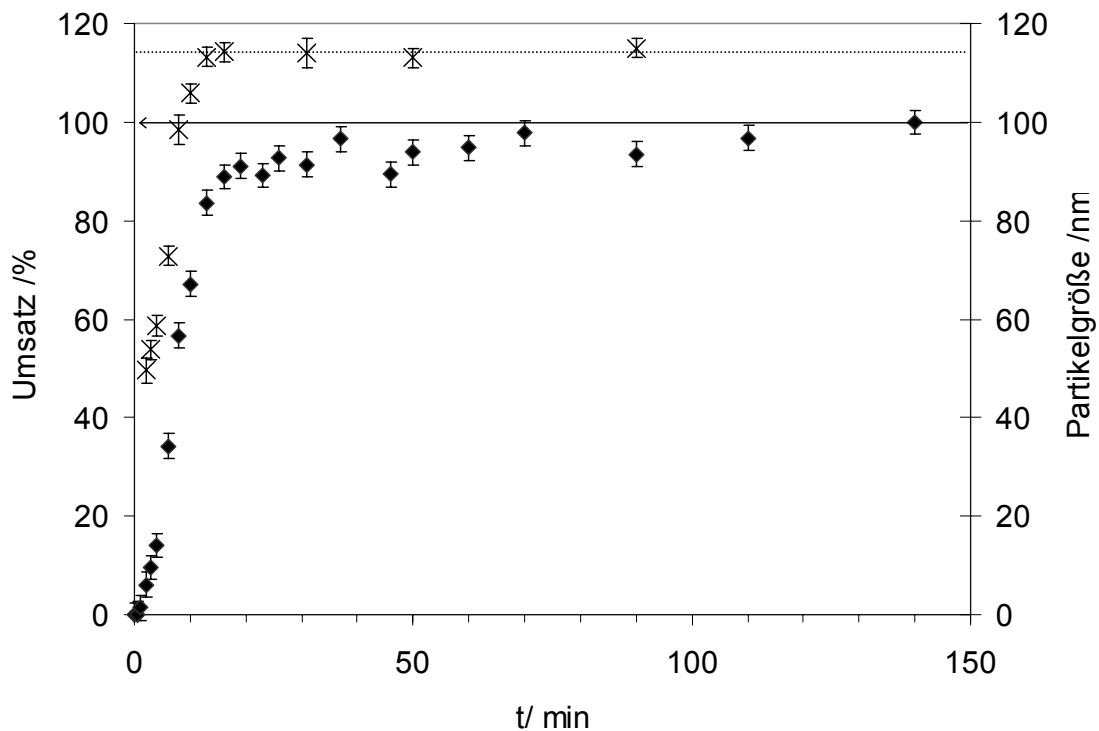


Abbildung 5-24 Graphische Darstellung der Zeitabhängigkeit von Umsatz (\blacklozenge) und Partikelgröße \bar{d}_{DLS} (\times) bei der Copolymerisation von $98,8 \text{ mol-\%}$ MMA und $1,2 \text{ mol-\%}$ AUPDS. Die Emulsionspolymerisation wurde bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt und mit AIBA initiiert. Sowohl der vollständige Umsatz (—) als auch der Endwert der Partikelgröße (\cdots) ist im Diagramm eingezeichnet.

Zur Bestimmung des titrierbaren AUPDS-Gehalts der Partikel wurde die im vorherigen Abschnitt beschriebene Copolymerisation von $1,2 \text{ mol-\%}$ AUPDS mit MMA erneut durchgeführt. Zu den in Abbildung 5-24 aufgeführten Zeiten wurden je 6 mL Latex

entnommen, mit 0,1 mL wässriger Hydrochinon-Lösung (1,5 mg/mL) versetzt und auf 6 °C gekühlt. Die entnommenen Proben wurden je dreimal bei 6 °C zentifugiert und mit Wasser redispersiert. Der Feststoffgehalt der Proben wurde bestimmt und nach Aliquotierung erfolgte die Polyelektrolyttitration der Partikel mit PES-Lösung ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$; $M_w = 5000 \text{ g mol}^{-1}$).

Ergebnisse und Diskussion zur Copolymerisationskinetik von MMA und AUPDS

Die Messung des Umsatzes in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (s. Abbildung 5-24) zeigt, dass die Copolymerisation von MMA mit 1,2 mol-% AUPDS innerhalb von ca. 20 Minuten bereits über 90 % Umsatz liefert. Nach 140 Minuten Reaktionsdauer werden schließlich $(100 \pm 3) \%$ Umsatz erreicht.

Auch der Partikeldurchmesser ($\bar{d}_{DL S}$) der dynamischen Lichtstreuung erreicht bereits nach 13 Minuten seinen Endwert von $(114 \pm 3) \text{ nm}$.

Betrachtet man die zeitliche Entwicklung des Umsatzes ausgehend vom Polymerisationsstart, so zeigt sich bis $t = 3 \text{ min}$ ein linearer Zusammenhang in der Zeit /Umsatz-Kurve. Danach folgt bis $t = 13 \text{ min}$ ein Zeitintervall mit ebenfalls linearer Korrelation, allerdings mit größerer Steigung der Funktion. Darauf folgt ein dritter Zeitbereich bei $13 \text{ min} < t < 140 \text{ min}$ mit geringerer Steigung in dem schließlich die vollständige Polymerisation der Monomere erreicht wird. Noch deutlicher wird die Abfolge der drei Phasen, wenn die Brutto-Reaktionsgeschwindigkeit R_P bei der Polymerisation mit 1,2 mol-% AUPDS betrachtet wird (s. Abbildung 5-25).

Diese zeitliche Ableitung von $c_{\Sigma M_i}$ besitzt ein Maximum mit $1 \text{ mmol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$ bei einer Polymerisationsdauer von 6 Minuten, vor dem die Nukleation stattfindet. Nach ungefähr 16 Minuten ist die Polymerisationsgeschwindigkeit auf unter $0,1 \text{ mmol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$ abgesunken und die dritte Phase der Emulsionspolymerisation wird durchlaufen.

Wenn die AUPDS-Konzentration auf 0,5 mol-% abgesenkt wird, verringert sich auch der Maximalwert für R_P auf 0,3 bis $0,5 \text{ mmol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$. Ausserdem dauert es ca. 30 Minuten bis die zweite Phase abgeschlossen ist und die Polymerisationsgeschwindigkeit unter $0,1 \text{ mmol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$ absinkt.

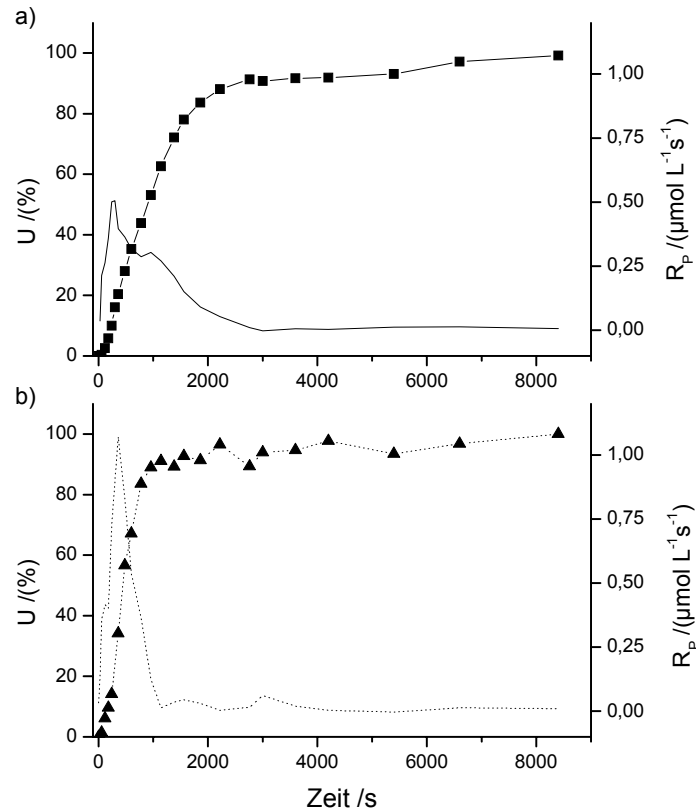


Abbildung 5-25 Umsatz (U) (■, ▲) und Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit R_P (—, ---) für die Emulsionspolymerisationen von MMA mit (a) 0,5 mol-% und (b) 1,2 mol-% AUPDS. Bei (b) wird während des Partikelwachstums ein größerer Wert für R_P erreicht.

Die Intervallgrenzen der zeitabhängigen Funktion der Partikelgröße fallen mit denen der Umsatzfunktion zusammen: Im ersten Intervall lassen sich keine Partikelgrößen bestimmen, dies gelingt erst zu Anfang des zweiten Intervalls, in dem ein \bar{d}_{DLS} von (50 ± 5) nm gemessen werden konnte. Im dritten Intervall findet keine messbare Änderung des Partikeldurchmessers statt. Zusätzlich wurde aus dem Umsatz und der Partikelgröße mit (Gl. 18) die Partikelanzahl pro Latexvolumen (N_c) berechnet.

$$N_c = \frac{m_p^0}{\frac{4}{3} \pi r_u^3 d_p} \quad (\text{Gl. 18})$$

N_c = Partikelanzahl / (L^{-1})

m_p^0 = Feststoffgehalt des Latex / (g L^{-1})

r_u^3 = Partikelradius / m

d_p = Dichte des Polymers / (g m^{-3})

Abbildung 5-26 zeigt die zeitliche Entwicklung der Partikelanzahl N_c bei der Copolymerisation von MMA mit 1,2 mol-% AUPDS. N_c sinkt zunächst im Zeitraum von 2 bis 8 Minuten von $12 \cdot 10^{16} \text{ L}^{-1}$ auf $6,6 \cdot 10^{16} \text{ L}^{-1}$, wobei eine sprunghafte Abnahme bei ca. 6 Minuten stattfindet. Am Ende der Polymerisation wurde eine Partikelanzahl von $(6,4 \pm 0,4) \cdot 10^{16} \text{ L}^{-1}$ erreicht. Diese Abnahme von N_c lässt sich durch das Auftreten von Agglomeration erklären. Möglicherweise agglomeriert ein Teil der anfänglich gebildeten Partikel im Verlauf der Polymerisation bei Einsatz von 1,2 mol-% AUPDS. Ein solches Verhalten wurde beim Einsatz von nur 0,5 mol-% AUPDS nicht beobachtet. Die **Abbildung 5-26** zeigt, dass N_c in diesem Fall über den gesamten Beobachtungszeitraum von 2 Minuten bis 110 Minuten konstant bei $(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^{16} \text{ L}^{-1}$ blieb.

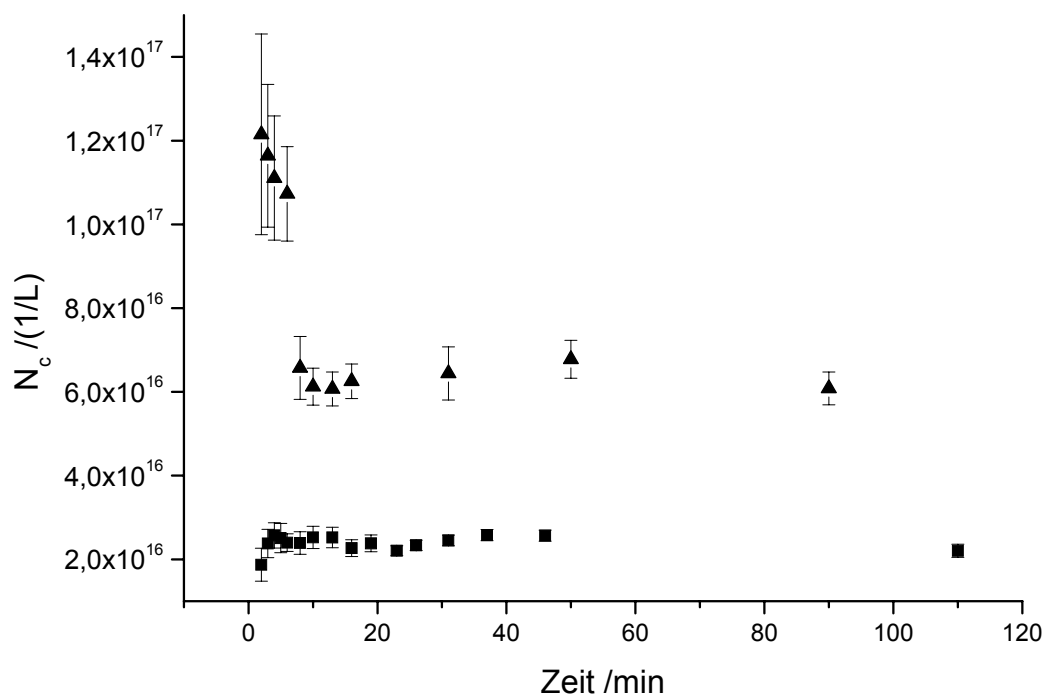


Abbildung 5-26 Partikelanzahl N_c für Emulsionspolymerisationen von MMA mit 0,5 mol-% (■) und 1,2 mol-% (▲) AUPDS. Bei der Copolymerisation mit 1,2 mol-% AUPDS findet während der ersten 10 Minuten teilweise eine Agglomeration der Partikel statt.

Der höhere Surfmergehalt führte demnach bei Betrachtung des gesamten Beobachtungszeitraums zu kleineren Partikeln und einer größeren Partikelanzahl. Gleichzeitig wurde aber der anfängliche Anstieg von N_c durch Agglomeration der Partikel abgeschwächt.

Die drei identifizierten Polymerisationsintervalle werden auch in der Literatur^[21-24,134-136] beschrieben und gehen auf die Arbeiten von HARKINS^[22] zurück. Bei den Intervallen

handelt es sich um die Nukleations-, Wachstums- und Verarmungs-Phase der Emulsionspolymerisation. In der ersten Phase werden Nukleations-Keime gebildet, die in der zweiten Phase durch herandiffundierendes Monomer wachsen. In der dritten Phase wird das restliche, in den gequollenen bestehenden Partikeln enthaltene Monomer copolymerisiert.

Der Polymerisationsablauf und der Einfluss der Surfmerkonzentration sollten nach den Ergebnissen der bisher erfolgten Messungen zur Polymerisationskinetik weitgehend dem Ablauf einer Emulsionspolymerisation mit unpolymersierbarem Tensid folgen.

Die Ergebnisse der Lichtstreuung und der Bestimmung von R_p können mit diesem Modell teilweise erklärt werden: Die in der ersten Phase gebildeten Nukleationskeime sind zu klein und treten in zu geringer Konzentration auf, um durch PCS-Messungen erfasst zu werden. Erst wenn die Keime durch das Wachstum in der zweiten Phase eine Größe von ungefähr 50 nm und Konzentration von ca. 2 mg mL^{-1} überschritten haben, lassen sie sich durch die dynamische Lichtstreuung nachweisen. Schließlich bleibt der Partikeldurchmesser in der letzten Phase der Polymerisation nahezu konstant, da lediglich der Monomeranteil zur Polymerisation verbraucht wird, der vorher zur Quellung der Partikel beigetragen hat.

Durch dieses Modell kann auch die konstante Partikelanzahl bei der Emulsionspolymerisation mit 0,5 mol-% AUPDS und 99,5 mol-% MMA erklärt werden, da nach HARKINS nur in der Anfangsphase der Polymerisation Partikel gebildet werden sollten, die dann durch herandiffundierendes Monomer wachsen.

Das Absinken der Partikelanzahl bei der Polymerisation mit 1,2 mol-% und die damit verbundene Partikelagglomeration kann mit den zur Verfügung stehenden Daten nicht eindeutig erklärt werden. Möglich wäre eine Agglomeration der Partikel, die zuvor durch mizellare Nukleation entstanden sind. Für diese These spricht die Tatsache, dass bei 1,2 mol-% AUPDS die CMC dieses Surfmers gerade überschritten ist, während sich aufgrund der unterkritischen Konzentration bei 0,5 mol-% keine Mizellen bilden können.

R_p durchläuft nach diesem Modell in der Nukleationsphase einen Anstieg auf einen konstanten Wert, der einige Zeit gehalten wird, wenn die Polymerisation in den monomergequollenen Partikeln fortschreitet. Wenn kein Monomer in die Partikel nachgeliefert wird, sinkt die R_p bis das restliche in den Partikeln vorhandene Monomer aufgebraucht ist.

Der Verlauf von R_p bei der Polymerisation mit 0,5 mol-% AUPDS (Abbildung 5-25) entspricht diesem Modell, wenn auch in der zweiten Phase eher ein breites Maximum als ein konstantes Plateau der Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit durchlaufen wird.

Eine Vergrößerung der Surfmerkonzentration auf 1,2 mol-% führt dazu, dass in der zweiten Phase in einem Zeitraum von 4 Minuten ein Maximum für R_p durchlaufen wird. Der Anstieg von ca. $0,5 \text{ mmol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$ auf $1,0 \text{ mmol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$ beim Übergang von 0,5 mol-% auf 1,2 mol-% lässt sich durch die größere Zahl an aktiven Partikeln in der Wachstumsphase erklären. Hier ist die Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit direkt proportional zur Tensidkonzentration^[95].

Der Polymerisationsablauf und der Einfluss der Surfmerkonzentration folgen demnach weitgehend den Gesetzen einer Emulsionspolymerisation mit unpolymersierbarem Tensid.

Ausserdem sollte die Frage beantwortet werden, nach welcher Polymerisationsdauer sich der höchste Gehalt an Aktivester-Gruppen auf den Latexpartikeln befindet. Der mit Polyelektrolyttitration bestimmte AUPDS-Gehalt der p(MMA-co-AUPDS) Partikel in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ist in Abbildung 5-27 dargestellt. Die nach 4 Minuten entnommenen p(MMA-co-AUPDS)-Partikel, enthalten $34,5 \text{ } \mu\text{mol}$ AUPDS pro 1 g Feststoff. Das Maximum des mit PCD bestimmbaren AUPDS-Gehalts wird bei den Partikeln bestimmt, die nach zwölf Minuten Polymerisation entnommen wurden. Hier wurden $72,8 \text{ } \mu\text{mol}$ AUPDS pro Gramm p(MMA-co-AUPDS) bestimmt. Nach diesem Maximum fällt der titrierbare AUPDS-Gehalt bis auf einen Wert von $42 \text{ } \mu\text{mol}$ pro Gramm ab, wenn die Polymerisation 142 Minuten lang durchgeführt wurde.

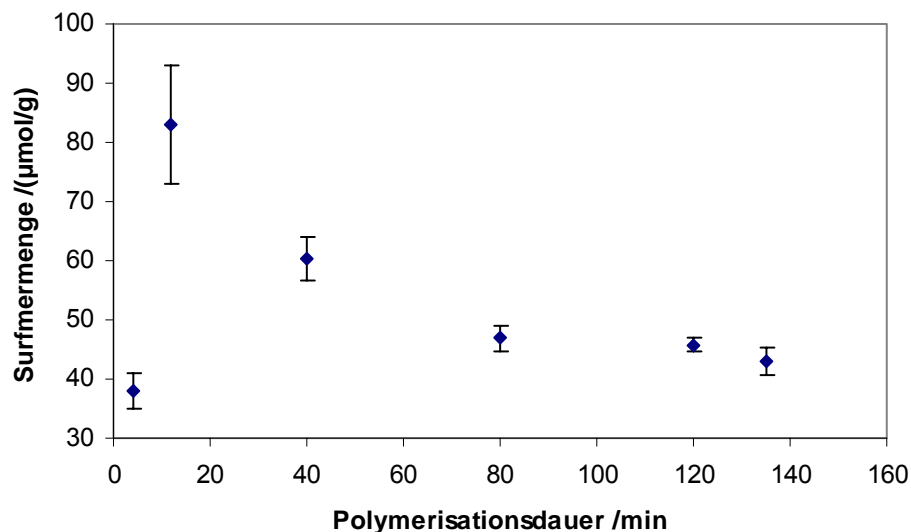


Abbildung 5-27 Zeitabhängigkeit der mit Polyelektrolyttitration bestimmten Surfmermenge einer Copolymerisation von 1,2 mol-% AUPDS mit MMA. Bei der Polyelektrolyttitration wird in erster Näherung nur der Surfmeranteil auf der Oberfläche der Partikel bestimmt.

Auch bei der zeitabhängigen Entwicklung der titrierbaren AUPDS-Menge zeigt sich der ebenfalls in drei Phasen einteilbare Verlauf: In der Nukleationsphase (0 Minuten bis 3 Minuten) wird auf der Oberfläche der Partikelkeime weniger AUPDS copolymerisiert, als in der darauf folgenden Wachstumsphase der Polymerisation. Dies lässt darauf schließen, dass in der ersten Phase der Polymerisation entweder eine homogene Nukleation stattfindet, bei der überwiegend MMA-Oligomere in der homogenen Phase der Emulsion gebildet werden. Oder, dass mizellare Nukleation stattfindet bei der ebenfalls weitgehend MMA homopolymerisiert wird.

Gegen Ende der Wachstumsphase nach 12 Minuten ist ein Großteil der AUPDS-Menge bereits copolymerisiert und die weitere Fortsetzung der Reaktion führt lediglich dazu, dass die letzten 10 % MMA auf der Oberfläche der Partikel einpolymerisiert werden. Dadurch sinkt der Anteil des titrierbaren AUPDS von 72 $\mu\text{mol/g}$ um 55 % auf ca. 40 $\mu\text{mol/g}$ bei Erreichen des vollständigen Umsatzes. Dies bedeutet, daß die Copolymerisation von MMA mit 1,2 mol-% AUPDS bereits nach 15 bis 20 Minuten beendet werden kann um die größtmögliche Oberflächendichte von Aktivester auf der Partikeloberfläche zu erhalten.

5.5.3.4 Kinetik der Copolymerisation von MMA mit MUPDS

Um den Einfluss der polymerisierbaren Gruppe des Surfmers auf die Kinetik der Emulsionspolymerisation zu untersuchen, wurde nach der Copolymerisation von AUPDS mit MMA die Copolymerisation von MUPDS ebenfalls mit MMA untersucht.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte genauso wie bei der Copolymerisation von AUPDS mit MMA (s. 5.5.3.3, S. 62 ff.) beschrieben, aber unter Verwendung von 172 mg (0,33 mmol) MUPDS. Während der Emulsionspolymerisation wurden in regelmäßigen Zeitabständen (s. Abbildung 5-28) Proben entnommen, deren Feststoffgehalt und Partikeldurchmesser (\bar{d}_{DLS}) bestimmt wurde.

Ergebnisse und Diskussion zur Copolymerisationskinetik von MMA und MUPDS

Die Zeitabhängigkeit des Umsatzes und der Partikelgröße sind in Abbildung 5-28 aufgetragen. Wie bei der Copolymerisation von MMA und 1,2 mol-% AUPDS (S. 77 ff.) findet sich ein in drei Abschnitte gegliederter Verlauf der Polymerisation: Von der Zugabe des Initiators bis zu einem Zeitpunkt von 1 bis 2 Minuten erfolgt die Nukleations-Phase, die folgerichtig durch einen Anstieg der Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit R_p (s. Abbildung 5-29) und ein Maximum der Partikelanzahl (s. Abbildung 5-30) gekennzeichnet ist.

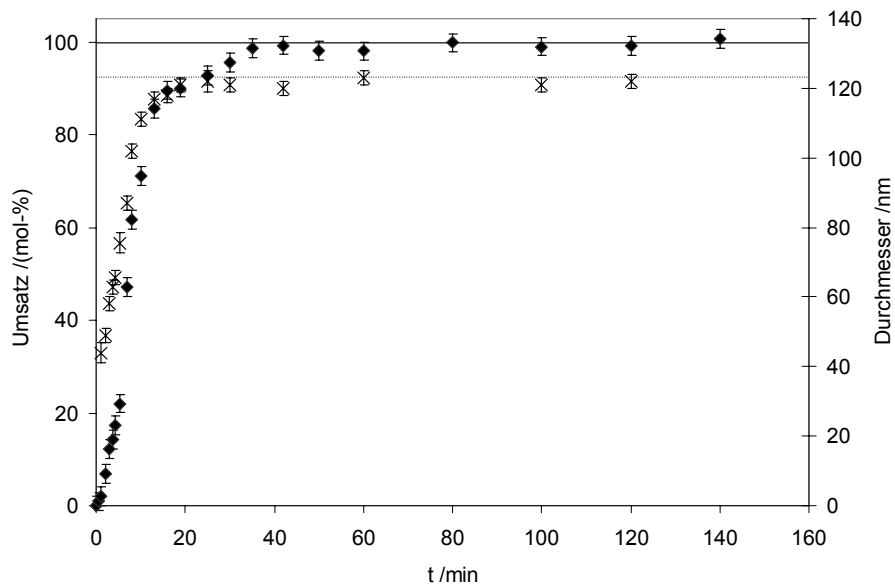


Abbildung 5-28 Zeitabhängigkeit von Umsatz (◆) und Partikelgröße $\bar{d}_{DL S}$ (x) bei der Copolymerisation von MMA und mit 1,2 mol-% MUPDS. Sowohl der vollständige Umsatz (—) als auch der Endwert der Partikelgröße (-----) ist im Diagramm eingezeichnet.

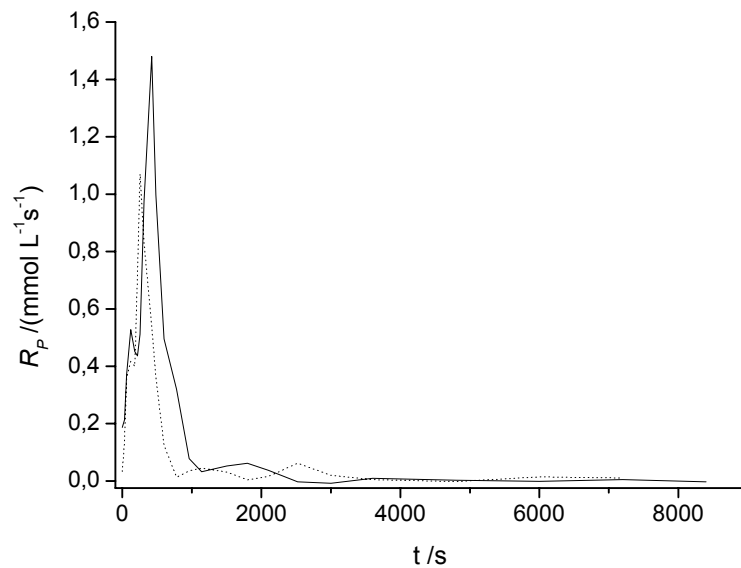


Abbildung 5-29 Zeitliche Änderung der Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit R_p für die Copolymerisation von MMA mit 1,2 mol-% MUPDS (—). Zum Vergleich sind die bereits in Abbildung 5-25 gezeigten Daten für 1,2 mol-% AUPDS (.....) dargestellt.

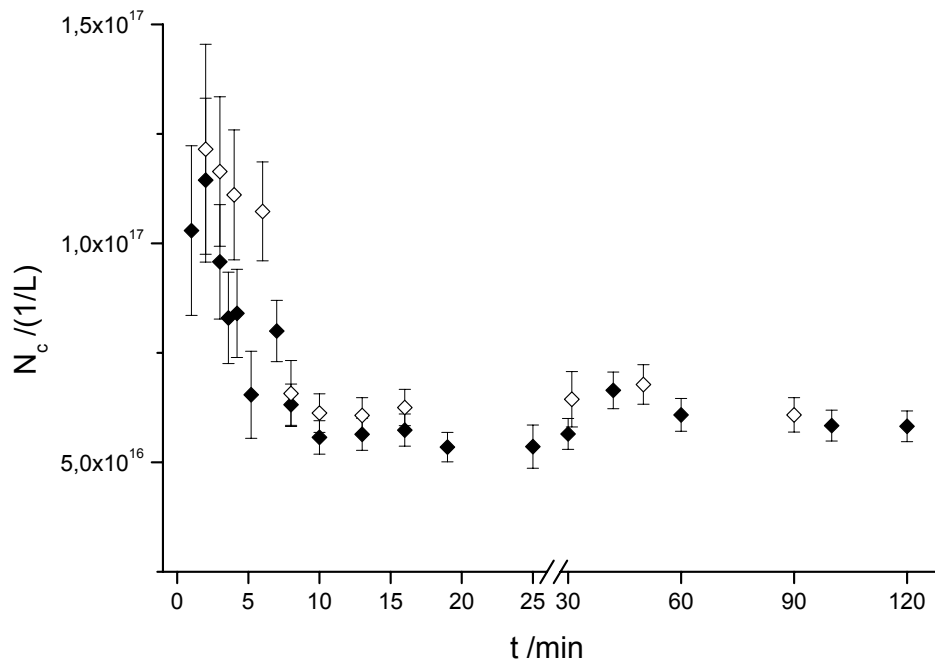


Abbildung 5-30 Zeitliche Änderung der Partikelanzahl (N_c) für die Copolymerisation von MMA mit 1,2 mol-% AUPDS (◇) und 1,2 mol-% MUPDS (◆).

Darauf folgt die Wachstumsphase, in der die gebildeten Partikel größer werden und R_p ein Maximum erreicht. Der Wert im Maximum ist mit $1,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ höher als bei der Verwendung von AUPDS als Surfmer ($1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ähnlich wie bei der Emulsionspolymerisation mit AUPDS sinkt während dieses Intervalls die Partikelanzahl von $10 \cdot 10^{16}$ auf einen Wert von $5 \cdot 10^{16}$.

Nach 12 bis 16 Minuten ist die Wachstumsphase beendet und die dritte Phase der Polymerisation setzt ein, bei der zum einen R_p kleiner wird und zum anderen Partikelgröße und Anzahl konstant bleiben.

Unter dem Aspekt der Copolymerisationskinetik mit MMA bei einem Surfmergehalt von 1,2 mol-% verhalten sich AUPDS und MUPDS nahezu gleich. Mit MUPDS wird lediglich während der Wachstumsphase eine höhere Brutto-Polymerisationsgeschwindigkeit erreicht.

5.5.3.5 Einfluss der Surfmer-Konzentration auf die Partikelgröße

Um zu untersuchen, in welchem Bereich der Durchmesser der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel beeinflusst werden kann, wurden Emulsionspolymerisationen mit 0,1 mol-% bis 10 mol-% AUPDS durchgeführt.

Bei der Emulsionspolymerisation mit nicht-polymerisierenden Tensiden wird ausserdem durch die SMITH-EWART-Theorie ein potentieller Zusammenhang zwischen der Partikelanzahl und der Tensidkonzentration beschrieben. Nach dieser Theorie für die mizellare

Nukleation ist die Partikelanzahl proportional zu $c_T^{\frac{3}{5}}$ (Gl. 19) ^[21,24,134,137]. Die Bestimmung der Partikelanzahl in Abhängigkeit der Surfmerkonzentration soll Aufschluss über das Nukleations-Verhalten während der Emulsionspolymerisation von AUPDS und MMA geben.

$$N_c = \left(\frac{k_d c_I}{K} \right)^{\frac{2}{5}} (a_s c_T)^{\frac{3}{5}} \quad (\text{Gl. 19})$$

k_d = Zerfallskonstante des Initiators /s⁻¹

c_I = Initiatorkonzentration / L⁻¹

K = Wachstumsgeschwindigkeit eines Partikels /(m³ s⁻¹)

a_s = Flächenbedarf eines Tensidmoleküls /m²

c_T = Anzahl der Tensidmoleküle pro Volumen /L⁻¹

Um den Einfluss der Art des Comonomers auf den Partikeldurchmesser zu ermitteln, wurden ausserdem Emulsionspolymerisationen mit AUPDS und Styren durchgeführt.

Die Analyse des Molekulargewichts der Polymere mit Gelpermeationschromatographie (GPC) war nicht möglich da die hergestellten p(MMA-co-AUPDS)-Proben in Aceton, Tetrahydrofuran oder anderen gebräuchlichen Lösemitteln unlöslich waren. Auch die Hydrolyse der Aktivester mit Cäsiumhydroxid und die anschließende Methylierung der Cäsiumcarboxylate mit Methyljodid^[138] scheiterte an der zu geringen Löslichkeit der Polymere in Aceton oder N,N'-Dimethylformamid.

Durchführung

Die Durchführung der Emulsionspolymerisation erfolgte nach der in Abschnitt 5.5.3.1 (S. 69ff.) beschriebenen Technik mit 10 mg AIBA für 34 mL Emulsion. Die eingesetzten AUPDS-Konzentrationen und die Bezeichnungen der Proben sind in Tabelle 5-10 aufgeführt. Durch Trocknen von Aliquoten der gereinigten Latices wurde der Feststoffgehalt der einzelnen Proben bestimmt. Die Partikelgröße der Polymerisate wurde

mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt und durch Einsetzen dieser Werte in (Gl. 18) konnte die Partikelanzahl N_c berechnet werden^[134].

Tabelle 5-10: AUPDS-Konzentrationen, Partikeldurchmesser \bar{d}_{DLS} und berechnete Partikelanzahlen N_c für die Emulsionspolymerisationen PA 0 bis PA 12.

Probe	C_{AUPDS}	100*	\bar{d}_{DLS}	N_c
	$/(mmol L^{-1})$	C_{AUPDS}/C_{MMA} /%	/nm	$/(L^{-1})$
PA 0	0	----	601 ± 30	$(3,6 \pm 0,7) \cdot 10^{14}$
PA 1	0,5	0,1	161 ± 4	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{16}$
PA 2	1,5	0,3	167 ± 5	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{16}$
PA 3	2,1	0,56	152 ± 4	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{16}$
PA 4	2,5	0,5	156 ± 4	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{16}$
PA 5	4,0	0,8	142 ± 3	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{16}$
PA 6	5,0	1	132 ± 5	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^{16}$
PA 7	7,5	1,5	123 ± 4	$(4,5 \pm 0,5) \cdot 10^{16}$
PA 8	10,0	2	120 ± 3	$(5,0 \pm 0,5) \cdot 10^{16}$
PA 9	15,0	3	116 ± 4	$(5,8 \pm 0,7) \cdot 10^{16}$
PA 10	25,0	5	113 ± 3	$(6,8 \pm 0,7) \cdot 10^{16}$
PA 11	40,0	8,0	110 ± 3	$(8,2 \pm 0,8) \cdot 10^{16}$
PA 12	49,9	10	109 ± 4	$(9,1 \pm 1,2) \cdot 10^{16}$

Ergebnisse

Die Auftragung des Partikeldurchmessers gegen C_{AUPDS}/C_{MMA} zeigt, dass der Durchmesser der Polymerpartikel mit steigender AUPDS-Konzentration abnimmt (Abbildung 5-31). Von einer eingesetzten Konzentration von 0 % AUPDS bis zur CMC dieses Surfmers findet man eine steilere Abnahme des Durchmessers als im Konzentrationsbereich oberhalb dieses Wertes. Der CMC_{AUPDS} ($6,0 mmol L^{-1}$, s. S. 48ff.) entspricht ein C_{AUPDS}/C_{MMA} -Verhältnis von 1,2 % bei den geschilderten Versuchsbedingungen.

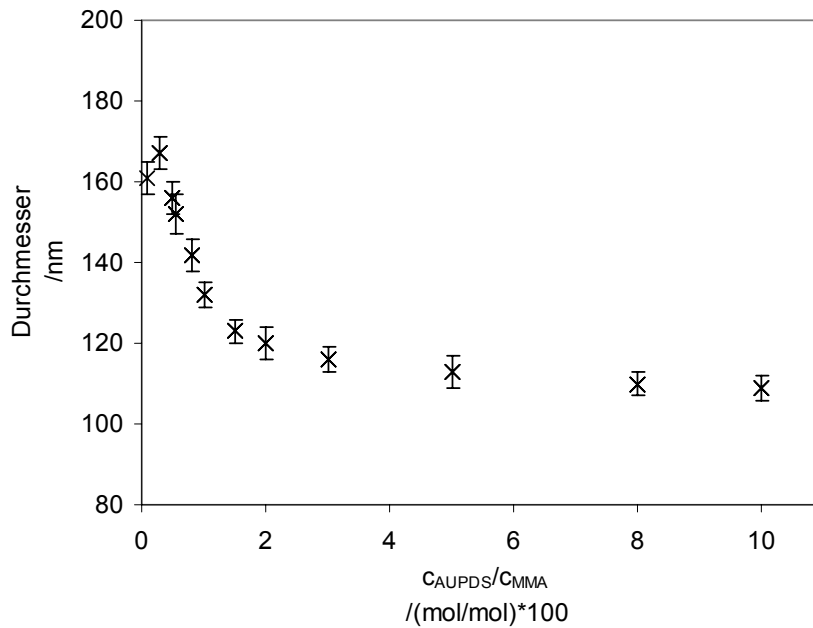


Abbildung 5-31 Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser \bar{d}_{DLS} der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel aufgetragen gegen das Surfmter/Comonomer-Verhältnis $c_{\text{AUPDS}}/c_{\text{MMA}}$. Die Partikel wurden durch AIBA initiierte Emulsionspolymerisation bei 60°C hergestellt.

Um das Polymerisationsverhalten besser beurteilen zu können, wurde ausserdem die Partikelanzahl N_c gegen die AUPDS-Konzentration aufgetragen (s. Abbildung 5-32). Das Ergebnis ist hier ein durch die $\text{CMC}_{\text{AUPDS}}$ zweigeteilter Verlauf.

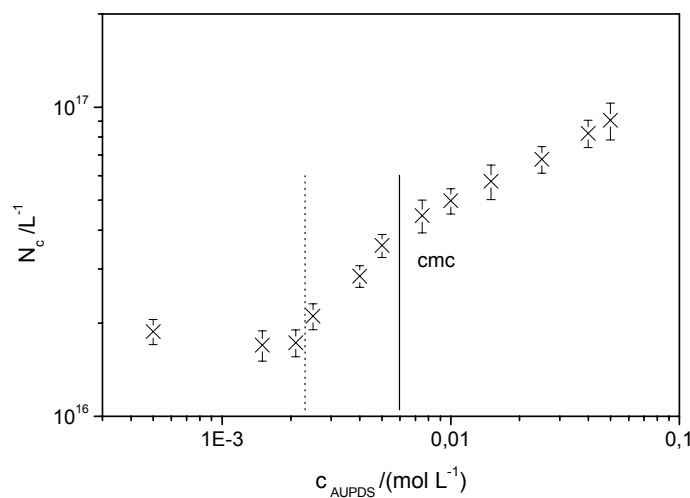


Abbildung 5-32 Partikelanzahl N_c der durch Emulsionspolymerisation mit AIBA hergestellten p(MMA-co-AUPDS)-Partikel. Die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von AUPDS und der Bereich mit konstanter Partikelanzahl sind markiert.

Unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration bleibt die Partikelanzahl bis zu einer AUPDS-Konzentration von $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ konstant. Zwischen dieser Konzentration und der $\text{CMC}_{\text{AUPDS}}$ steigt die Partikelanzahl N_c mit größer werdender Surfmerkonzentration. Oberhalb der $\text{CMC}_{\text{AUPDS}}$ steigt die Partikelanzahl weiter an, die Steigung der logarithmischen Funktion ist aber kleiner als unterhalb der Mizellbildungskonzentration von AUPDS.

Nach der SMITH-EWART-Theorie sollte sich die mathematische Abhängigkeit der Partikelanzahl von der Tensidkonzentration oberhalb der CMC durch eine Funktion der Form $N = K \cdot c_{\text{AUPDS}}^{\frac{3}{5}}$ darstellen (s. (Gl. 19)). Um diese Vorhersage zu überprüfen, wurde durch die berechneten Werte der Partikelanzahl eine Funktion der Form $N = K \cdot c_{\text{AUPDS}}^J$ gelegt (s. Abbildung 5-33 und Abbildung 5-34). Der Wert für J wurde durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt. Unterhalb einer c_{AUPDS} von 10 mmol L^{-1} besitzt J einen Wert von $0,63 \pm 0,05$ ($R^2=0,9812$) und oberhalb von 10 mmol L^{-1} ergibt sich ein Wert von $J = 0,38 \pm 0,01$ ($R^2=0,9977$).

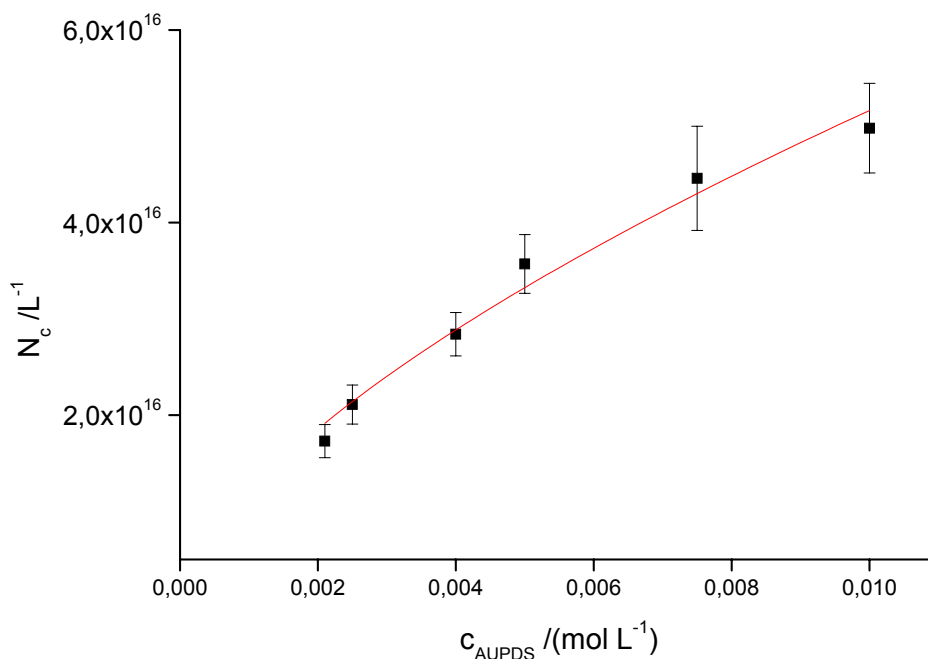


Abbildung 5-33 Potentieller Fit der Partikelanzahlen aus Abbildung 5-32 für $c_{\text{AUPDS}} \leq 10 \text{ mmol L}^{-1}$. Für die Ausgleichsfunktion ergibt sich $N_c = (9,6 \pm 2,3) \cdot c_{\text{AUPDS}}^{(0,63 \pm 0,05)}$ ($R^2=0,9812$).

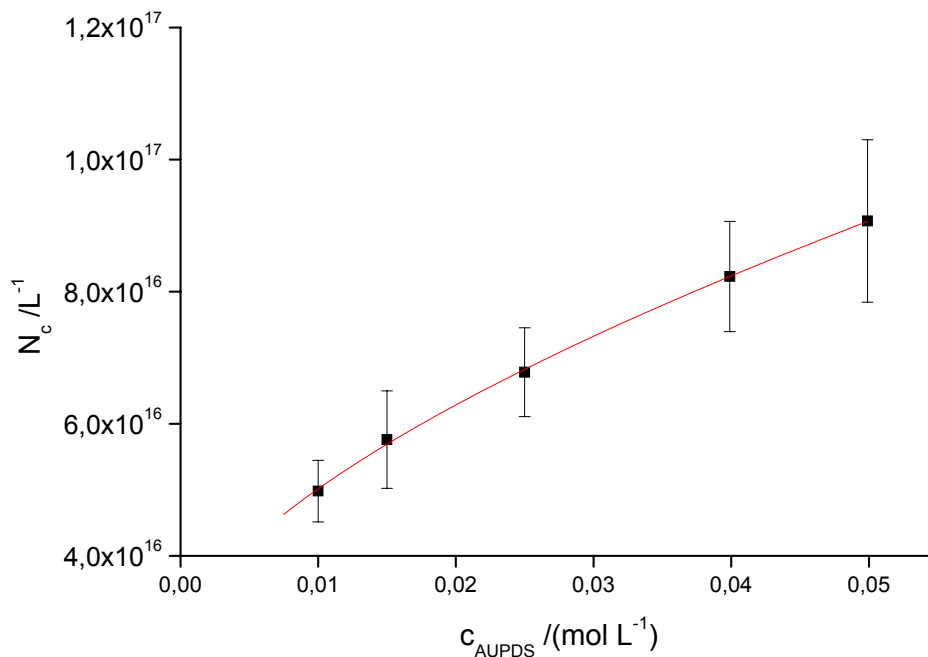


Abbildung 5-34 Potentieller Fit der Partikelanzahlen aus Abbildung 5-32 für $c_{\text{AUPDS}} \geq 10$ mmol L^{-1} . Für die Ausgleichsfunktion ergibt sich $N_c = (2,8 \pm 1,3) \cdot c_{\text{AUPDS}}^{(0,38 \pm 0,01)}$ ($R^2=0,997$).

Diskussion der Ergebnisse zur Beziehung von Partikelgröße und Surfmerkonzentration

Der Verlauf der Partikelanzahl gegenüber der c_{AUPDS} lässt sich mit den unterschiedlichen Partikel-Nukleationsmodellen^[134,139,140] unter- und oberhalb der CMC erklären. Liegt die Surfmerkonzentration unterhalb der CMC, so kann die Nukleation eines Partikels nur in der homogenen wässrigen Phase der Emulsion stattfinden. Ein Anstieg der AUPDS-Konzentration führt in diesem Konzentrationsbereich zur gesteigerten Bildung von elektrostatisch abgeschirmten Nukleationskeimen. Durch Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen (s. 5.5.3.3) im System p(MMA-co-AUPDS) konnte außerdem das Auftreten von Sekundärnukleation ausgeschlossen werden. Der Anstieg von N_c unterhalb der CMC wird demnach auf die steigende Anzahl von Nukleationskeimen zurückgeführt.

Bei der Emulsionspolymerisation oberhalb der CMC kommt es verstärkt zur Nukleation der Partikel in Mizellen^[135,141-143]. Dabei wird nach diesem Modell ein größerer Anteil des Surfmers im Kern der Polymerpartikel eingebettet als bei der homogenen Nukleation und es kommt zu einer verstärkten Bildung von Surfmer-Homopolymer. Die Partikelanzahl steigt deshalb im Bereich oberhalb der $\text{CMC}_{\text{AUPDS}}$ langsamer mit c_{AUPDS} an als unterhalb dieser Grenze.

Nach der SMITH-EWART-Theorie muss der Exponent J der Ausgleichskurve mit der Form $N = K \cdot c_{AUPDS}^J$ einen Wert von $\frac{3}{5} = 0,6$ annehmen. Der Exponent besitzt unterhalb einer c_{AUPDS} von 10 mmol L^{-1} einen Wert von $0,63$ und oberhalb dieser Grenze (dem Gültigkeitsbereich der SMITH-EWART-Theorie) einen Wert von $0,38$. Die Änderung der Ausgleichskurven-Steigung fällt damit nahezu mit der CMC_{AUPDS} zusammen. Die Partikelanzahl steigt nach diesem Ergebnis oberhalb der CMC_{AUPDS} langsamer mit steigender Surfmerkonzentration, als aufgrund der Theorie erwartet.

Der Grund für diese Abweichung könnte die bei $c_{AUPDS} \geq CMC_{AUPDS}$ beobachtete Agglomeration der Nukleationskeime (s. Abbildung 5-26) sein, da dieses Phänomen nicht von der SMITH-EWART-Theorie berücksichtigt wird.

Der Wert für J unterhalb der CMC lässt sich nach den in der zur Verfügung stehenden Literatur nicht abschließend beurteilen. Es sind bereits J -Werte im Bereich von $0,3$ bis 1 für unterschiedliche Surfmer-Copolymere ermittelt worden^[144]. ASUA et al.^[144] finden für die Emulsionspolymerisation von MMA und einem anionischen Maleat-Surfmer einen Wert von $J = 0,46$. GUILAUME et al.^[145] finden für ein Acrylamid-Surfmer / Styren / Butylacrylat-System einen Wert von $J = 1$. Für eine noch umfassendere Beurteilung der Veränderung des Nukleationsverhaltens, wären zum Beispiel vergleichende Polymerisationen mit *p*-(11(Propylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfoniummethylsulfat notwendig, weil dadurch der Einfluß der Surfmer-Copolymerisation während der Nukleation von der reinen Tensid-Wirkung des Surfmers getrennt betrachtet werden könnte.

Warum die beiden Polymerisationen mit einer $c_{AUPDS} \leq 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Partikel mit nicht signifikant unterscheidbaren Durchmessern liefern, konnte nicht eindeutig erklärt werden. Eventuell werden bei diesen kleinsten verwendeten Konzentrationen zuerst die Monomertröpfchen stabilisiert, bevor dann bei höheren Surfmer-Konzentrationen das Surfmer in die kohärente Phase übergeht.

5.5.3.6 Bestimmung der ionischen Gruppen auf der Oberfläche von *p*(MMA-co-AUPDS)-Partikeln

Alle in dieser Arbeit beschriebenen *p*(MMA-co-AUPDS) und mit Mikroelektrophorese analysierten Nanopartikel besitzen ein positives ζ -Potential. Die Ursache dieses Potentials müssen positive Ladungen sein, die auf der Partikeloberfläche fixiert sind. Zunächst soll erörtert werden, welche funktionellen Gruppen überhaupt auf der Partikeloberfläche vorkommen können. Zunächst sind dies die Seitengruppen der Polymerketten, im Fall von *p*(MMA-co-AUPDS) also Methoxy-, Methyl-, und [(Undecanoyloxy)-phenyl]-dimethylsulfonium-Gruppen. Ausserdem finden sich als Endgruppen der

Ketten die Reste des verwendeten Initiators. Im Fall des verwendeten AIBA sind dies 2,2-Dimethylethan-Amidinium-Gruppen.

Von diesen Gruppen besitzen die [(Undecanoyloxy)-phenyl]dimethylsulfonium-Gruppe (im weiteren Text als Sulfonium-Gruppe bezeichnet) und die Amidinium-Funktion eine positive Ladung. Das positive ζ -Potential der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel kann daher von den positiven Ladungen beider Gruppen verursacht werden. Die Messung des Oberflächenpotentials ermöglicht also keine getrennte Bestimmung beider Funktionen auf der Oberfläche.

Um die Menge der Sulfonium-Gruppen auf der Oberfläche zu bestimmen, wird ausgenutzt, dass der aktivierte Dimethylsulfoniumphenoxy-Ester basenkatalysiert bei Raumtemperatur hydrolysiert werden kann^[18]. Die entstandene Carbonsäure lässt sich durch Deprotonierung in eine negativ geladene Carboxylat-Funktion überführen. Wird die Deprotonierung bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt, sind die Amidinium-Gruppen weiterhin positiv geladen ($pK_{s, \text{Amidinium-Gruppen}} = 11-12,5$ ^[146,147]). Die positiv geladenen Sulfonium-Gruppen werden so durch eine negative Gruppe ersetzt.

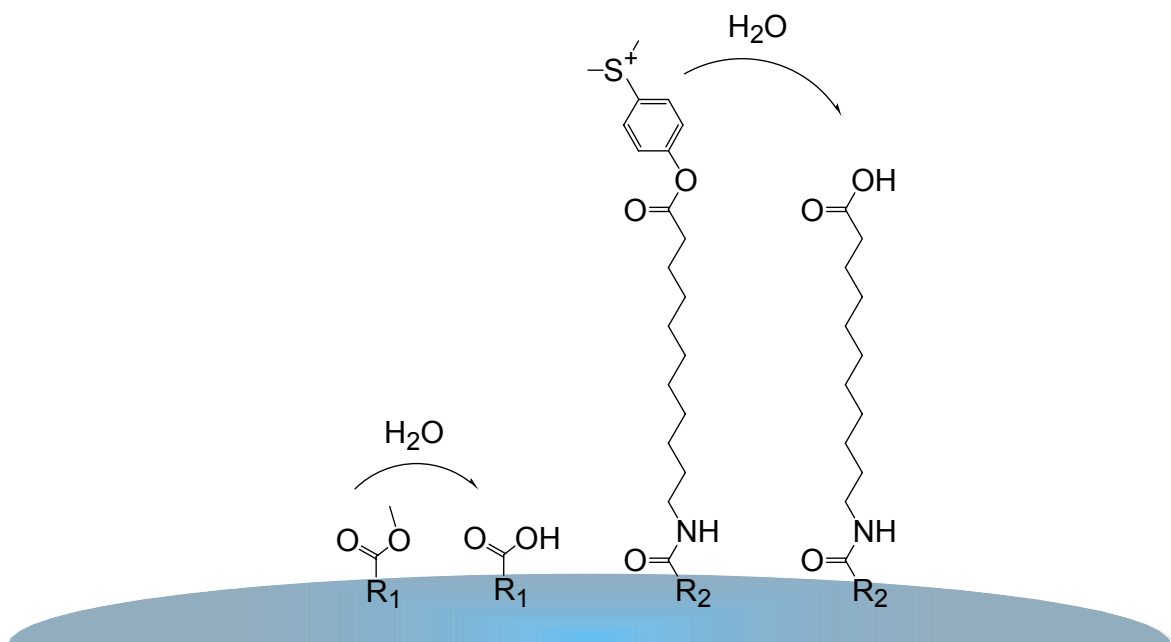


Abbildung 5-35 Methyl- und Aktivester auf der Oberfläche von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln. Beide Carbonsäureester können durch Hydroxid-Ionen katalytisch hydrolysiert werden.

Zur Bestimmung der Oberflächenladung der Partikel vor und nach der Hydrolyse wurde die Methode der Polyelektrolyttitration eingesetzt. Dabei werden Ladungen auf Oberflächen mit gegensätzlich geladenen Polyelektrolyten titriert. Die Endpunktsbestim-

mung des verwendeten Systems erfolgte über die Messung des Strömungspotentials der Partikel.

Mittels Elementaranalyse wurde ausserdem die gesamte in den Partikeln enthaltene Surfmermenge bestimmt.

Durchführung

Durch Emulsionspolymerisation (Bedingungen s. 5.5.3.1) wurden p(MMA-co-AUPDS)-Partikel hergestellt. Je 5 mL der gereinigten Latices wurde in 10 mL Phosphatpuffer (pH 8; $c_{\text{Phosphat}} = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Polymerpartikel wurden dann durch dreimaliges Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Redispergieren in Wasser gereinigt. Anschließend wurde gravimetrisch der Feststoffgehalt bestimmt.

Die Polyelektrolyttitration der Partikel mit unhydrolysiertes Aktivester-Gruppe wurde mit 300 μL Latex in 15 mL Phosphatpuffer (pH 7,0; $c_{\text{Phosphat}} = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) und einer PDADMAC-Lösung ($c = 1,1 \text{ mmol L}^{-1}$) als Titrant durchgeführt. Die Vergleichsmessungen mit den der Hydrolyse unterworfenen Partikeln wurden mit Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,5 ($c_{\text{Phosphat}} = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) mit einer PES-Lösung ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) durchgeführt.

Die Titration der emulgatorfrei hergestellten Partikel **PA 0** wurde in Acetatpuffer ($c = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) durchgeführt.

Ergänzend wurde das ζ -Potential der Partikel in den zu titrierenden Lösungen gemessen.

Die gereinigten Latices wurden direkt nach der Herstellung gefriergetrocknet. Der Gehalt an copolymerisiertem AUPDS wurde mit Elementaranalyse durch Bestimmung des Schwefelgehalts und $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie erhalten.

Ergebnisse und Diskussion zur Oberflächenstruktur der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel

Die Ergebnisse der Polyelektrolyttitrationen der Proben **PA 0**, **PA 8** und **PA 9** (s. Tabelle 5-11) zeigen, dass mit zunehmender AUPDS-Konzentration in der Eduktmischung der Emulsionspolymerisation mehr positive Ladungen auf den Partikeloberflächen copolymerisiert werden. Bei einem Einsatz von 1 mol-% AUPDS bei der Copolymerisation konnten $(48 \pm 4) \mu\text{eq}$ positiver Ladung pro Gramm Polymer bestimmt werden. Dieser Wert steigt auf $(95 \pm 8) \mu\text{eq/g}$ wenn 3 mol-% AUPDS eingesetzt werden. Ausserdem zeigt der Vergleich der Ladungsmenge, dass sich nach Hydrolyse der Partikel mindestens genauso viele negative Ladungen auf den Partikeln befinden, wie vor der Hydrolyse positive Ladungen anwesend waren.

Tabelle 5-11 Ergebnisse der Polyelektrolyttitration von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln mit nicht hydrolysiertes und hydrolysiertes Aktivester-Funktion.

Probe (mol-% AUPDS in der Eduktmischung)	Ladungsmenge, kationisch vor Hydrolyse /($\mu\text{eq/g}$)	Ladungsmenge, anionisch nach Hydrolyse /($\mu\text{eq/g}$)
PA 0 (0 %)	3 \pm 1,5	24 \pm 3
PA 6 (1 %)	48 \pm 4	67 \pm 5
PA 8 (2 %)	71 \pm 5	80 \pm 17
PA 9 (3 %)	95 \pm 8	121 \pm 12

Die Menge an positiven Ladungen auf den Partikeln muss zum Großteil von den Sulfonium-Gruppen des AUPDS stammen, da die Ergebnisse der Titration des emulgatorfrei hergestellten Blindwerts zeigen, dass bei **PA 0** lediglich $(3 \pm 1,5) \mu\text{eq g}^{-1}$ positive Ladungen bestimmbar waren.

Die Titration der über Nacht bei pH 8 behandelten Probe **PA 0** ergab, dass sich auf der Oberfläche der AUPDS-frei hergestellten Partikel $(24 \pm 3) \mu\text{eq}$ negative Ladungen befinden. Dieser Blindwert wurde z.B. auf hydrolysierte Estergruppen des Methylmethacrylats zurückgeführt. Allerdings ist die Menge an Anionen, die auf den mit AUPDS hergestellten Partikeln gebunden ist, fast um den Faktor 3 größer als die Ladungsmenge auf den hydrolysierten Partikeln der emulgatorfreien Polymerisation **PA 0**.

Die Ergebnisse der Titrations lassen sich zusammengefasst mit folgendem Modell beschreiben: Auf der Partikeloberfläche eines unter Verwendung von AUPDS, MMA und AIBA hergestellten Partikels befinden sich positiv geladene Sulfonium-Gruppen, ein geringer Anteil Amidinium-Funktionen aus Initiator-Endgruppen und hydrolysierte oder nicht hydrolysierte Methacrylsäureester. Wenn 1 mol-% AUPDS und 99 mol-% MMA bei der Emulsionspolymerisation eingesetzt wurde, ist die titrierbare Ladungsmenge der Kationen mindestens zu 90 % auf die Anwesenheit von Sulfonium-Ionen zurückzuführen. Diese Aussage konnte durch Bestimmung der Amidinium-Ladungsmenge auf Emulgatorfrei hergestellten pMMA-Partikeln gewonnen werden.

Berechnung der Oberflächenladungsdichte

Aus den zusammengeführten Ergebnissen der Polyelektrolyttitration und der dynamischen Lichtstreuung kann die Ladungsmenge pro Flächeneinheit der Partikel berechnet werden. Dazu wird die Oberfläche der Partikel aus dem mittleren hydrodynamischen Durchmesser und dem Feststoffgehalt der Latices ermittelt.

Die Fläche auf den Partikeln ist dabei durch einfache geometrische Berechnungen zugänglich. Die Oberfläche von n gleich großen kugelförmigen Partikeln lässt sich mit (Gl. 20) berechnen. Wird die Partikelanzahl n durch (Gl. 21) berechnet, so gelangt man unter Verwendung der Partikeldichte δ (Gl. 22) zur (Gl. 23) für die Partikeloberfläche O . Der in dieser Gleichung einzusetzende Partikelradius r ergibt sich aus der Hälfte des Durchmessers \bar{d}_{DLS} der dynamischen Lichtstreuung.

$$O = n \cdot 4\pi \cdot r^2 \quad (\text{Gl. 20})$$

O = Oberfläche von n Partikeln $/(m^2 g^{-1})$

n = Partikelanzahl (g^{-1})

r = Partikelradius $/m$

$$n = \frac{V \cdot 3}{4 \cdot \pi \cdot r^3} \quad (\text{Gl. 21})$$

V = Volumen der Partikel $/(m^3 g^{-1})$

$$\delta = \frac{m}{V} \quad (\text{Gl. 22})$$

δ = Dichte der Partikel $/(g mL^{-1})$

m = Masse der Partikel $/g$

$$O = \frac{m \cdot 3}{\delta \cdot r} \quad (\text{Gl. 23})$$

Die berechneten Oberflächengrößen und Oberflächenladungsdichten sind in Tabelle 5-12 aufgeführt. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass die AUPDS-haltigen Partikel Oberflächen zwischen $35,5 m^2 g^{-1}$ und $40,4 m^2 g^{-1}$ besitzen. Werden die Ladungsmengen der positiven Sulfonium-Gruppen für die Berechnung der Oberflächenladungsdichte zugrundegelegt, ergeben sich für die mit 1 % bis 3 % AUPDS hergestellten Partikel Oberflächenladungsdichten zwischen $0,8 \cdot 10^{18}$ und $2,4 \cdot 10^{18}$ Ladungen pro m^2 .

Tabelle 5-12 Oberflächengröße und Oberflächenladungsdichten der Polymerpartikel aus PA 0, PA 6, PA 8 und PA 9. Als Ladungsmenge wurde die Menge an positiven Ladungen eingesetzt, die mit Polyelektrolyttitration bestimmt wurde.

Probe	Radius	Ladungen pro Masse	Oberfläche	Ladungen pro Fläche	Fläche pro Ladung	Belegung der Fläche
	/nm	/($\mu\text{eq g}^{-1}$)	/($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	/(m^{-2})	/(nm^2)	/(%)
PA 0	350	3	6,7	$3,3 \cdot 10^{17}$	3,3	5 ¹
PA 6	66	48	35,5	$8,1 \cdot 10^{17}$	1,24	29 ²
PA 8	60	71	39,1	$1,2 \cdot 10^{18}$	0,92	39 ²
PA 9	58	95	40,4	$2,4 \cdot 10^{18}$	0,70	51 ²

¹ Berechnet mit einem Flächenbedarf von $0,43 \cdot 0,43 \text{ nm} = 0,18 \text{ nm}^2$ für eine Amidinium-Grundfläche

² Berechnet mit einem Flächenbedarf von $0,6 \cdot 0,6 \text{ nm} = 0,36 \text{ nm}^2$ für die AUPDS- Grundfläche

Die Kalkulation des Kehrwerts der Oberflächenladungsdichte führt zu der Fläche, die einer ladungstragenden Gruppe zur Verfügung steht. Für die Sulfonium-Gruppen auf der Partikeloberfläche ergeben sich mit steigendem AUPDS-Gehalt Werte von $1,24 \text{ nm}^2$ bis $0,7 \text{ nm}^2$. Durch Addition der Bindungslängen wurde für die AUPDS-Funktion eine Grundfläche von $0,6 \text{ nm} \cdot 0,6 \text{ nm}$ berechnet (s. Abbildung 5-36). Dieser Wert dient als Minimalwert des AUPDS-Flächenbedarfs. Wenn dieser Minimalwert den Berechnungen für die Oberflächenbelegung zugrunde gelegt wird, ergibt sich das Bild, dass 29 % bis 51-% der Partikeloberfläche von den Surfmer-Resten eingenommen wird.

Im Vergleich dazu beträgt die Oberflächenbelegung der tensidfrei hergestellten Partikel **PA 0** mit Initiator-Endgruppen lediglich 5 %. Dabei wurde für die Fläche einer Amidinium-Funktion anhand geometrischer Abschätzungen ein Wert von $0,18 \text{ nm}^2$ zugrundegelegt.

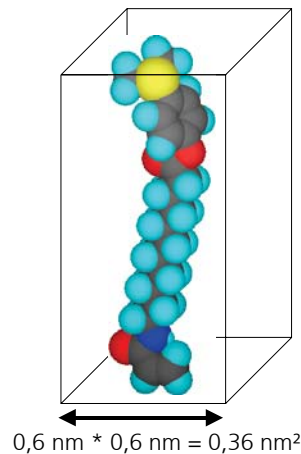


Abbildung 5-36 Geometrisches Modell zur Berechnung des AUPDS-Flächenbedarfs auf der Partikeloberfläche. Die Ausdehnung des Moleküls wurde anhand der Bindungslängen und Kovalenzradien abgeschätzt.

Der Vergleich der berechneten Oberflächenladungsdichten zeigt zweierlei: Einerseits ist die Oberflächenladungsdichte der mit AUPDS hergestellten Partikel 6- bis 10-mal größer als die des Blindwerts, der lediglich durch die Amidinium-Reste des Initiators (AIBA) stabilisiert wird. Andererseits ist der mit Polyelektrolyttitration bestimmte Anstieg des Aktivester-Gehalts bei erhöhtem AUPDS-Einsatz in der Emulsionspolymerisation nicht alleine auf eine vergrößerte Oberfläche der Copolymere zurückzuführen, parallel zur Vergrößerung der Partikeloberfläche steigt auch die Belegung der Partikeloberfläche mit Sulfonium-Gruppen von ca. 30 % auf 50 % an.

Der aus dem geometrischen Platzbedarf des AUPDS abgeschätzten Oberflächenbelegung der Partikel stehen die Ergebnisse des tensiometrisch bestimmten Adsorptionsparameter a_s gegenüber. An der Luft/Wasser-Grenzfläche stehen einem AUPDS-Molekül 1,42 nm² zur Verfügung (s. Tabelle 5-4, S. 48). Verglichen mit diesem Wert wären die Sulfonium-Gruppen auf der Oberfläche von **PA 6**, **PA 8** und **PA 9** dichter gepackt als an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Für einen genauen Vergleich der AUPDS-Packungsdichte an der fest/flüssig-Grenzfläche der Partikel und der Luft/Wasser-Grenzfläche müsste a_s in Abhängigkeit der Temperatur gemessen werden, da die Emulsionspolymerisation bei 60 °C stattfindet, die Adsorptionsparameter aber bei Raumtemperatur gemessen wurden. Da die Oberflächenspannung mit ansteigender Temperatur linear abnimmt^[148], steigt a_s gleichzeitig an (s. Gl. 8 u. Gl. 9, S.27). Damit sind die für Raumtemperatur geltenden Werte für a_s Mindestwerte.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Partikel eine sogenannte „behaarte“ Struktur besitzen und sich Surfmermoleküle nicht nur auf einer Fläche, sondern auch in den Raum

um die Partikel ausdehnen. Solch eine Struktur wird beispielsweise von DE LAS NIEVES für die Copolymerisation von Styren und Natrium-Styren sulfonat gefunden^[149].

Um die Struktur der Partikeloberfläche detaillierter zu beschreiben, wären noch weitere Untersuchungen (z.B. Röntgenkleinwinkelstreuung) erforderlich.

Vergleich der Polyelektrolyttitrations-Ergebnisse mit den Daten der Elementaranalyse

Um die gesamte in den p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln enthaltene Surfmermenge zu bestimmen, wurde der Schwefelgehalt der Proben **PA 1**, **PA 6** und **PA 8** bis **PA 11** durch Elementaranalyse ermittelt. Da zwischen dem Schwefelgehalt der Partikel und der Surfmer-Molalität ein linearer Zusammenhang besteht, kann aus den Ergebnissen der Elementaranalyse die AUPDS-Molalität b_{AUPDS} berechnet werden.

Um quantitativ zwischen der Gesamtmenge des copolymerisierten AUPDS und der Menge der titrierbaren Aktivester-Gruppen auf der Partikeloberfläche zu unterscheiden, wurden zusätzlich die Daten der Polyelektrolyttitration in Tabelle 5-13 zusammengefasst.

Tabelle 5-13 Mit Polyelektrolyttitration und Elementaranalyse bestimmte AUPDS-Wiederfindungsraten der hergestellten p(MMA-co-AUPDS)-Polymerpartikel. Mit c_{AUPDS} sind die AUPDS-Konzentrationen zu Beginn der Emulsionspolymerisation angegeben.

Probe	c_{AUPDS} /mol-%	WFR _{AUPDS}	WFR _{AUPDS}
		Polyelektrolyt- Titration /(%)	Elementaranalyse /(%)
PA 0	0	-- ¹	n.b.
PA 1	0,1	62 ± 30	86 ± 32
PA 6	1	51 ± 5	49 ± 2
PA 8	2	40 ± 4	68 ± 2
PA 9	3	38 ± 8	70 ± 1
PA 10	5	36 ± 3	73 ± 2
PA 11	8		82 ± 6

¹ Partikel mit negativem ζ -Potential. Keine positiven Ladungen titrierbar.

Um die Ergebnisse der Elementaranalyse graphisch zu vergleichen, wurde in Abbildung 5-37 die berechnete AUPDS-Molalität (b_{AUPDS}) der Partikel gegen die maximal mögliche Molalität ($b_{\text{AUPDS max}}$) aufgetragen. Dabei entspricht $b_{\text{AUPDS max}}$ der AUPDS-Molalität bei 100-%iger Copolymerisation des AUPDS mit dem MMA. Anhand dieser Auftragung zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen $b_{\text{AUPDS max}}$ und b_{AUPDS} . Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden ergibt sich eine mittlere Wiederfindungsrate für AUPDS von (75 ± 5) mol-%.

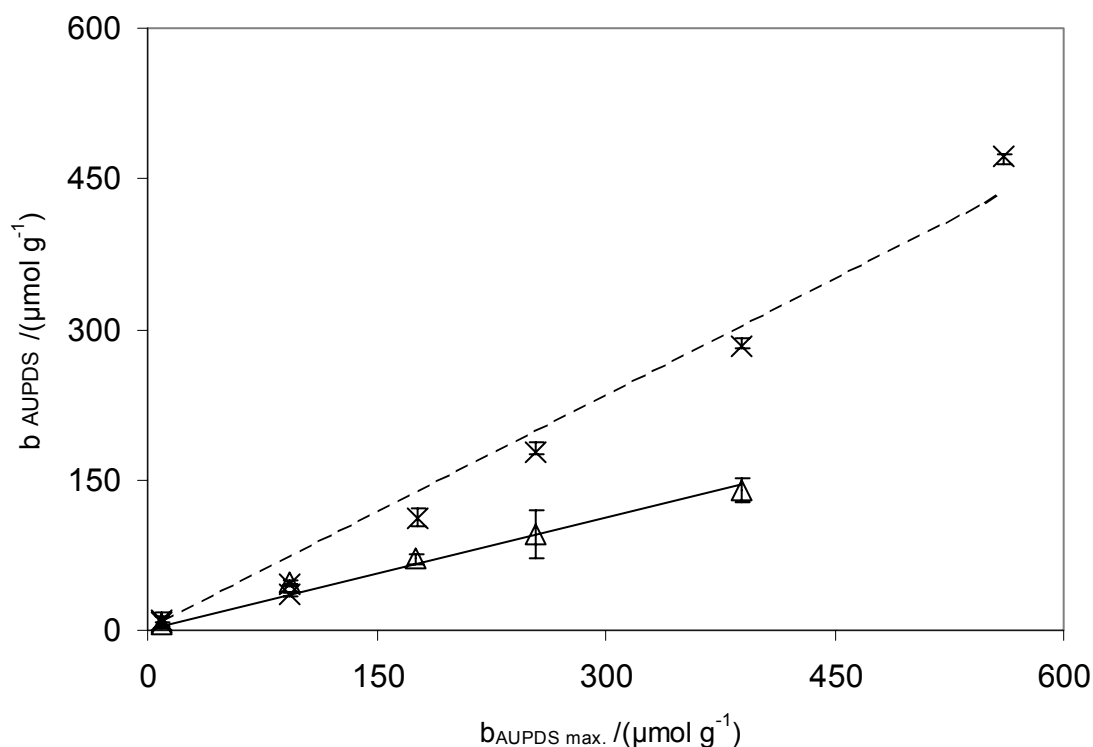


Abbildung 5-37 Mit Elementaranalyse (x) und Polyelektrolyttitration (Δ) bestimmte AUPDS-Molalität (b_{AUPDS}) der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel, aufgetragen gegen die maximal erreichbare AUPDS-Molalität ($b_{\text{AUPDS max}}$). Für die Ausgleichsgeraden-Steigungen ergeben sich $0,75 \pm 0,05$ mit $R^2 = 0,9926$ (- - -) und $0,37 \pm 0,03$ mit $R^2 = 0,9949$ (—). Die Probenzuordnung ist in Tabelle 5-13 aufgeführt.

Die aus der Ausgleichsgeraden-Steigung berechnete mittlere Wiederfindungsrate von AUPDS beträgt bei den Ergebnissen der Polyelektrolyttitration (37 ± 3) mol-%. Dieser Wert ist kleiner als die elementaranalytisch bestimmte Wiederfindungsrate von 75 mol-%. Der $b_{\text{AUPDS max}}$ -abhängige Verlauf der AUPDS-Molalität zeigt ausserdem, dass sich bei den Proben **PA 1** und **PA 6** das gesamte copolymerisierte AUPDS auf der Oberfläche der Partikel befindet und dort mit den Polyelektrolyten bestimmt werden kann.

Erst ab einer AUPDS-Konzentration von 2 mol-% AUPDS findet sich in den Partikeln mit Elementaranalyse mehr AUPDS als auch titriert werden kann. Das bei diesen Konzentrationen copolymerisierte AUPDS liegt demnach auch im Partikelinnern vor.

Ein Grund für dieses wechselnde Copolymerisationsverhalten kann das Vorhandensein von Mizellen ab einer AUPDS-Konzentration von 1,2 mol-% darstellen. Durch die zunehmende mizellare Nukleation kommt es zum Einschluss größerer Surfmermengen. Diese Bildung von Homopolymerisaten des Surfmers wird auch für die mizellare Nukleation von Lauryl-Allyl-Glyzinat^[150] und Natrium 10-(4-Vinylphenoxy)-Decan-1-sulfonat^[8] berichtet.

5.5.4 *Batch*-Copolymerisation von AUPDS und MUPDS mit Styren

Um die Eignung der Aktivester-Surfmere zur Polymerisation mit anderen Comonomeren zu testen wurden Copolymerisationsexperimente mit Styren und AUPDS unternommen. Anhand der zur Verfügung stehenden Copolymerisationsparameter (s. Tabelle 5-2) lässt sich abschätzen, dass die Copolymerisation der Surfmere ausser mit MMA auch mit Styren durchgeführt werden kann. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Partikelgröße von der Surfmerkonzentration untersucht.

Durchführung

Die Emulsionspolymerisationen **S 0** bis **S 7** wurden nach dem in Abschnitt 5.5.3.5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Für jede der acht Polymerisationen wurden 2 mL Styren und 10 mg AIBA eingesetzt. Die zugegebenen Surfmermengen sind in Tabelle 5-14 aufgeführt.

Zur Anfertigung eines ¹H-NMR-Spektrums wurden die Partikel der Probe **S 7** durch Zentrifugieren und Redispergieren gereinigt, anschließend gefriergetrocknet und in CDCl₃ / TFA-*d*₁ (1:15 v/v) gelöst.

Tabelle 5-14 AUPDS-Konzentrationen c_{AUPDS} , mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser \bar{d}_{DLS} und Partikelanzahl der mit AIBA initiierten Copolymerisation von Styren und AUPDS.

Probe	c_{AUPDS}	100 ·		
		$c_{\text{AUPDS}}/c_{\text{Styren}}$	\bar{d}_{DLS}	N_c
	/(mmol L ⁻¹)	%	/nm	/L ⁻¹

Probe	c_{AUPDS}	$100 \cdot$	\bar{d}_{DLS}	N_c
	$/(mmol L^{-1})$	$c_{\text{AUPDS}}/c_{\text{Styren}}$		
S 0	0	0	176 ± 5	$5,7 \cdot 10^{13}$
S 1	1,5	0,3	127 ± 3	$4,05 \cdot 10^{16}$
S 2	2,5	0,5	119 ± 2	$4,93 \cdot 10^{16}$
S 3	4,0	0,8	107 ± 3	$6,94 \cdot 10^{16}$
S 4	7,4	1,5	104 ± 3	$7,79 \cdot 10^{16}$
S 5	15,0	3,0	93 ± 3	$1,14 \cdot 10^{17}$
S 6	24,9	5,0	69 ± 4	$3,07 \cdot 10^{17}$
S 7	42,1	8,5	58 ± 3	$5,87 \cdot 10^{17}$

Ergebnisse

Alle durchgeführten Emulsionspolymerisationen **S 1** bis **S 7** mit Styren und AUPDS führten zur Bildung von Polymernanopartikeln mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern im Bereich von 58 nm bis 127 nm (s. Tabelle 5-14). Aus der Partikelgröße und dem Feststoffgehalt der Suspension wurde ausserdem die Partikelanzahl N_c berechnet. Die Auftragung von $\log N_c$ gegen $\log c_{\text{AUPDS}}$ (Abbildung 5-38) zeigt, dass die Partikelanzahl mit zunehmender Surfmermenge ansteigt. Die Steigung des Trends nimmt oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration zu.

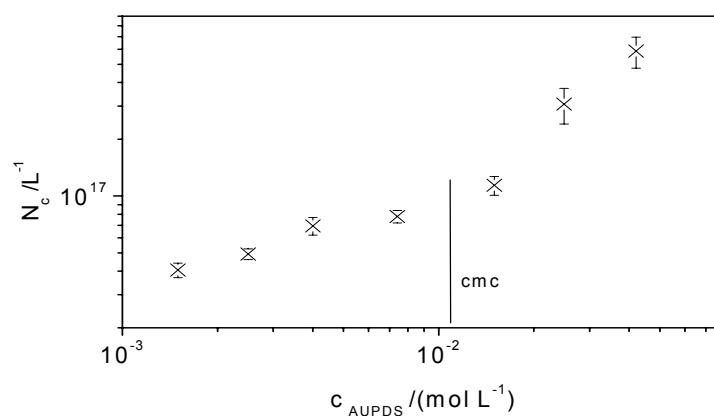


Abbildung 5-38 Log-Log Auftragung der Partikelanzahl N_c gegen die AUPDS-Konzentration c_{AUPDS} . Die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) des Surfmers ist durch eine Linie markiert.

Die Analyse der Polymerpartikel **S 7** mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometrie liefert das in Abbildung 5-39 gezeigte Spektrum mit folgender Zuordnung der Signale^[151]:

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{TFA-d}_1$): $\delta = 7,95\text{-}7,98$ Phenyl-AUPDS, $7,4\text{-}7,5$ Phenyl-AUPDS, $6,95\text{-}7,15$ o-Phenyl-Styren, $6,4\text{-}6,7$ m/p-Phenyl-Styren, $3,87$ MeOSO_3^- , $3,2\text{-}3,3$ $-\text{S}(\text{Me}_2)^+$, $2,72$ $-\text{C}(\text{O})\text{NH-CH}_2$, $1,75\text{-}2$, $\alpha\text{-H}$ Styren, $1,3\text{-}1,6$ $\beta\text{-H}$ Styren.

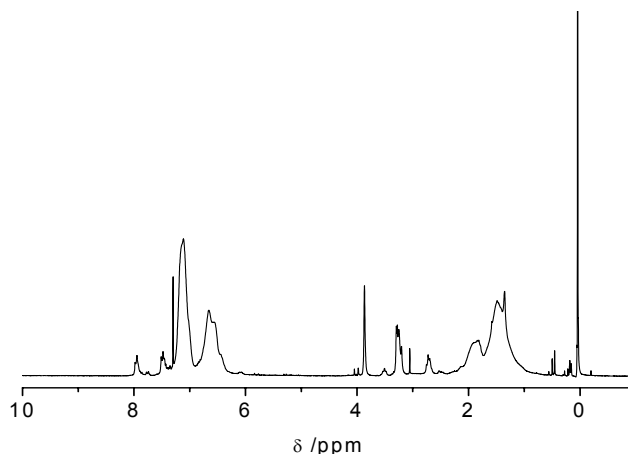


Abbildung 5-39 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der gefriergetrockneten p(St-co-AUPDS)-Probe **S 7**.

Die Gruppe der $-\text{S}(\text{Me}_2)^+$ Signale zwischen $3,2$ ppm und $3,3$ ppm besteht aus vier sich überlagernden Einzelsignalen ($3,294$ ppm; $3,276$ ppm; $3,248$ ppm; $2,202$ ppm), die wahrscheinlich durch unterschiedliche Triaden des Copolymers hervorgerufen werden. Eine genaue Zuordnung der Signale zu den einzelnen Triaden konnte nicht vorgenommen werden.

Die Probe **S 3** wurde ausserdem mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Die entstandene Aufnahme (s. Abbildung 5-40) zeigt eine schmale Partikelgrößenverteilung. Die aus den Bilddaten gewonnene Partikelgrößenverteilung lässt sich durch eine GAUSS-Funktion mit einem Mittelwert \bar{x} von 190 nm und einer Standardabweichung σ von 32 nm beschreiben ($R^2 = 0,92127$, 150 ausgemessene Partikel).

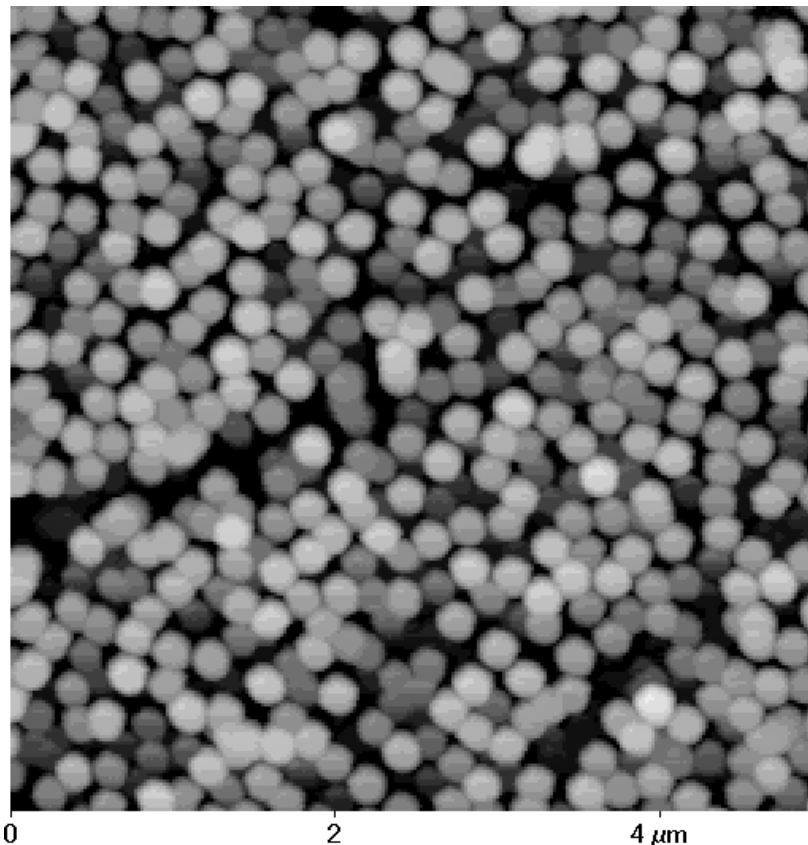


Abbildung 5-40 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der p(St-co-AUPDS)-Partikel **S 3**. Die Abbildung zeigt Partikel deren Verteilung sich mit einer GAUß-Funktion beschreiben läßt ($R^2 = 0,92127$, 150 ausgemessene Partikel). Der mittlere Durchmesser der Partikel beträgt 190 ± 32 nm.

Diskussion der Ergebnisse zur Copolymerisation der Surfmerer mit Styren

Die mit AIBA initiierte Emulsionspolymerisation von AUPDS und Styren lieferte Partikel mit einem kleineren hydrodynamischen Durchmesser als beim Einsatz von MMA (s. 5.5.3.5). Dem zu Folge ist die berechnete Partikelanzahl bei gleicher AUPDS-Konzentration niedriger als N_c beim Einsatz von MMA.

Wie in den Überlegungen zur Partikelnukleation im System p(MMA-co-AUPDS) (s. 5.5.3.3) gezeigt, wird die Partikelanzahl hauptsächlich in der Nukleationsphase der Polymerisation determiniert. Eine differierende Partikelanzahl lässt sich daher auf ein unterschiedliches Nukleationsverhalten von MMA und Styren zurückführen.

Um die Partikelbildung während der Emulsionspolymerisation zu beschreiben, entwickelten HANSEN, UGELSTAD, FITCH und TSAI (HUFT-Theorie^[24,137]) das Modell der homogenen Nukleation. Nach diesem Modell starten die in der wässrigen Phase gebildeten Initiator-Radikale durch Reaktion mit dem dort vorhandenen Monomer die Polymerisation. Durch das Wachstum der entstandenen Oligomere kommt es ab einer

charakteristischen Kettenlänge (j) zur Knäuelbildung der Ketten und damit zur Bildung einer Polymerphase.

Die Geschwindigkeit der Partikelentstehung während einer emulgatorfreien Polymerisation kann damit durch (Gl. 24) beschrieben werden.

$$\frac{d\left(\frac{N_c}{N_A}\right)}{dt} = k_{p, \text{aq}} c_W c_{\text{IM}_{j_{\text{crit}}}} \quad (\text{Gl. 24})$$

N_c = Partikelanzahl / L^{-1}
 N_A = Avogadro'sche Konstante / mol^{-1}
 $k_{p, \text{aq}}$ = Kettenwachstumsgeschwindigkeit in der wässrigen Phase / $(L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$
 c_W = Monomerkonzentration in der wässrigen Phase / (mol L^{-1})
 $c_{\text{IM}_{j_{\text{crit}}}}$ = Konzentration an Radikalen mit der Kettenlänge j_{crit} / (mol L^{-1})

Die Konzentration der Oligomere mit der kritischen Kettenlänge (j_{crit}) kann dann numerisch aus den Gleichungen für Kettenwachstum und –abbruch berechnet werden^[134]. Aus den resultierenden Gleichungen ergibt sich, dass die Partikelzahl unter anderem ansteigt, wenn

- die kritische Kettenlänge j_{crit} kleiner wird,
- die Sättigungskonzentration des Monomers c_W^{sat} in der wässrigen Phase erhöht wird oder
- die Kettenwachstumsgeschwindigkeit in der wässrigen Phase $k_{p, \text{aq}}$ größer wird.

Wird Styren anstelle von MMA homopolymerisiert, werden die Parameter j_{crit} , c_W^{sat} und $k_{p, \text{aq}}$ (s. Tabelle 5-15) niedriger. Deshalb sollte nach diesem Modell bei der Emulsionspolymerisation von Styren eine niedrigere Partikelanzahl resultieren als bei Verwendung von MMA. Der Vergleich mit dem Experiment^[152,153] zeigt aber, dass bei beiden emulgatorfreien Polymerisationen ($T = 80 \text{ }^\circ\text{C}$, Initiator KPS) dieselbe Anzahl von Partikeln entsteht.

Das Modell ist demnach noch unvollständig und berücksichtigt nicht den Einsatz von Tensiden, gibt aber dennoch die Größenordnung der Partikelanzahl und einzelne Trends befriedigend wieder.

Tabelle 5-15 Die Nucleation beeinflussende Parameter von Styren und MMA. Die Angaben entstammen der Literatur^[134] und den darin angegebenen Quellen. $k_{p,aq}$ gilt für $i \geq 3$, wobei i die Länge der Polymerkette bezeichnet.

	Styren (70 °C)	MMA
j_{crit}	5	10
$c_w^{sat} / (\text{mmol L}^{-1})$	5,6	150
$k_{p,aq} / (\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1})$	480	1300

Die Ergebnisse der Copolymerisation von AUPDS und MMA oder Styren zeigen eine höhere Partikelanzahl bei Verwendung von Styren. Der mögliche Grund für dieses Verhalten könnte die im Vergleich mit MMA niedrigere kritische Kettenlänge j_{crit} des Styrens sein. Dadurch bilden sich die phasenseparierten Nukleationspartikel früher im Polymerisationsprozess. Bei gleicher molarer Menge an eingesetztem Monomer bilden sich so bei der Verwendung von Styren mehr Nukleationskeime als bei der Verwendung von MMA.

Dies würde aber bedeuten, dass der Effekt einer Änderung von c_w^{sat} und $k_{p,aq}$ überkompensiert wird. Hier zeigen sich die Grenzen des HUFT-Modells, in dem die elektrostatische Stabilisierung der Partikel nur durch die Initiator-Endgruppen stattfindet. Ein Nukleations-Modell, welches polymerisierbare ionische Tenside berücksichtigt ist bislang noch nicht für die Emulsionspolymerisation entwickelt worden.

5.6 Reaktionen an Aktivestersurfmer-Partikeloberflächen

Nachdem die Reaktivität der monomeren Surfmer mit Aminen untersucht wurde (s. 5.3), soll in diesem Kapitel die Umsetzung von p(MMA-co-AUPDS) mit verschiedenen aminhaltigen Molekülen betrachtet werden. Für die Umsetzungen wurden Amine ausgewählt, mit denen die Polarität der Partikeloberflächen verändert werden kann.

5.6.1 Umsetzung mit Ethanolamin und Butylhydrazid

Durch die Umsetzung von Aktivester-Oberflächen mit Ethanolamin oder Butylhydrazid sollen Partikel mit Hydroxy- und Alkyl-Oberfläche hergestellt werden. Dazu wurden p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit den Stickstoff-Nukleophilen unter verschiedenen Bedingungen umgesetzt. Die Analyse der erhaltenen Partikeloberflächen erfolgte mit Mikroelektrophorese, da die Änderung der oberflächennah gebundenen Funktionen auch eine Änderung des ζ -Potentials verursacht.

Durchführung

Zur Umsetzung von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln mit Ethanolamin oder Butylhydrazid, wurden 100 μL durch Zentrifugation und Dispergieren in Wasser gereinigter Latex **PA 3** (Herstellung s. S. 87ff) mit 900 μL Ethanolamin oder Butylhydrazid-Lösung ($c = 0,1 - 15 \text{ mmol L}^{-1}$, s. Tabelle 5-16) versetzt und über Nacht in Eppendorfgefäßen geschüttelt. Darüber hinaus wurde eine weitere Probe des Latex mit Natriumhydroxid-Lösung ($c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) umgesetzt. Nach der Durchführung der Reaktion wurden die Partikel abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in Wasser redispergiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Das ζ -Potential der Partikel wurde mittels Mikroelektrophorese in Phosphatpuffer bei pH 7,0 bestimmt.

Ergebnisse

Die p(MMA-co-AUPDS)-Partikel, deren Aktivester-Funktionen hydrolysiert wurden (s. Tabelle 5-16), besitzen unter den Messbedingungen der Mikroelektrophorese ein ζ -Potential von -38 mV . Dieses negative ζ -Potential wird durch die Ladungen der entstandenen Carboxylat-Funktionen hervorgerufen.

Tabelle 5-16 Bedingungen und Analyseergebnisse der Umsetzung von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln (PA 3) mit Ethanolamin und Butylhydrazid.

Reaktionsmedium	C Ethanolamin / Butylhydrazid /(mol L ⁻¹)	ζ -Potential-	ζ -Potential-
		Ethanolamin ¹ /mV	Butylhydrazid ¹ /mV
Natriumhydroxid-Lösung (c = 0,01 mol L ⁻¹)	0	-38 ± 2 ²	
Wasser	0,1	-27 ± 2	16 ± 1
	1,5	-30 ± 2	10 ± 2
	15	-34 ± 2	3 ± 2
Phosphatpuffer pH 7,5	0,15	10 ± 1	10 ± 1
	1,5	-2 ± 2	4 ± 1
	15	-19 ± 2	2 ± 1
Phosphatpuffer pH 8,0	0,15	4 ± 1	5 ± 1
	1,5	-10 ± 1	0 ± 1

Reaktionsmedium	C Ethanolamin / Butylhydrazid /(mol L ⁻¹)	ζ-Potential- Ethanolamin ¹ /mV	ζ-Potential- Butylhydrazid ¹ /mV
	15	-23 ± 2	-5 ± 2

¹ gemessen in Phosphatpuffer, pH 7,0 (C_{Phosphat}=0,05 mol L⁻¹)

² Umsetzung erfolgte nur mit Natriumhydroxid-Lösung.

Für die mit Ethanolamin umgesetzten Polymerpartikel ergeben sich je nach den Reaktionsbedingungen Potentiale zwischen – 2 mV und – 34 mV. Der niedrigste Wert dieser Messreihe wurde bei den Reaktionsprodukten gemessen, die aus der wässrigen Umsetzung der Partikel mit der konzentriertesten Ethanolamin-Lösung (15 mmol L⁻¹) stammen. Bei diesen Reaktionsbedingungen werden demnach Partikel gewonnen, bei denen die Aktivester-Funktionen auch in Carbonsäure-Funktionen umgewandelt werden.

Wird die Reaktion stattdessen mit einer 10-fach verdünnteren Ethanolamin-Lösung in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt, erhält man Partikel die ein ζ-Potential in der Nähe des Ladungsnullpunkts besitzen. Dieses Verhalten lässt sich dadurch erklären, dass die positiv geladenen Aktivester-Funktionen auf der Partikeloberfläche bei diesen Bedingungen wie beabsichtigt in ladungsneutrale 2-Hydroxyethyl-Gruppen überführt wurden.

Bei Butylhydrazid werden sowohl bei Reaktion in Wasser (C_{Butylhydrazid} = 15 mmol L⁻¹) als auch in den verwendeten Puffern Partikel mit einem ζ-Potential von –5 mV bis + 5 mV erhalten. Bei der Reaktion der verdünnteren Hydrazid-Lösungen mit den Partikeln in Wasser werden Potentiale von 10 mV bis 16 mV gemessen, was durch noch auf der Oberfläche vorhandene Sulfonium-Gruppen erklärt werden kann. Aus diesem Grund kann auch nicht entschieden werden, ob bei den Versuchen in ungepuffertem Medium Butylhydrazid kovalent auf der Partikeloberfläche gebunden wurde oder ob sich die Ladung der aus Hydrolyse entstandenen Carboxy-Funktionen und der Sulfonium-Funktionen des verbliebenen Aktivesters zufällig kompensieren. Diese zufällige Kompensation kann bei der Reaktion in pH 7,5 oder pH 8,0-Puffer ausgeschlossen werden, da hier eine vollständige Hydrolyse der verbliebenen Aktivester stattfindet (s. 5.6.4.2).

Diskussion der Ergebnisse zur Umsetzung von p(MMA-co-AUPDS) mit Stickstoff-Nukleophilen

Aus den Ergebnissen der ζ -Potentialmessungen ergibt sich, dass die Umsetzung der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit Ethanolamin bei einem pH Wert von pH 7,5 zur Reaktion der Aktivester zum N-(2-Hydroxyethyl)amid führt. Die Reaktion der Aktivester mit Butylhydrazid kann hingegen sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 8,0 durchgeführt werden.

5.6.2 Umsetzung mit 6-Fluoresceinamin

Durch die Umsetzung der p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit 6-Fluoresceinamin sollen Polymerpartikel hergestellt werden, die an ihrer Oberfläche fluoreszierende Gruppen besitzen. Im Unterschied zu den rein qualitativen Ergebnissen der ζ -Potentialmessungen kann die Menge der immobilisierten Moleküle einfach über die Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt werden.

Durchführung

Zur Immobilisierung von 4-Fluoresceinamin wurden p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit einem titrimetrisch bestimmten AUPDS-Gehalt zwischen $6 \mu\text{mol g}^{-1}$ und $204 \mu\text{mol g}^{-1}$ verwendet (s. Tabelle 5-17).

Tabelle 5-17 Zur Immobilisierung von Fluoresceinamin eingesetzte p(MMA-co-AUPDS)-Partikel und der auf ihnen gebundene Farbstoff-Gehalt $b_{\text{Fluoresceinamin}}$. Die AUPDS-Molalität b_{AUPDS} in den Partikeln wurde durch titrimetrische Bestimmung der Aktivester-Gruppen ermittelt (s. Tabelle 5-13, S. 99).

Probe	b_{AUPDS} /($\mu\text{mol/g}$)	$b_{\text{Fluoresceinamin}}$ immobilisiert /($\mu\text{mol/g}$)	Ausbeute ($b_{\text{Fluoresceinamin}} / b_{\text{AUPDS}}$) · 100 / %
PA 0 ¹	n.b.	$0,1 \pm 0,08$	-
PA 1	6 ± 2	$0,8 \pm 0,14$	$13,3 \pm 2,1$
PA 6	47 ± 2	$1,0 \pm 0,16$	$2,1 \pm 0,3$
PA 8	71 ± 5	$3,0 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,3$
PA 10	139 ± 12	$8,4 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,3$
PA 11	204 ± 14	$9,6 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,3$

¹ Die Probe **PA 0** wurde mit der gleichen Fluoresceinamin-Menge umgesetzt wie **PA 11**.

Zunächst wurden aus den Stammlatices der Partikel-Suspensionen in Phosphatpuffer ($c_{\text{Phosphat}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5) hergestellt, die einen Feststoffanteil von 0,25 Gew.-% besitzen. Zu den so hergestellten und in lichtgeschützten Eppendorfgefäßen gehandhabten Suspensionen, wurde ein zweifacher Überschuss (berechnet anhand von w_{AUPDS}) einer wässrigen 6-Fluoresceinamin-Lösung ($c = 25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) gegeben.

Die Partikelsuspensionen wurden über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und danach durch mehrfaches Zentrifugieren und Redispersieren der Partikel in Wasser gereinigt. Abschließend wurden die Partikel in Phosphatpuffer ($c_{\text{Phosphat}} = 5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,0) redispersiert und aliquotiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen (s. Tabelle 5-17 und Abbildung 5-41) zeigen, dass das 6-Fluoresceinamin auf den p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln gebunden wird. Mit steigender AUPDS-Molalität in den Partikeln steigt auch die 6-Fluoresceinamin-Molalität von $0,8 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ auf $9,6 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$. Die berechnete sigmoide Ausgleichsfunktion besitzt einen oberen Grenzwert für von $(9,6 \pm 0,6) \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ ($R^2 = 0,9958$).

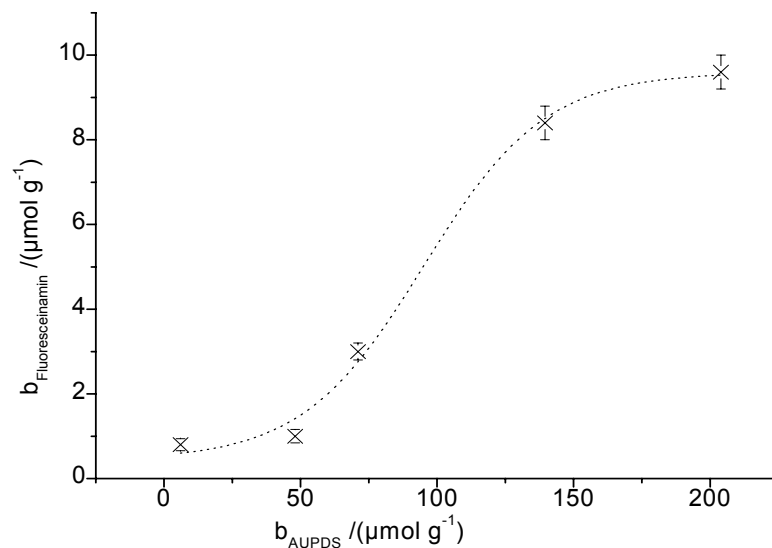


Abbildung 5-41 Verlauf der Fluoresceinamin-Molalität $b_{\text{Fluoresceinamin}}$ in Abhängigkeit der Surfmer-Molalität b_{AUPDS} in den untersuchten p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln. Die p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit unterschiedlicher Surfmer-Molalität wurden bei einem pH Wert von 7,5 über Nacht mit 6-Fluoresceinamin-Lösung umgesetzt. $b_{\text{Fluoresceinamin}}$ wurde durch Fluoreszenzmessungen bestimmt. Die sigmoide Ausgleichsfunktion besitzt einen oberen Grenzwert von $(9,6 \pm 0,6) \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ ($R^2 = 0,9958$).

Der Vergleich der Analyseergebnisse für die Proben **PA 10** und **PA 11** zeigt allerdings, dass ein Anstieg der titrierbaren AUPDS-Molalität von $139 \mu\text{mol g}^{-1}$ auf $204 \mu\text{mol g}^{-1}$ keine signifikante Veränderung der immobilisierten Farbstoffmenge nach sich zieht.

Die aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen und der AUPDS-Molalität berechneten Ausbeuten für die Reaktion von 6-Fluoresceinamin mit AUPDS befinden sich im Bereich zwischen 2,1 mol-% und 13,3 mol-%.

Diskussion der Ergebnisse zur Fluoresceinamin-Immobilisierung

Die Ergebnisse der Immobilisierungsversuche bestätigen die Reaktivität der oberflächengebundenen Aktivester-Funktionen mit Stickstoff-Nukleophilen. Die Ausbeute dieser Reaktion ist allerdings bei allen untersuchten p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln niedriger als 14 %. Diese niedrigen Ausbeuten können durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen sicherlich noch verbessert werden.

Der sigmoidale Verlauf der Fluoresceinamin-Molalität in Abbildung 5-41 könnte durch die immer dichter werdende Belegung der Partikeloberfläche mit steigender AUPDS-Molalität begründet sein (s. Tabelle 5-12). Zuerst steigt $b_{\text{Fluoresceinamin}}$ mit der zunehmenden AUPDS-Menge an um dann bei Erreichen einer dichten Packung von Aktivester-Gruppen einen konstanten Wert anzunehmen. Zur Immobilisierung von 6-Fluoresceinamin auf AUPDS-Partikeln ist es aufgrund des sigmoidalen Kurven-Verlaufs nicht notwendig Partikel zu erzeugen, die eine AUPDS-Molalität $> 200 \mu\text{mol g}^{-1}$ aufweisen um die maximale Menge an 6-Fluoresceinamin zu binden^[154].

5.6.3 Immobilisierung von Streptavidin

Nachdem bewiesen wurde, dass die neuen Aktivester-Surfmerer einerseits mit Streptavidin reagieren und sie andererseits auf der Oberfläche der Polymerpartikel einpolymerisiert werden, soll in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob das Streptavidin durch die Aktivester-Funktion im Copolymerpartikel kovalent auf der Partikeloberfläche immobilisiert werden kann.

Um die Immobilisierung von Streptavidin zu untersuchen wurden p(St-co-AUPDS)-Partikel hergestellt, gereinigt und bei einem pH-Wert von 7,5 mit Streptavidin umgesetzt. Der auf den Partikeln immobilisierte Teil des Streptavidins wurde durch Titration mit Biotin-4-Fluorescein quantifiziert^[119,155,156]. Bei dieser Titration bildet das Biotin-4-Fluorescein einen stabilen (Affinitätskonstante SA_v/Biotin, $K_a = 2,5 \cdot 10^{13} \text{ L mol}^{-1}$ [93] bzw. bei immobilisiertem SA_v, $K_a = 1,1 \cdot 10^{11} (\text{L mol}^{-1})$ [157]) fluoreszenz-inaktiven 1:1-Komplex mit je einem Streptavidin-Monomer. Bei einer Biotin-4-Fluorescein-Zugabe, die über den Äquivalenzpunkt hinausgeht, kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Durchführung

Aus 100 mg (0,2 mmol) AUPDS, 10 mg (0,04 mmol) AIBA, 2,0 mL (17,2 mmol) Styren und 30 mL Wasser wurden nach der Vorschrift in 5.5.3.1 (S. 69ff) zwei Polymerpartikel-Suspensionen hergestellt und gereinigt. Je 10 μL dieser gereinigten Lösungen wurden in 970 μL Phosphatpuffer ($c_{\text{Phosphat}} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,5) gegeben und nach Zugabe von 20 μL Streptavidin-Lösung ($c_{\text{SAv}} = 13,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Polymerpartikel aus der Reaktions-Mischung durch Zentrifugation abgetrennt und in Phosphatpuffer ($c_{\text{Phosphat}} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,0) dispergiert. Nach zweimaligem Wiederholen des Zentrifugierens und Dispergierens wurde die Partikelsuspension aliquotiert und mit Biotin-4-Fluorescein-Lösung ($c = 1,34 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) titriert. Ausserdem wurde der Überstand aus der Reaktion mit Streptavidin aliquotiert und ebenfalls mit Biotin-4-Fluorescein titriert. Als Referenzprobe wurden darüber hinaus 20 μL Streptavidin-Lösung ($c_{\text{SAv}} = 13,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) titriert. Die Messung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten erfolgte parallel mit einem für *wellplates* geeigneten Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse

Die Fluoreszenzmessungen (s. Abbildung 5-42) zeigen, daß die Fluoreszenzintensität der mit Streptavidin umgesetzten p(St-co-AUPDS)-Partikel bis zu einem $n_{\text{Biotin-4-Fluorescein}}/n_{\text{SAv}}$ Verhältnis von 3:1 (mol/mol) konstant blieb. Wurde weiteres Biotin-4-Fluorescein zutitriert, stieg die Fluoreszenzintensität linear an. Für die Titration der Streptavidin-Probe wurde ein sehr ähnlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität beobachtet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit $n_{\text{Biotin-4-Fluorescein}}$ ist bei der Streptavidin-Probe flacher als bei Titration der mit Streptavidin umgesetzten p(St-co-AUPDS)-Partikel. Der Verlauf dieser Titrationskurven wird durch die von Streptavidin ausgelöste Fluoreszenzlöschung hervorgerufen. Erst wenn alle Biotin-4-Fluorescein-Bindestellen des Proteins komplexiert sind kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Das experimentell bestimmbare molare Verhältnis von Biotin-4-Fluorescein und SA_v befindet sich dabei je nach Reinheit und Denaturierungsgrad des Proteins im Bereich von 3:1 bis 4:1^[158]. Der Verlauf der Titrationskurve der mit Streptavidin umgesetzten p(St-co-AUPDS)-Partikel belegt damit die Protein-Immobilisierung auf dem hergestellten Latex.

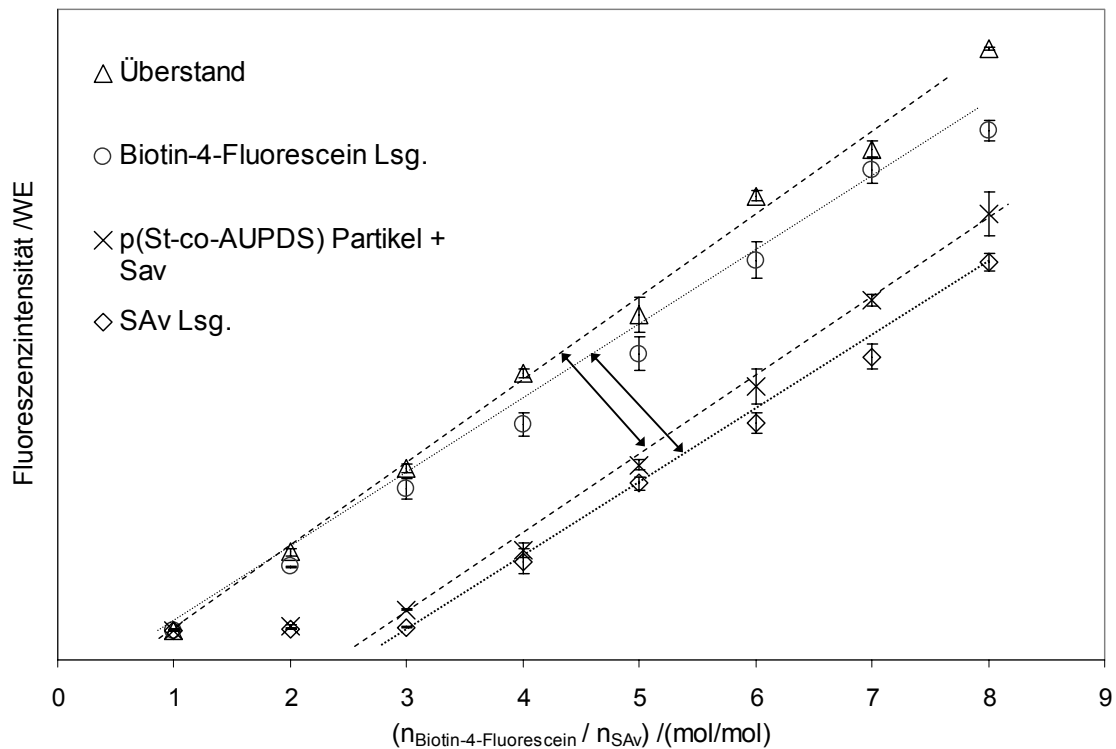


Abbildung 5-42 Titrationskurven von p(St-co-AUPDS)-Partikeln mit Biotin-4-Fluorescein. Die graphische Auswertung der Ausgleichsgeraden-Abstände ergibt, daß pro 1 g p(St-co-AUPDS)-Partikel (28 ± 5) mg bzw. (500 ± 90) nmol Streptavidin-Tetramer immobilisiert werden.

Sowohl bei der Titrationskurve des Überstands der Partikel-Umsetzung, als auch bei den Fluoreszenzdaten der reinen Biotin-4-Fluorescein-Lösung, wurde ein linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender $n_{\text{Biotin-4-Fluorescein}}$ beobachtet. Dieser Kurvenverlauf zeigt, daß in der wäßrigen Phase des Latex, nach Umsetzung der Partikel mit SAV, kein Protein mehr bestimmbar ist.

Die graphische Auswertung der Ausgleichsgeraden-Abstände ergibt, daß pro 1 g p(St-co-AUPDS)-Partikel (28 ± 5) mg bzw. (500 ± 90) nmol Streptavidin-Tetramer immobilisiert werden.

Wenn zusätzlich mit Hilfe des Durchmessers von (106 ± 3) nm die Oberfläche der p(St-co-AUPDS)-Partikel über (Gl. 23) (s. S. 96) berechnet wird, erhält man für die von einem Streptavidin-Tetramer belegte Fläche einen Wert von (160 ± 20) nm².

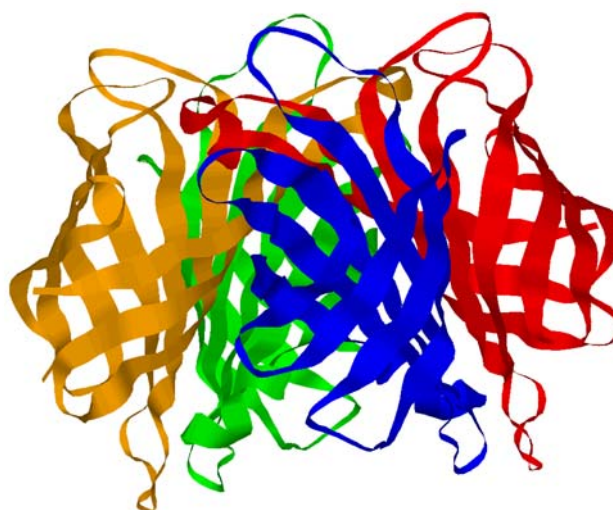


Abbildung 5-43 RASMOL® Darstellung der Quartärstruktur eines Streptavidin-Tetramers.

Diskussion der Ergebnisse zur Streptavidin-Immobilisierung

Von HENDRICKSON et al. wurde durch anormale Streuung von Synchrotron-Strahlung für das Streptavidin-Tetramer (Abbildung 5-43) eine Ausdehnung von 5,4 nm x 5,8 nm x 4,8 nm bestimmt^[121].

Aus diesem Messergebnis kann man einen Flächenbedarf für ein SAv-Tetramer von 26 nm² bis 31 nm² bestimmen. Zusätzlich wurde von WANG durch 2D-Kristallisation von Streptavidin bei einem pH-Wert von 8,0 ein Flächenbedarf von 33,61 nm² bestimmt^[159]. Wenn dieser Flächenbedarf zugrunde gelegt wird, ergibt sich mit einem Verhältnis von 160 nm² pro Tetramer auf der Partikeloberfläche eine Belegung von ca. 21 %. Die Streptavidin-Moleküle sind demnach auf den Partikeln weniger dicht gepackt als bei der 2D-Kristallisation.

Tabelle 5-18 Vergleich unterschiedlicher Streptavidin-Beads und –Nanopartikel (Literaturverweise auf ungeprüfte Herstellerangaben).

Hersteller	Produkt	Durchmesser	Biotin-Bindekapazität
		/μm	/(pmol mg ⁻¹)
Active Motif (Carlsbad, USA)	Catalog # 29009/29010	k.A.	4000
Eigene Herstellung	p(St-co-AUPDS)	0,16	2000 ± 360
Pierce (Rockford, USA)	MagnaBind™ # 21344	1-4	1640 ^[160]
New England Biolabs, Inc.	#S1420S	1	1000 ^[161]

Hersteller	Produkt	Durchmesser /μm	Biotin-Bindekapazität /(pmol mg ⁻¹)
(Beverly USA)			
Dynal (Oslo, Norwegen)	Dynalbeads™ M-280	2,8	700-1000 ^[162]
Novagen (Madison, USA)	MagPrep™ # 70716-3	1	400 ^[163]

Um die SA_v-Menge und damit die Biotin-Bindekapazität der Partikel bewerten zu können, wurde mit den Bindekapazitäten kommerziell verfügbarer Partikel verglichen (s. Tabelle 5-18). Der Vergleich zeigt, dass die p(St-co-AUPDS)-Partikel mit (2000 ± 360) pmol mg⁻¹ Biotin-Bindekapazität eine hohe Bindekapazität besitzen, die lediglich von den „Active Motive“-Partikeln übertroffen wird.

5.6.4 Hydrolysestabilität der Aktivester-Partikel auf p(St-co-AUPDS)-Oberflächen

Neben der Untersuchung der Reaktivität der Aktivester-Gruppen in p(MMA-co-AUPDS)- und p(St-co-AUPDS)-Partikeln und ihrer Verteilung in und auf den Partikeln, ist die Lagerfähigkeit der hergestellten Latices von entscheidender Bedeutung. Wobei diese Eigenschaft durch die Hydrolysestabilität der Aktivester gekennzeichnet ist.

Ausserdem spielt die Hydrolysestabilität dieser Gruppen eine wichtige Rolle bei der Auswahl der geeigneten Reaktionsbedingungen, um den Aktivester mit einem Nukleophil umzusetzen.

Im Folgenden soll daher sowohl die Lagerbeständigkeit der Latices bei verschiedenen Temperaturen als auch die Hydrolyse der Aktivester bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht werden.

5.6.4.1 Stabilität des Latex-Rohprodukts

Um die Reaktionsgeschwindigkeit der Aktivester-Hydrolyse an p(St-co-AUPDS)-Latices bei unterschiedlichen Temperaturen zu bestimmen, wurden frisch hergestellte Polymerpartikel zum einen bei Raumtemperatur (25 °C) und zum anderen bei 6 °C aufbewahrt und in regelmäßigen zeitlichen Abständen mit Remazolblau titriert^[164]. Die Endpunktsbestimmung erfolgte dabei mit Isothermaler-Titrations-Mikrokalorimetrie (ITC).

Zur Validierung der ITC-Methode wurde ausserdem unpolymerisiertes AUPDS mit Remazolblau titriert. Dadurch konnte die Reaktionsenthalpie der Hydrolyse-Reaktion bestimmt werden und die Aktivester-Hydrolyse auf den Partikeln quantifiziert werden.

Durchführung

Durch Emulsionspolymerisation (s. 5.5.3.1 S.69ff.) von 1,8 g (17,2 mmol) Styren und 101 mg AUPDS (0,2 mmol) in 30 mL Wasser mit 10 mg AIBA als Initiator, wurden p(St-co-AUPDS)-Partikel bei 60 °C in 2 h hergestellt. Die so erhaltene Latexsuspension wurde durch Zentrifugieren, Verwerfen des Überstands und Redispersieren des Polymers in Wasser gereinigt. Der Feststoffgehalt des gereinigten Latex betrug 4,6 wt-%.

Für die Kalorimetrie-Messungen wurden zunächst 0,8 mL AUPDS-Lösung (pH 7,5; Phosphatpuffer, $c_{\text{Phosphat}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$; $c_{\text{AUPDS}} = 199 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) in ein 1 mL Edelstahlreaktionsgefäß gefüllt und 25-mal mit 3 μL Remazolblau-Lösung (pH 7,5; Phosphatpuffer, $c_{\text{Phosphat}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$; $c_{\text{Remazolblau}} = 6,09 \text{ mmol L}^{-1}$) titriert. Die Titrant-Zugabe erfolgte in Abständen von 12 Minuten.

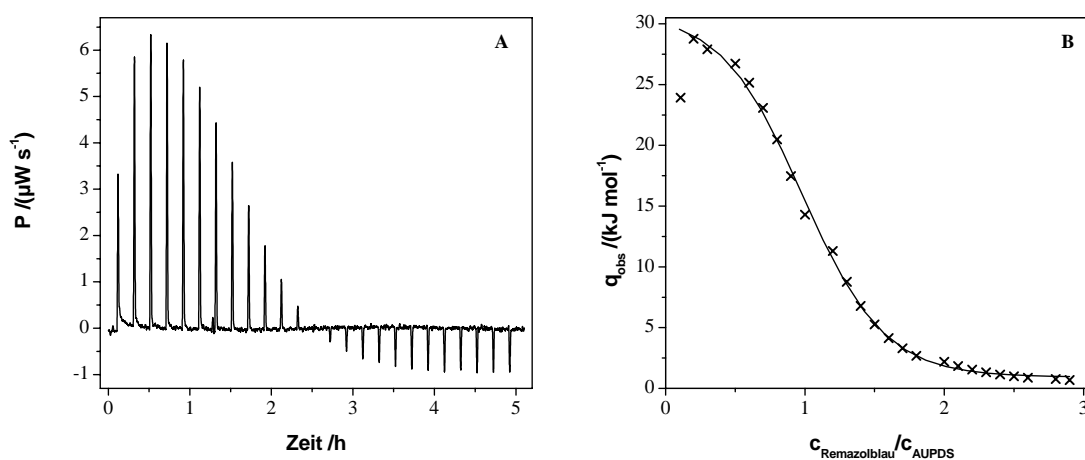


Abbildung 5-44 Ergebnisse der Titration von AUPDS mit Remazolblau bei 25 °C^[164]. (A) Gemessene Wärme-Leistung P in Abhängigkeit der Zeit. (B) Aus (A) berechnete Wärmemenge q_{obs} pro mol Titrant, aufgetragen gegen das Konzentrationsverhältnis von Remazolblau und AUPDS.

Für die Titration der p(St-co-AUPDS)-Partikel wurde eine Suspension mit einer Aktivester-Konzentration von $760 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ in Phosphatpuffer (pH 7,5; $c_{\text{Phosphat}} = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$; $c_{\text{AUPDS}} = 199 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) hergestellt. 0,8 mL dieser Suspension wurden mit einer ebenfalls phosphatgepufferten Remazolblau-Lösung ($c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$) titriert. Dazu wurde in

Abständen von 13,5 Minuten 30-mal 4 μL Remazolblau zur vorgelegten Suspension titriert (s. Abbildung 5-45).

Aus den erhaltenen Leistungs-Rohdaten der Titrationskalorimetrie wurden sowohl die Wärmemengen pro mol Titrant als auch die Titrationskurven berechnet. Aus der Form der Titrationskurven lassen sich die Parameter (ΔH , K_a) der beobachteten Bindungsreaktion berechnen^[165-167].

Um die Temperaturabhängigkeit der Aktivesterhydrolyse zu untersuchen, wurden zwei Aliquote des gereinigten Latex bei 25 °C in einem Wasserumlaufthermostaten, bzw. im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt. Innerhalb von 27 Tagen (s. Abbildung 5-46) wurden beiden Aliquoten insgesamt 13 Proben entnommen, deren Aktivester-Konzentration durch Titration mit Remazolblau bestimmt wurde. Die dazu verwendete Methode und die eingesetzten Konzentrationen sind identisch mit der für die Titration von p(St-co-AUPDS) beschriebenen Parametern.

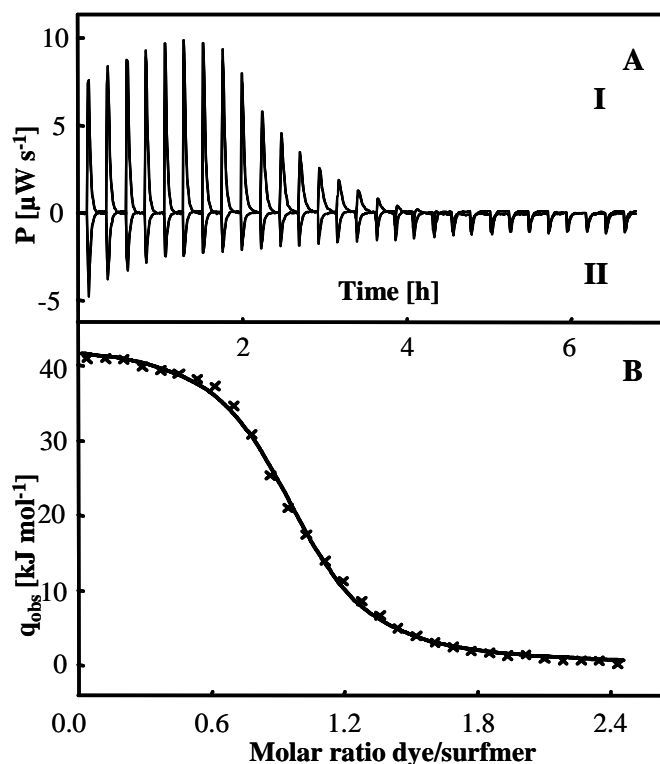


Abbildung 5-45 Ergebnisse der Titration von p(St-co-AUPDS) mit Remazolblau bei 25 °C^[164]. (A) Gemessene Wärme-Leistung P in Abhängigkeit der Zeit. (B) Aus (A) berechnete Wärmemenge q_{obs} pro mol Titrant, aufgetragen gegen das Konzentrationsverhältnis von Remazolblau und AUPDS.

Ergebnisse und Diskussion zur mikrokalorimetrischen Untersuchung der Aktivester-Hydrolyse

Die erhaltenen Daten der Titration von AUPDS und p(St-co-AUPDS)-Partikeln (s. Tabelle 5-19) zeigen, dass es sich bei der Reaktion der Aktivester-Funktion mit Remazolblau um eine exotherme Reaktion handelt.

Tabelle 5-19 Reaktionsenthalpien ΔH , Affinitätskonstanten K_a und Konzentrationen der reaktiven Aktivester-Gruppen c_s . Die Werte wurden aus den mit ITC bestimmten Wärmemengen der Reaktion mit Remazolblau berechnet.

Probe	$K_a / (10^4 \text{ L mol}^{-1})$	$\Delta H / (\text{kJ mol}^{-1})$	$c_s / (\mu\text{mol L}^{-1})$
p(St-co-AUPDS)-Latex	$9,6 \pm 0,9$	$-38,8 \pm 2,1$	760 ± 40
AUPDS	$6,5 \pm 0,3$	$-32,1 \pm 1,4$	199 ± 12

Abbildung 5-44 zeigt die zeitabhängige Leistung P und die durch Integration und Normalisierung berechnete Wärmemenge q_{obs} für die Titration von AUPDS mit Remazolblau. Mit der Annahme, dass es sich bei der Reaktion der beteiligten Verbindungen um eine 1:1-Reaktion handelt, kann für die Reaktionsenthalpie ΔH ein Wert von $-(32,1 \pm 1,2) \text{ kJ mol}^{-1}$ und für die Bindungskonstante K_a ein Wert von $65000 \pm 3000 \text{ L mol}^{-1}$ berechnet werden.

Die analogen Berechnungen liefern für die Titration der p(St-co-AUPDS)-Partikel eine Reaktionsenthalpie ΔH von $-(38,8 \pm 2,1) \text{ kJ mol}^{-1}$ und ein Wert für K_a von $(9,6 \pm 0,9) \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (s. Tabelle 5-19).

Die Ergebnisse der Titrations, mit denen die zeit- und temperaturabhängige Hydrolyse der Aktivester-Gruppen bestimmt wurde, sind in Abbildung 5-46 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei 6 °C und 25 °C eine Hydrolyse der Aktivester-Funktionen der p(St-co-AUPDS)-Partikel stattfindet. Bei 25 °C wurde nach 9 Tagen 50 % der AUPDS-Reste hydrolysiert. Wird der Latex dagegen bei 6 °C aufbewahrt, werden über den gleichen Zeitraum 93 % der reaktiven Gruppen erhalten. Aus diesen Daten wurden Halbwertszeiten der Aktivester-Menge von 9 Tagen für die Aufbewahrung bei 25 °C und von 65 Tagen bei 6 °C berechnet.

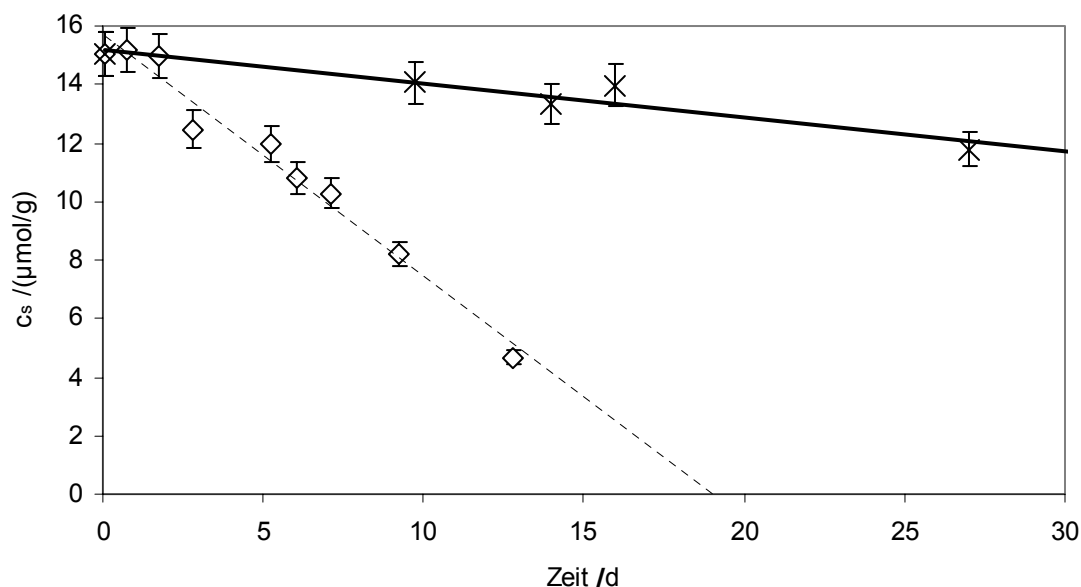


Abbildung 5-46 Mit ITC bestimmte Konzentrationen der reaktiven Aktivester-Gruppen c_s auf p(St-co-AUPDS)-Partikeln bei Aufbewahrung des Latex bei 25 °C (◇) und 6 °C (X). Die Korrelationskoeffizienten der linearen Ausgleichsgeraden betragen $r_{6\text{ °C}} = 0,975$ und $r_{25\text{ °C}} = 0,910$.

Die Ergebnisse der ITC zeigen, dass die Zahl der Aktivester-Gruppen auf den Polymerpartikeln durch Titration mit Remazolblau bestimmbar ist, und dass der gereinigte Latex durch Aufbewahrung eine Haltbarkeit im Kühlschrank von mehr als 13 Tagen besitzt. Während dieser Zeit werden lediglich 10 % des Aktivesters hydrolysiert.

Der lineare Zusammenhang zwischen Reaktionszeit und Produkt-Konzentration weist darauf hin, daß es sich bei der Hydrolyse des Aktivesters um eine Reaktion nullter Ordnung handelt. Bei diesen Reaktionen ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration der Edukte. Vergleichbare Ergebnisse wurden von FITCH und TARCHA zur Hydrolyse von Polyacrylestern auf der Oberfläche von Kolloiden gefunden^[168]. Die von ihnen untersuchte Hydrolyse von Polyacrylester-Kolloiden ist nullter Ordnung in Bezug auf die Reaktion der Ester-Gruppen. Dieses Verhalten wurde durch ein Modell erklärt, bei dem sich eine Schale aus entstandenen Säure-Funktionen um den unhydrolysierten Kern der Partikel bildet. Außerdem wurde die Hydrolyse-Kinetik mit dem katalytischen Effekt der Säure-Gruppen auf den Partikeln erklärt.

Bei den p(St-co-AUPDS)-Partikeln könnte sowohl ein katalytischer Effekt der ω -Amido-Undecansäure-Gruppen als auch die Bildung einer Schale aus diesen Säurefunktionen um den Partikelkern eine Reaktion nullter Ordnung hervorrufen.

Neben der Aufbewahrungs-Temperatur, ist der pH-Wert ein wesentlicher Faktor für die Geschwindigkeit der Aktivester-Hydrolyse. Die Reaktion des AUPDS mit Wasser wird durch Hydroxid-Ionen oder Protonen katalysiert, wobei die basische Katalyse die Reaktion stärker beschleunigt als die saure. Der optimale pH-Wert zur Aufbewahrung des Aktivesters liegt deswegen im leicht sauren Bereich.

Die gereinigte p(St-co-AUPDS)-Partikelsuspension, die in diesem Kapitel verwendet wurde, besitzt einen pH-Wert von $6,3 \pm 0,2$. Durch Absenken des pH-Werts auf pH 5,0 müsste sich eine weitere Verbesserung der Hydrolysestabilität erreichen lassen. Dieser pH-Wert wird auch zur Aufbewahrung von 4-Fluorobenzolsulfonat-Aktivestern empfohlen^[38].

5.6.4.2 Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit des partikelgebundenen Aktivesters vom pH-Wert der flüssigen Phase

Für die Reaktion von aminhaltigen Molekülen mit dem Aktivester der Surfmere ist ein pH-Wert von 7,5 bis 8,5 optimal (s. 5.3.3). Neben dieser Reaktion zum Amid findet aber auch die Hydrolyse des Dimethylsulfoniumphenyl-Esters zur Carbonsäure oder zum Carboxylat statt.

Da die Hydrolyse des Aktivesters basenkatalysiert ist, läuft diese Reaktion schneller ab je größer der pH-Wert der Reaktionslösung ist. Um den optimalen pH-Wert und die optimale Reaktionsdauer für die Aminolyse des Aktivesters auf den Partikeln zu ermitteln, wurden p(St-co-AUPDS)-Partikel bei pH-Werten zwischen 7 und 9 hydrolysiert. Die Messung des ζ -Potentials in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer erlaubt dann Rückschlüsse auf die pH-abhängige Hydrolysegeschwindigkeit.

Durchführung

p(St-co-AUPDS)-Partikel **PS** wurden bei pH 7,0, 8,0 und 9,0 im Phosphatpuffer (pH 7,0 und 8,0) oder Borat-Puffer (pH 9,0) hydrolysiert. Es wurden Ansätze bei einer Hydrolysetemperatur von 6 °C und bei Raumtemperatur (23 °C – 24 °C) durchgeführt. Innerhalb von 29 Stunden wurden je neun Proben entnommen (s. Abbildung 5-47 und Abbildung 5-48), mit Wasser gewaschen und in Phosphatpuffer pH 7,0 ($c = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) redispergiert. Die ζ -Potentiale der Partikel wurden danach mit Mikroelektrophorese gemessen.

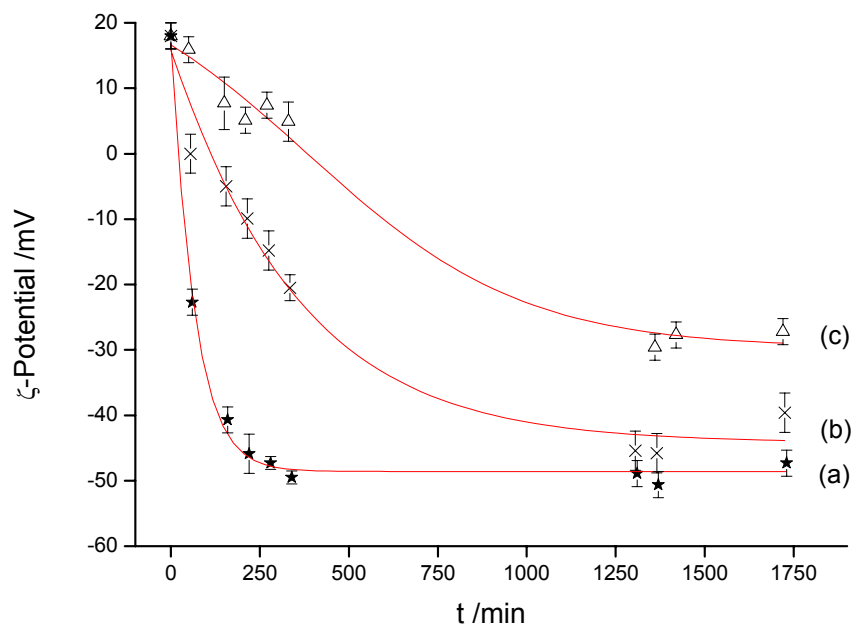


Abbildung 5-47 Zeitabhängigkeit des ζ -Potentials von p(St-co-AUPDS)-Partikeln bei Aufbewahrung in Puffern mit einem pH-Wert von a) 9,0 b) 8,0 c) 7,0. Die Reaktion fand bei $(23,5 \pm 0,5)$ °C statt.

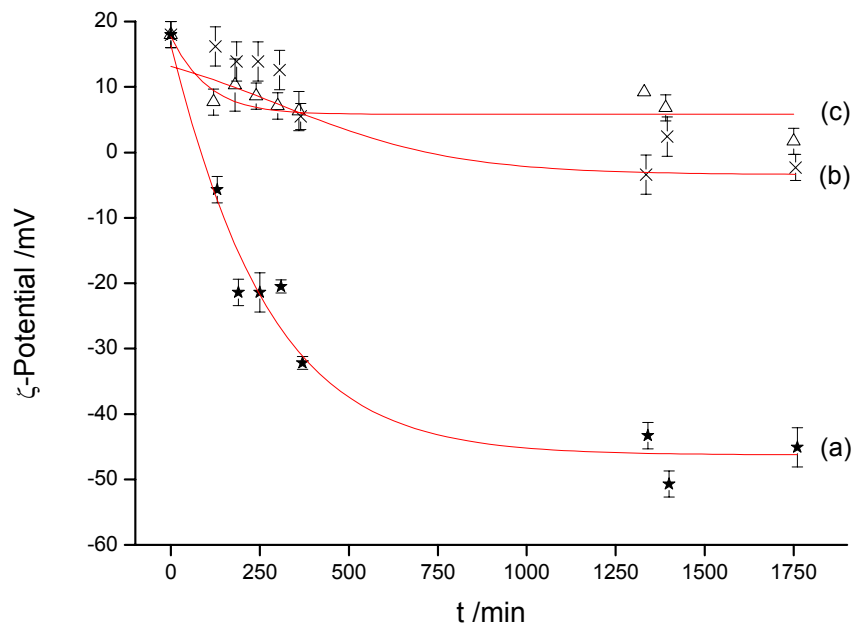


Abbildung 5-48 Zeitabhängigkeit des ζ -Potentials von p(St-co-AUPDS)-Partikeln bei Aufbewahrung in Puffern mit einem pH-Wert von a) 9,0 b) 8,0 c) 7,0. Die Reaktion fand bei $(6 \pm 0,5)$ °C statt.

Ergebnisse und Diskussion zur Aktivester-Hydrolyse bei verschiedenen pH-Werten

Abbildung 5-47 und Abbildung 5-48 zeigen, dass das ζ -Potential der Partikel bei beiden Hydrolysetemperaturen mit zunehmender Reaktionszeit abnimmt. Während aber bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C die Hydrolyse im pH 7,0- und pH 8,0-Puffer die Potentiale nach 29 Stunden lediglich auf (0 ± 6) mV abgesunken sind, zeigt sich bei allen anderen Versuchen in diesem Zeitraum eine mehr oder weniger schnelle Abnahme des ζ -Potentials auf -20 mV bis -50 mV. Die Hydrolyse des positiv geladenen Aktivesters führt hier zu negativ geladenen Carboxylat-Funktionen.

Um eine möglichst vollständige Immobilisierung von Nukleophilen zu erreichen, werden Reaktionsbedingungen benötigt, bei denen der Aktivester möglichst lange unhydrolysiert bleibt. Unter diesen Rahmenbedingungen sollten bei 6 °C und einem pH-Wert von 7 bis 8 die besten Bedingungen für die Reaktion des Esters mit einem Stickstoff-Nukleophil herrschen.

5.6.5 Mikro-Spotting von Surfmer-Partikeln auf Siliziumoberflächen

Die Möglichkeit mit den Surfmer-Partikeln verschiedene Stickstoff-Nukleophile immobilisieren zu können, macht sie interessant für den Einsatz bei der Mikrostrukturierung von Festkörperoberflächen. Mikrostrukturierte Oberflächen werden zum Beispiel bei der Analyse des Proteoms eingesetzt, um die verschiedenen Proteine gezielt immobilisieren und bestimmen zu können^[83,164,169-172]. In diesem Kapitel wird die Mikrostrukturierung von Glasträgern durch Mikrospotten von Nanopartikel-Suspensionen beschrieben. Die Glasträger werden vor der Mikrostrukturierung mit Polyelektrolytschichten im *layer-by-layer*-Verfahren^[173-175] beschichtet. Die schwach negativ geladene Glasoberfläche wird dazu mit einem kationischen Polyelektrolyten beschichtet. Auf der jetzt positiv geladenen Oberfläche können wiederum negativ geladene Partikel oder eine Schicht eines anionischen Polyelektrolyten immobilisiert werden. Die negativ geladene Polyelektrolytschicht kann zur Beladung mit positiv geladenen Partikeln verwendet werden.

Die zur Mikrostrukturierung verwendeten Partikel werden entweder vor oder nach dem Spotten mit einem fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt, um die erhaltene Struktur mit einem Fluoreszenzreader aufnehmen zu können. Die Versuche sollen zeigen, ob die Partikel auch nach erfolgter Mikrostrukturierung geeignet sind, aminhaltige Moleküle zu immobilisieren.

Teile der hier vorgestellten Ergebnisse sind bereits von KNECHT veröffentlicht worden^[176].

Durchführung

Zunächst wurden p(MMA-co-AUPDS)-Partikel mit 17 mL Wasser, 0,9 mL (8,4 mmol) MMA und 214 mg (0,425 mmol) AUPDS hergestellt. Der Feststoffgehalt der hergestellten und gereinigten Partikel **PA 10** (s. Tabelle 5-13) wurde auf 1 % (m/v) eingestellt.

Für die Spottingversuche wurde die Partikelsuspension in drei Ansätze geteilt:

PA 10 H: 1 mL der Partikel PA 10 wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit 1 mL Natriumhydroxid-Lösung ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$) umgesetzt, um die Aktivester-Gruppen der Partikel zu hydrolysieren. Die Partikel wurden zur Reinigung dreimal abzentrifugiert und in frischem Wasser redispersiert. Diese Probe dient als Blindprobe für die unspezifische Adsorption von Fluoresceinamin.

PA 10 FA: 200 μL der Partikel **PA 10** wurde mit 800 μL Phosphatpuffer pH 7,5 und 10 μL einer Fluoresceinamin-Lösung ($19,6 \text{ mmol L}^{-1}$) vermischt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Partikel wurden zur Entfernung des überschüssigen Fluoresceinamins dreimal abzentrifugiert und in frischem Wasser redispersiert. Diese Probe dient als Positivprobe für die Spotting-Versuche.

PA 10: Diese Charge der Partikel wurde ohne weitere Umsetzung zum Spotten eingesetzt.

Alle drei Proben **PA 10**, **PA 10 FA** und **PA 10 H** wurden auf die polyelektrolyt-beschichteten Silizium-Wafer gespottet (s. Tabelle 5-20). Es entstehen durch die vier Nadeln des Arrayers vier identische Muster mit einer Abmessung von rund $950 \mu\text{m} \times 2150 \mu\text{m}$ in einem Abstand von 9 mm. Die einzelnen Spots haben einen Durchmesser von $(151 \pm 6) \mu\text{m}$.

Tabelle 5-20: Übersicht über die durchgeführten Immobilisierungsversuche von Fluoresceinamin (FA) an mikrostrukturiert angelagerten p(MMA-co-AUPDS)-Nanopartikeln auf Glasobjektträgern.

Bezeichnung auf Abbildung 5-49	Beschichtung	Partikel (Ladung)	Behandlung
A	PDADMAC	PA 10 FA (-)	Positivprobe: p(MMA-co-AUPDS)-Partikel, vor Strukturierung mit FA umgesetzt
B	PDADMAC+ SPS	PA 10 (+)	p(MMA-co-AUPDS)-Partikel, nach Strukturierung mit FA umgesetzt
C	PDADMAC	PA 10 H (-)	Blindwert: hydrolysierte p(MMA-co-AUPDS)-Partikel, nach Strukturierung mit FA umgesetzt

Zur Umsetzung der Partikel **PA 10** und des Blindwerts **PA 10 H** nach dem Spotten wurden die mikrostrukturierten Glasobjektträger mit wässriger Fluoresceinamin-Lösung ($16,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ in Phosphatpuffer pH 7,5) umgesetzt. Die Proben wurden hierzu in Glasschalen gelagert und mit Aluminiumfolie verpackt. Nach einer Stunde wurden die strukturierten und umgesetzten Glasobjektträger für eine Minute gründlich mit Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Bis zur Auswertung mit dem Fluoreszenz-Scanner wurden die Objektträger im Dunkeln gelagert.

Ergebnisse

Die 16 Bit-Graustufendarstellung des Laser-Scanners GMS 418 (Fa. Affymetrix, USA) zeigt die Intensität der detektierten Fluoreszenzstrahlung des Farbstoffs auf der Probenoberfläche. Die Helligkeit eines Spots steht im direkten Zusammenhang mit der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Zum Intensitätsvergleich werden Ausschnitte der 16 Bit-Graustufendarstellung der Probenoberflächen als 256 Farben Bitmap dargestellt, da hierbei vom Programm keine Farbverschiebung und Aufhellung durchgeführt wird.

Die Bilder sind in der linken Spalte von Abbildung 5-49 dargestellt. Um die Kontraste zu verstärken, wurden die Farben noch mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Paint, Fa. Mikrosoft) umgekehrt und in der rechten Spalte der Abbildung dargestellt.

Auf Probe B (Partikel **PA 10**) erkennt man schon auf dem Graustufenbild den Schriftzug deutlich. Die Helligkeit der einzelnen Punkte ist jedoch unterschiedlich. Bei der Blindprobe C handelt es sich um die hydrolysierten Partikel **PA 10 H**, die ebenfalls nach der Strukturierung umgesetzt wurden. Hier erkennt man eine stärkere Hintergrundfärbung und somit einen geringeren Farbkontrast gegenüber den Partikeln und kaum unspezifische Anbindung an die strukturierte Oberfläche.

Die vor der Strukturierung umgesetzten Partikel **PA 10 FA** zeichnen sich auf A deutlich vom Hintergrund ab. Die Konzentration der einzelnen Spots ist sehr inhomogen.

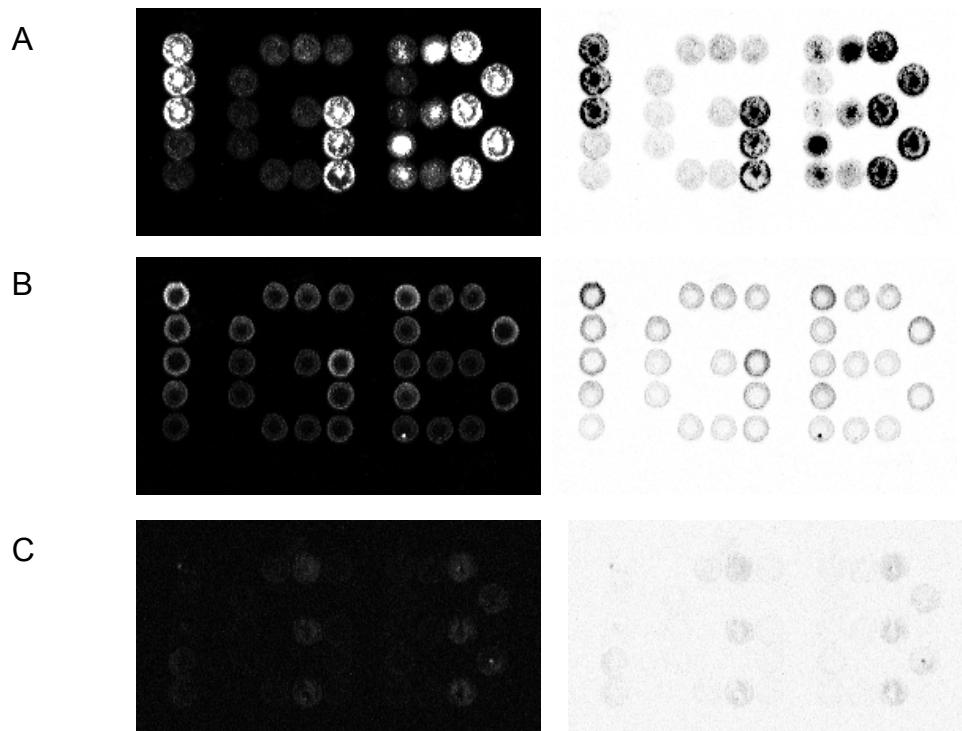


Abbildung 5-49 Ausschnitte aus dem 16 Bit-Graustufenbild der partikelbeschichteten Träger als 256 Farben Bitmap vor (linke Spalte) und nach der Farbumkehr (rechte Spalte). Verwendet wurden die Partikel **PA 10 FA** (A), **PA 10** (B) und **PA 10 H** (C). Der Durchmesser der Spots beträgt $(151 \pm 6) \mu\text{m}$ ^[176].

Diskussion der Ergebnisse zum Mikro-Spotting von Aktivesterpartikeln

Durch das Mikro-Spotting von p(MMA-co-AUPDS)-Partikeln können mikrostrukturierte Oberflächen erzeugt werden. Die Aktivester-Gruppen auf den Polymerpartikeln bleiben auch nach dem Anlagern auf eine Oberfläche reaktiv.

Die Homogenität der erzeugten Partikel-Beschichtungen ist noch nicht optimal. Eine Verbesserung könnte durch die Veränderung der Spotting-Parameter erreicht werden. So könnte zum Beispiel der Feststoffgehalt der Partikelsuspension verringert, und gleichzeitig die Anzahl der Stempelvorgänge pro spot erhöht werden.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oberflächen- und Polymerisationseigenschaften von AUPDS und MUPDS untersucht. Für die weitere Untersuchung des vorgestellten Surfmer-Konzepts wäre es interessant weitere polymerisierbare Tenside mit kürzeren Alkyl-Spacern oder anderen polymerisierbaren Gruppen in Emulsionspolymerisation zu verwenden. Zum Beispiel besitzen Maleinimid-^[177] oder Citraconimid-Gruppen eine geringe Neigung zur Homopolymerisation ($r_2 \approx 0,1$ s. Tabelle 5-2, S. 35) und sollten deshalb ebenfalls zur Surfmersynthese geeignet sein. Die Verwendung von Molekülen mit n-Hexyl- oder n-Butyl-Spacern könnte einen umfassenderen Einblick in die Beziehungen zwischen Polymerisationsverhalten und Surfmerstruktur liefern. Durch die kürzere Spacer-Länge sollten diese Moleküle polarer als AUPDS und MUPDS sein, und sich während der Emulsionspolymerisation stärker an der Oberfläche der polymerisierenden Nanopartikel befinden.

Des Weiteren ist die Synthese von Surfmeren mit Polyethylenglykol oder Oligolactidketten vielversprechend (Abbildung 6-1). Durch die Polyethylenglykol-Kette kann möglicherweise die unspezifische Adsorption von Proteinen vermindert werden, weil Polyethylenglykole die unspezifische Adsorption von Proteinen auf Oberflächen reduzieren können^[178-180]. Durch den Einsatz von Oligolactid-Einheiten können die immobilisierten Proteine kontrolliert freigesetzt werden, weil die Lactid-Kette unter physiologischen Bedingungen abgebaut wird^[27].

Neben der Immobilisierung von Streptavidin ist auch die kovalente Anbindung von weiteren Proteinen von großem Interesse. Protein G, ein Zellwandprotein, ist hier beispielsweise ein lohnendes Molekül, da mit diesem Protein IgG-Antikörper gebunden werden können, die von diagnostischem Interesse sind^[181].

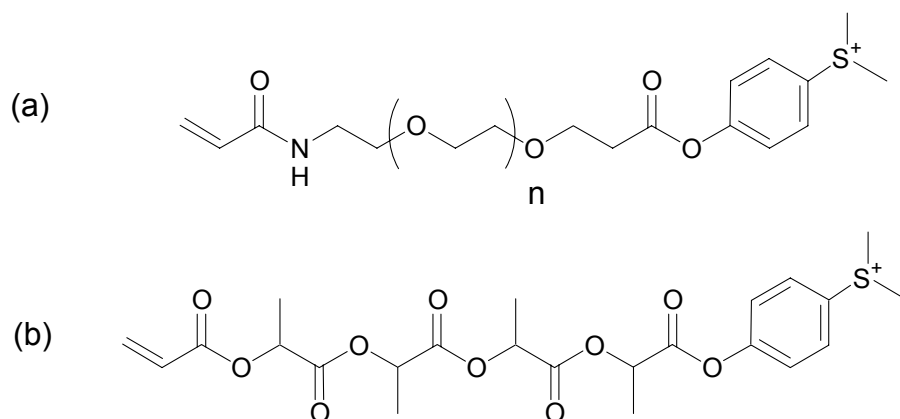


Abbildung 6-1 Acrylamid-Surfmer mit polaren Spacern. (a) Surfmer mit Polyethylenglycol-Spacer. (b) Surfmer mit bioabbaubarem Oligolactid-Spacer.

Auch die Immobilisierung eines Enzyms wäre eine interessante Anwendung der Surfmer-Partikel. Die enzymtragenden Partikel könnten dann in ein Sandwich-Membranmodul^[182] eingebettet werden, um einen Enzymreaktor darzustellen. Durch die Verwendung der Nanopartikel kann eine große Reaktionsoberfläche erzeugt werden.

Neben dem Einsatz proteophober und abbaubarer Tensid-Spacer wäre es eine reizvolle Aufgabe, nach dem Vorbild der *caged-compounds*^[183] Surfmer zu synthetisieren. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um photolabil geschützte Substanzen, die Reaktionspartner für Biomoleküle unter UV-Belichtung freisetzen. Wenn es gelingt eine solche optisch schaltbare Verbindung in das Surfmergerüst einzubauen, sollten sich damit die partikelgebundenen Proteine durch Licht von den Nanopartikeln lösen lassen. Damit könnten die Surfmer-Partikel dann nicht nur zur Immobilisierung, sondern auch zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen verwendet werden.

7 MALDI-TOF-MS-Daten

Tabelle 7-1 Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von Streptavidin nach zweistündiger Umsetzung mit AUPDS. Dem Streptavidin zugeordnete Signale (M_n) und die Differenzen zweier Signale die sich durch eine Acylierung unterscheiden ($\Delta M_{n+1} - M_n$).

Probe	M_n /(g mol ⁻¹)	$\Delta M_{n+1} - M_n$ /(g mol ⁻¹)
SAv	12978,3	
	13051,8	73,5
SAv + AUPDS 2 h, pH 7	12980,6	
	13216,9	236,3
	13456,0	239,1
	(13695,5)	239,5
SAv + AUPDS 2 h, pH 7,8	13214,6	236,3
	13457,3	(242,7)
	13695,1	237,8
	13936,9	241,8
SAv + AUPDS 2 h, pH 8,5	(13214,6)	(236,3)
	13451,6	237,0
	13688,4	236,8
	13926,5	238,1
	(14169,7)	(243,2)
Mittelwert ($\Delta M_{n+1} - M_n$)		238,5 ± 2,0

Tabelle 7-2 Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von Streptavidin nach sechzehnständiger Umsetzung mit AUPDS. Dem Streptavidin zugeordnete Signale (M_n) und die Differenzen zweier Signale die sich durch eine Acylierung unterscheiden ($\Delta M_{n+1} - M_n$).

.Probe	M_n /(g mol ⁻¹)	$\Delta M_{n+1} - M_n$ /(g mol ⁻¹)
SAv	12979,7	
	13050,4	70,7
SAv + AUPDS 16 h, pH 7	13216,8	237,1
	13454,6	237,8
	13692,4	237,8
	13931,5	239,1
SAv + AUPDS 16 h, pH 7,8	(13220,1)	(240,4)
	13457,3	237,2
	13694,7	237,4
	13934,4	239,7
	14172,3	237,9
SAv + AUPDS 16 h, pH 8,5	(13219,1)	(239,4)
	13456,8	237,7
	13694,8	238,0
	13933,0	238,2
	14170,4	237,4
Mittelwert ($\Delta M_{n+1} - M_n$)		238,2 ± 1,0

Tabelle 7-3 Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von Streptavidin nach sechzehnständiger Umsetzung mit MUPDS. Dem Streptavidin zugeordnete Signale (M_n) und die Differenzen zweier Signale die sich durch eine Acylierung unterscheiden ($\Delta M_{n+1} - M_n$).

Probe	M_n /(g mol ⁻¹)	$\Delta M_{n+1} - M_n$ /(g mol ⁻¹)
SAv	12969,7	
	13004,1	
	13038,4	
SAv + MUPDS 16 h, pH 5,9	13192,5	250,3
	13230,4	250,7
	13256,7	242,8
SAv + MUPDS 16 h, pH 7	13186,0	247,4
	13227,1	247,8
	13477,7	250,6
	13510,1	248,4
	13549,2	253,7
SAv + MUPDS 16 h, pH 7,8	13254,6	250,5
	13287,7	249,3
	13469	252,5
	13508,2	253,6
	13539,3	251,6
SAv + MUPDS 16 h, pH 8,5	13256,3	252,2
	13289,2	250,8
	13472,4	250,9
	13508,3	252,0
SAv + MUPDS 16 h, pH 8,5	13545,4	256,2
	13723,3	250,9

Probe	M_n /(g mol ⁻¹)	$\Delta M_{n+1} - M_n$ /(g mol ⁻¹)
	13756,6	248,3
	13790,6	245,2
	13830,4	250,1
Mittelwert ($\Delta M_{n+1} - M_n$)		250,4 ± 2,4

Tabelle 7-4 Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von Streptavidin nach sechzehnständiger Umsetzung mit MIHPDS. Dem Streptavidin zugeordnete Signale (M_n) und die Differenzen zweier Signale die sich durch eine Acylierung unterscheiden ($\Delta M_{n+1} - M_n$).

Probe	M_n /(g mol ⁻¹)	$\Delta M_{n+1} - M_n$ /(g mol ⁻¹)
SAv	13000	
	13072	
SAv + MIPDS 16 h, pH 5,9	13000	
	13072	
SAv + MIHPDS 16 h, pH 7	13235	195
	13256	(178)
	13268	190
	13391	190
	13409	(206)
	13456	200
Mittelwert pH 7 ($\Delta M_{n+1} - M_n$)		194 ± 5
SAv + MIHPDS 16 h, pH 7,8	13215	215
	13289	211
	13414	211

Probe	M_n /(g mol ⁻¹)	$\Delta M_{n+1} - M_n$ /(g mol ⁻¹)
	13485	197
Mittelwert pH 7,8 ($\Delta M_{n+1} - M_n$)		208 ± 8
SAv + MIHPDS 16h, pH 8,5	13214	214
	13286	214
	13422	208
	13493	207
Mittelwert pH 8,5 ($\Delta M_{n+1} - M_n$)		211 ± 4

8 Materialien

Substanz	Reinheit /%	Hersteller
11-Amino-undecansäure	98	Acros Organics (Geel, Belgien)
1-Amino-9,10-dioxo-4-[3-(2-sulfooxy-ethansulfonyl)-phenylamino]-9,10-dihydro-anthracen-2-sulfonsäure Dinatriumsalz, Remazolblau	k.A.	Acros Organics (Geel, Belgien)
2, 5- Dihydroxybenzoesäure	p.a.	Fluka (Taufkirchen)
Trifluoressigsäure-d ₁	99,5	deutero (Karlsruhe)
2,2'-Azobis (2-Methyl-Propionamidin)-di-Hydrochlorid	≥ 98	Fluka (Taufkirchen)
2,2'-Azobis [2-Methyl-N-(2hydroxyethyl)propionamid]	> 90	Wako Chemicals (Neuss)
5/6-Aminofluorescein	95	Fluka (Taufkirchen)
6-Aminohexansäure	> 99	Acros Organics
Aceton-d ₆	99	deutero (Karlsruhe)
Acetonitril ¹	99,5	Fluka (Taufkirchen)
Acrylsäurechlorid stabilisiert mit Thiodiphenylamin ³	97,0	Fluka (Taufkirchen)
Agar Agar (M 17)		Fluka (Taufkirchen)
Aluminiumoxid (Aktivität 1) Typ 507 C neutral	99	Fluka (Taufkirchen)
Biotin-4-Fluorescein # 11570	k.A.	Mo-Bi-Tec (Göttingen)
Cäsiumhydroxid	99	Fluka (Taufkirchen)
Calciumchlorid	purum	Fluka (Taufkirchen)
Chloroform-d ₁	99,8	deutero (Karlsruhe)
Dibutylfumarat	90	Acros Organics (Geel, Belgien)
Dichlormethan ¹	99,5	Merck (Darmstadt)
Dicyclohexylcarbodiimid	> 99	Fluka (Taufkirchen)

Substanz	Reinheit /%	Hersteller
Dimethylsulfoxid-d ₆	99	deutero (Karlsruhe)
<i>Escherichia coli</i> (Lebendzellzahl 5 · 10 ⁷ Zellen mL ⁻¹) DSMZ 498		Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
Essigsäureethylester	99,5	Fluka (Taufkirchen)
Ethanolamin	≥ 99	Fluka (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat	99,5	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	> 85	Merck (Darmstadt)
Kaliumperoxodisulfat ⁴	99,0	Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat	98	Fluka (Taufkirchen)
Maleinimidohexansäure	98	Fluka (Taufkirchen)
Methacrylsäurechlorid stabilisiert mit Thiodiphenylamin ³	97	Fluka (Taufkirchen)
Methylmethacrylat stabilisiert mit Hydrochinon ²	99,0	Fluka (Taufkirchen)
<i>Mikrococcus luteus</i> (Lebendzellzahl 3 · 10 ⁷ Zellen mL ⁻¹) DSMZ 348		Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
Natriumtetraborat Dekahydrat	99,5	Merck
Natriumhydroxid	97	Fluka (Taufkirchen)
n-Butylhydrazid	> 98	Lancaster, Eastgate
PDADMAC	p.a.	Mütek (Herrsching)
PES-Lösung	p.a.	Mütek (Herrsching)
p-Hydroxyphenyl-dimethylsulfoniummethylsulfate	>90 %	Sanceler DSP; Sanshin Chemical Industrial Co. Ltd.
PVP-Jod		FhG IGB (Stuttgart)
Salzsäure konz.	p.a.	Fluka (Taufkirchen)

Substanz	Reinheit /%	Hersteller
Sinapinsäure	99	Fluka (Taufkirchen)
Streptavidin	k. A.	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Styren ⁵	99,5	Fluka (Taufkirchen)
Tween 80 [®]	> 90	Fluka (Taufkirchen)
Undecensäure	98 %	Aldrich (Taufkirchen)

¹ Getrocknet über Molsieb UOP A4, Fluka (Taufkirchen).

² Gereinigt durch Ausschütteln mit Natriumhydroxid-Lösung (10 %) und Wasser, anschließend über Calciumchlorid getrocknet und destilliert.

³ Durch Destillation im Vakuum gereinigt.

⁴ Zweimal im Wasser umkristallisiert.

⁵ Aufgereinigt durch Schütteln mit Natriumhydroxid-Lösung (10 %) und Destillation im Vakuum. Direkt vor dem Einsatz wurde das Styren durch eine kurze Chromatographiesäule mit Aluminiumoxid gereinigt.

Nur Wasser mit einem Leitwert von $>18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ wurde verwendet.

Phosphatpuffer = 500 mL Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH-Werte 7; 7,5 und 8 eingestellt. Die einzelnen Lösungen wurden mit Wasser auf je 1 L aufgefüllt.

9 Geräte

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem Avance DPX 250 (250 MHz) NMR-Spektrometer (Bruker, Billerica, USA) aufgenommen. Die Proben wurden dazu in deuterierten Lösemitteln gelöst. Um die gefriergetrockneten p(MMA-co-AUPDS)-Proben zu lösen wurde eine Mischung aus Aceton- d_6 / TFA- d_1 (5:1) verwendet.

Die Integration der Signale bei 7,5–8,1 ppm (4 H, Phenyl-Gruppe des aktivierten Esters) und bei 3,6 ppm (3 H, $-\text{OCH}_3$ von MMA) lieferte den prozentualen Anteil des Surfmers im p(MMA-co-AUPDS).

IR-Spektroskopie

Infrarot-Spektren wurden mit einem Perkin Elmer (Shelton, USA) „Spectrum 1000“ FT-IR Spektrometer aufgenommen. Die organischen Verbindungen wurden dazu mit Kaliumbromid vermischt und zu Presslingen verarbeitet.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen (C, H, N, S) wurde mit einem „Vario EL“ (ELEMENTAL, Hanau, Deutschland) Elementaranalysator durchgeführt. Dazu wurden je 4-20 mg der Proben abgewogen, in Zinn-Folie verpackt und bei 1200 °C in Sauerstoffatmosphäre verbrannt.

Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit

Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf einem Standardnährmedium folgender Zusammensetzung kultiviert:

E. coli: Pepton aus Fleisch, 5,0 g, Fleischextrakt, 3,0 g auf 1000 ml Wasser. pH-Wert 7,0.

M. luteus: Pepton aus Casein, 5,0 g, Hefeextrakt, 2,5 g, Glucose, 1,0 g auf 1000 ml Wasser. pH-Wert 7,0. Bei Bedarf wurde Agar, 15,0 g zur Verfestigung zugegeben.

Der Agardiffusionstest wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Proben wurden in steigenden Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} bis 100 mg mL^{-1} eingesetzt und dazu in sterilem Wasser gelöst.

Zur Vorbereitung der Tests wurde Agarmedium mit definierter Schichtdicke in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Nährmediums wurden zylindrische Löcher gestanzt, in die jeweils 100 μL der zu prüfenden Flüssigkeit pipettiert wurden. Die

auf der gesamten Platte aufgetragenen Mikroorganismen wurden zum Wachstum gebracht und nach mehreren Tagen die Bildung von sogenannten Hemmhöfen ausgewertet. Anhand der Bildung und der Durchmesser der Hemmhöfe wurde auf antimikrobielle Aktivität geschlossen.

Messung der Partikelgröße und des ζ -Potentials

Der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser (z-Average), \bar{d}_{DLs} wurde durch Photonenkorrelationsspektroskopie mit dem Zetasizer HS 3000[®] (Malvern, Herrenberg, Deutschland) bestimmt. Die Messung des ζ -Potentials erfolgte mit demselben Gerät im Mikroelektrophorese-Modus, wobei die zu messenden Partikel in Phosphatpuffer (pH = 7,0 $c_{\text{Phosphat}} = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) redispergiert vorlagen.

Oberflächenspannungsmessungen

Die Oberflächenspannungsmessungen der Surfmertlösungen wurden mit dem Tensiometer K12 der Firma Krüss, Hamburg durchgeführt. Die Messstation ist aus einem Prozessor, alternativ auch aus einem PC, einer Feinwaage mit Platinplättchen, einem temperierbaren automatisierten Probenstisch mit Rührer und einem Thermostat aufgebaut. Die schrittweise Zugabe der gesättigten Surfmertlösung zu destilliertem Wasser erfolgte mit einem Dosimat 765 (Metrohm, Herisau, Schweiz)

Die Steuerung und die Datenerfassung wurde über den PC mit dem Programm Krüss K122 vorgenommen. Die Platinplatte, mit den Abmessungen 19,9 x 0,2 mm, wurde vor Gebrauch durch Reinigung mit Wasser, Ethanol, Aceton und durch anschließendes Ausglühen über einer Methanolflamme von den gesamten Verunreinigungen befreit. Pro Probe werden 10 Messungen aufgenommen und der Mittelwert ausgegeben.

Massenspektrometrie

Es wurde ein MALDI-TOF-MS Massenspektrometer (modifiziertes HP-System 2025A der Firma GSG-Analytics, Bruchsal, Deutschland) mit TLF-Einheit und LeCroy 9350 CM-Oszilloskop verwendet. Die lineare Zweiparameter-Kalibrierung erfolgte intern durch Verwendung von geeigneten Peptiden (Insulin, Cytochrom C etc.).

Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzintensität von fluoreszierenden Partikelsuspensionen und Lösungen wurde mit dem Fluoreszenzreader "Spectra Fluor Plus" (Tecan, Crailsheim, Germany) bei

einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie

Ein hochauflösendes Rasterelektronenmikroskop "LEO 1500" (Leo, Cambridge, UK) ausgestattet mit einer Gemini Säule wurde zur Abbildung der Polymerpartikel verwendet.

Polyelektrolyttitration

Die Polyelektrolyttitrationen wurden mit einem PCD 3 PH (Mütek, Herrsching, Deutschland) Partikelladungsdetektor ausgestattet mit einem Titrino 702 SM Titrator (Metrohm, Herisau, Schweiz) angefertigt. Die Titration der Probe erfolgte mit 1 mmol L⁻¹ PDADMAC- und NaPES-Lösungen, die ebenfalls von der Firma Mütek bezogen wurden.

Titrationsskalorimetrie

Die Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) wurde bei 25 °C mit einem Kalorimeter der Firma Thermometrics AB (Järfälla, Sweden) durchgeführt. Das Gerät war ausgestattet mit einer Titrationseinheit und einem Nanowatt-Verstärker (Typ 2277). Als Reaktionsgefäß wurde ein 1 mL Edelstahlgefäß mit einem Propellerrührer (Gold) verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software DIGITAM 4.1 der Thermometric AB (Järfälla, Sweden).

Mikro-Spotting von Siliciumwafern

Die Strukturierungsversuche wurden mit dem Pin-Ring Spotter GMS 417 (Affymetrix, Santa Clara, USA) mit einer 4-fachen Nadel-Ring-Einheit durchgeführt. Der Abstand zwischen den Standardnadeln mit einem Durchmesser von 125 µm beträgt 9 mm. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots einer Nadel ist im *Array*-Modus beliebig programmierbar. Es muss jedoch der mögliche laterale Fehler der Pin-Ring-Einheit in der x-y-Ebene von 10 µm beachtet werden, um ein Überschneiden der einzelnen Spots zu verhindern. Für die Surfmerpartikel wurden entgegengesetzt zu ihrer Ladung SPS- oder PDADMAC-Oberflächen erzeugt. Zur Strukturierung auf Silizium klebt man die beschichteten Wafer mit einem wasserunlöslichen Kleber auf die Glasobjektträger.

Der Mikroarray-Laserscanner GMS 418 Array Scanner (Affymetrix, Santa Clara, USA) arbeitet mit der konfokalen Technik. Ein Laserstrahl der Wellenlänge $\lambda = 532$ nm mit einer Leistung $P \geq 8$ mW tastet die komplette Oberfläche der mikrostrukturierten Glasobjektträger ab. Mittels bewegter konfokaler Linse wird das reflektierte langwelligere Licht mit einem Photo Multiplier Tube detektiert. Hiermit erreicht man eine

Nachweisgrenze des Fluorochromes „Cy3“ von weniger als einem Molekül pro μm^2 , die Auflösung beträgt $10 \mu\text{m}$ pro Pixel. Die Bilder werden als 16 Bit Graustufenbilder abgespeichert.

Die erstellten Muster und Punkte werden mit dem Programm analySIS (Soft Imaging Systems, Berlin) am Computer ausgewertet.

10 Literatur

- [1] Sherrington, D. C. Preparation, structure and morphology of polymer supports. *Chem. Commun.* **1998**, 2275-2286.
- [2] Rapp, W. E. Macro Beads as Microreactors: New Solid-Phase Synthesis Methodology. *Combinatorial Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1997; pp 65-94.
- [3] Kreuter, J. Colloidal Drug Delivery Systems. In *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*; Swarbrick, S. Ed.; Marcel Dekker: New York, 1994; pp 353.
- [4] Pieters, B. R.; Williams, R. A.; Webb, C.; Longo-Gonzalez, M. A. Formation and surface engineering of magnetic polymer beads for large scale bio-process applications. *Adv. Meas. Control Colloidal Processes*; Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1991; pp 172-186.
- [5] Piskin, E.; Kiremitci, M.; Denkbass, E. B.; Gurhan, I.; Gombotz, W. R.; Hoffmann, A. S. Cell Culturing on Polymeric Beads. *Clinic. Mater.* **1992**, *11*, 171-178.
- [6] Müller-Schulte, D. Novel Magnetic Micro- and Nanoparticles for Biomedical Separation and as Means for a New Approach to AIDS Therapy. *Magnetic and Electrical Separation* **2000**, *10*, 141-159.
- [7] Kawaguchi, H. Functional polymer microspheres. *Progress in Polymer Science* **2000**, *25*, 1171-1210.
- [8] Asua, J. M.; Schoonbrood, H. A. S. Reactive surfactants in heterophase polymerisation. *Acta Polym.* **1998**, *49*, 671-686.
- [9] Schoonbrood, H. A. S.; Asua, J. M. Reactive Surfactants in Heterophase Polymerization. 9. Optimum Surfmer Behavior in Emulsion Polymerization. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6034-6041.
- [10] Unzué, M. J.; Schoonbrood, H. A. S.; Asua, J. M.; Goni, M. A.; Sherrington, D. C.; Stähler, K.; Goebel, K.-H.; Tauer, K.; Sjöberg, M.; Holmberg, K. Reactive Surfactants in Heterophase Polymerization. VI. Synthesis and Screening of Polymerizable Surfactants (Surfmers) with Varying Reactivity in High Solids Styrene-Butyl Acrylate-Acrylic Acid Emulsion Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 1803-1820.
- [11] Tauer, K.; Zimmermann, A. New reactive polymeric stabilizers for emulsion polymerisation. *Macromol. Rapid Communications.* **2000**, *21*, 825-831.
- [12] Montoya-Goni, A.; Sherrington, D. C. Reactive surfactants in heterophase polymerization. XXIII. Synthesis and characterization of novel dialkyl maleate cationic surfmers. *Polymer* **1999**, *40*, 1067-1079.

-
- [13] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: San Diego, 1995; 785.
- [14] Wang, P. H.; Pan, P. C. Y. Emulsion Copolymerisation of styrene with acrylic or methacrylic acids - distribution of the carboxylic group. *Coll. Polym. Sci.* **2001**, *279*, 98-103.
- [15] Vanderhoff, J. W. Semi-continuous emulsion Polymerization. *Future Direct. Polym. Colloids*; Martinius Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987; pp 23-45.
- [16] Thurmond, K. B.; Kowalewski, T.; Wooley, K. L. Shell Cross-Linked Knedels: A Synthetic Study of the Factors Affecting the Dimensions and Properties of Amphiphilic Core-Shell Nanospheres. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6656-6665.
- [17] Qhogosheane, M.; Santra, S.; Zhang, P.; Tan, W. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst* **2001**, *126*, 1274-1278.
- [18] Kouge, K.; Koizumi, T.; Okai, H.; Kato, T. Peptide Synthesis in Aqueous Solution. I. Application of-Dialkyl-sulfoniumphenols as a Water-Soluble Coupling Reagent. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2409-2418.
- [19] Kouge, K.; Soma, H.; Katakai, Y.; Okai, H.; Tekemoto, M.; Muneoka, Y. Peptide Synthesis in Aqueous Solution. II. Synthesis and Biological Activity of a Molluscan Neuropeptide, FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) Analogs for N-Terminal Moiety. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 4343-4349.
- [20] Seki, T.; Aoi, K.; Okida, M.; Shiogai, Y. Synthesis of chitin derivates having peptide side groups by the water-soluble active ester method. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 439-446.
- [21] Smith, W. V.; Ewart, R. H. Kinetics of emulsion polymerization. *J. Chem. Phys.* **1948**, *16*, 592.
- [22] Harkins, W. D. A general theory of the reaction loci in emulsion polymerization. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 381-382.
- [23] Lovell, P. A.; El-Aasser, M. S. *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*; John Wiley and Sons: New York, 1997; pp 801.
- [24] Fitch, R. M.; Tsai, C. H. *Polymer Colloids*; Plenum Press, 1997.
- [25] Sinha, V. R.; Trehan, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release* **2003**, *90*, 261-280.
- [26] Lamprecht, A.; Ubrich, N.; Perez, M. H.; Lehr, C.-M.; Hoffmann, M.; Maincent, P. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *196*, 177-182.
- [27] Panyam, J.; Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 329-347.

-
- [28] Schiestel, T.; Hammer, A.; Pfizenmaier, K.; Brunner, H.; Tovar, G. Synthese und Oberflächenfunktionalisierung von Silica-Nanopartikeln zur Proteinimmobilisierung. *100. Bunsentagung, Dt. Ges. Physikal. Chemie*: Stuttgart, 2001.
- [29] Qhobosheane, M.; Santra, S.; Zhang, P.; Tan, W. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst* **2001**, *126*, 1274-1278.
- [30] Stöber, W.; Fink, A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Coll. Interface Sci.* **1968**, *8*, 62.
- [31] Blackley, D. C. *Polymer latices; Science and technology*; second edition ed.; Chapman & Hall: 2-6 Boundary Ros, London UK, 1997; 168-182.
- [32] Wang, Q.; Shoukuan, F.; Tongyin, Y. Emulsion Polymerization. *Progress in Polymer Science* **1994**, *19*, 703-753.
- [33] Schiestel, T.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M. Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Chemistry and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2003**, sent for publication.
- [34] Caelen, I.; Gao, H.; Sigrist, H. Protein Density Gradients on Surfaces. *Langmuir* **2002**, *18*, 2463 -2467.
- [35] Chen, J.-P.; Su, D.-R. Latex Particles with Thermo-Flocculation and Magnetic Properties for Immobilization of -Chymotrypsin. *Biotechnology Progress* **2001**, *17*, 369 -375.
- [36] Hashemzadeh, A. Preparation and Characterization of Latices with Hydrophobic core and Hydrophilic shell. *Macromol. Symp.*; Hüthig & Wepf Verlag, 1992; pp 392-396.
- [37] Korri-Youssoufi, H.; Richard, C.; Yassar, A. A new method for the immobilisation of antibodies in conducting polymers. *Materials Science and Engineering: C* **2001**, *15*, 307-310.
- [38] Chang, Y.-A.; Gee, A.; Smith, A.; Lake, W. Activating Hydroxyl Groups of Polymeric Carriers Using 4-Fluorobenzenesulfonyl Chloride. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 200-202.
- [39] Takahashi, K.; Suzuki, M.; Kido, J.; Kuramoto, N.; Nagai, K. Alternating Copolymerization of a surface-active monomer having an active ester group with dialkyl fumarates. *Polymer* **1995**, *36*, 4675-4681.
- [40] Arora, A.; Daniels, E. S.; El-Aasser, M. S. Synthesis and Characterization of Core / Shell Ionomeric Latexes. I. Latex and Film Properties. *Journal of Applied Polymer Science* **1995**, *58*, 301-311.

-
- [41] Roulstone, B. J.; Wilkinson, M. J.; Hearn, J. Studies on polymer latex films: II. Effect of surfactants on the water vapor permeability of polymer latex films. *Polym. Intern.* **1992**, *27*, 43-50.
- [42] Tauer, K.; Goebel, K. H.; Kosmella, S.; Staehler, K.; Neelsen, J. Emulsion polymerization in the presence of polymerizable emulsifiers and surface active initiators. *Makromol. Chem., Macromol. Symp* **1990**, *Volume Date 1989*, *31*, 107-121.
- [43] Tauer, K.; Wedel, A.; Morozova, E. M. Synthesis of nitro group-containing copolymers in radical copolymerization. *Makromol. Chem.* **1992**, *193*, 1387-1398.
- [44] Guyot, A.; Tauer, K. Reactive Surfactants in Emulsion Polymerization. *Adv. Polym. sci.* **1994**, *111*, 43-65.
- [45] Wang, X.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. Emulsion Polymerization of Styrene Using a Reactive Surfactant and Its Polymeric Counterpart: Kinetic Studies. *Macromolecules* **2001**, *34*, 7715-7723.
- [46] Shiraishi, K.; Ohnishi, T.; Sugiyama, K. Preparation of poly(methyl methacrylate) microspheres modified with amino acid moieties. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 2023-2028.
- [47] Amalvy, J. I.; Unzue, M. J.; Schoonbrood, H. A. S.; Asua, J. M. The use of polymerizable surfactants in emulsion copolymerizations for coatings applications. *An. CIDEPINT* **1998**, 1-15.
- [48] Guyot, A. Recent advances and challenges in the synthesis of polymer colloids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, *153*, 11-21.
- [49] Guyot, A. Polymerizable surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 580-586.
- [50] Guyot, A. Recent progress in reactive surfactants in emulsion polymerization. *Macromolecular Symposia* **2002**, *179*, 105-132.
- [51] Ito, K.; Yokohama, S.; Arakawa, F. Poly(ethylene oxide) macromonomers 5. Dodecyloxy poly(ethylene glycol) methacrylate as an amphiphilic macromonomer for dispersion polymerization. *Polymer Bulletin* **1986**, *16*, 345-349.
- [52] Guillaume, J. L.; Pichot, C.; Guillot, J. Emulsifier-Free Emulsion Copolymerization of Styrene and Butyl Acrylate. III. Kinetic Studies in the Presence of a Surface Active Comonomer, the Sodium Acrylamido Undecanoate. *J. Polym. Sci. A* **1990**, *28*, 137-152.
- [53] Babak, V. G.; Pavlov, A. N.; Svitova, T. F.; Danilenko, A. N.; Egorov, V. V.; Varlamova, E. A. Surface Properties and Micellization in Aqueous Solutions of

- Homologous Series of Cationic Surface-Active Monomers. *Colloid Journal (Translation of Kolloidnyi Zhurnal)* **1996**, *58*, 5-12.
- [54] Tsaur, S. L.; Fitch, R. M. Preparation and Properties of Polystyrene Model Colloids I. Preparation of Surface-Active Monomer and Model Colloids Derived Therefrom. *J. Coll. Interf. Sci.* **1987**, *115*, 450-462.
- [55] Schipper, E. T. W. M.; Sindt, O.; Hamaide, T.; Lacroix Desmazes, P.; Mueller, B.; Guyot, A.; Van den Enden, M. J. W. A.; Vidal, F.; Van Es, J. J. G. S.; German, A. L.; Montaya Goni, A.; Sherrington, D. C.; Schoonbrood, H. A. S.; Asua, J. M.; Sjoeborg, M. Reactive surfactants in heterophase polymerization for high-performance polymers. Part 1. Synthesis of functionalized poly(ethylene oxide)-b-poly(butylene oxide) copolymers as surfmers, inisurfs, and transurfs in heterophase polymerization. *Colloid & Polymer Science* **1998**, *276*, 402-411.
- [56] Charreyre, M. T.; Boullanger, P.; Delair, T.; Mandrand, B.; Pichot, C. Preparation and characterization of polystyrene latexes bearing disaccharide surface groups. *Colloid Polymer Science* **1993**, *271*, 668-679.
- [57] Nagai, K.; Ohashi, T.; Kaneko, R.; Taniguchi, T. Preparation and applications of polymeric microspheres having active ester groups. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, *153*, 133-136.
- [58] Takahashi, K.; Kido, J.; Kuramoto, N.; Nagai, K. Synthesis and Interfacial Properties of Polymerizable and Nonpolymerizable Surfactants Having an Active Ester Group. *J. Coll. Interf. Sci.* **1995**, *172*, 63-70.
- [59] Takahashi, K.; Nagai, K. Preparation of reactive polymeric microspheres by seeded copolymerization using a polymerizable surfactant bearing an active ester group. *Polymer* **1996**, *37*, 1257-1266.
- [60] Taniguchi, T.; Ohashi, T.; Yamaguchi, K.; Nagai, K. Chemical Immobilization of Polymeric Microspheres onto Inorganic Solid Surfaces. *Macromol. Symp.* **2000**, *151*, 529-534.
- [61] Yamaguchi, K.; Taniguchi, T.; Kawaguchi, S.; Nagai, K. Immobilization of cationic polymer particles having active ester groups onto solid surfaces. *Coll. Polym. Sci.* **2002**, *280*, 942-948.
- [62] Nagai, K.; Okada, K.; Kido, J. Radical Copolymerization of an Electron-Accepting Monomer, Methyl cis- β -Cyanoacrylate, with Styrene or Acrylonitrile. *J. Polym. Sci. A* **1992**, *30*, 1187-1192.
- [63] de la Cal, J.; Asua, J. M. Modelling Emulsion Polymerization Stabilized by Polymerizable Surfactants. *Journal of Polymer Science Part A Polymer Chemistry* **2001**, *39*, 585-595.

- [64] Juang, M.; Krieger, I. M. Emulsifier-Free Emulsion Polymerization with Ionic Comonomer. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1976**, *14*, 2089-2107.
- [65] Urquiola, M. B.; Dimonie, V. L.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate Using a Polymerizable Surfactant. II Polymerization Mechanism. *J. Polym. Sci. A* **1992**, *30*, 2631-2644.
- [66] Miyamoto, K.; Tokita, M.; Komai, T. Novel Cross-Linking Agents for Hydrogelation of Biological Polymers. *Prot. Pept. Letters* **2001**, *8*, 231-236.
- [67] Herold, M.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M. Aktivester Surfmerer-Intelligente Moleküle zur Herstellung neuer Polymernanopartikel für die Biokonjugation. *18. Stuttgarter Kuststoffkolloquium*; Universität Stuttgart: Stuttgart, 2003; pp 1/V6.1-1/V6.5.
- [68] Arndt, K.-F.; Müller, G. *Polymercharakterisierung*; Hanser: München, Wien, 1996; pp 176-188.
- [69] Nietsche, R. *Malvern Partikelcharakterisierung*; Herrenberg, 1999.
- [70] Born, M. *Optik*; 3 ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 1985; 591.
- [71] Moore, W. J. *Physikalische Chemie*; 4th ed.; Walter de Gruyter: Berlin, 1986; 1236.
- [72] Hamann, C. H.; Vielstich, W. *Elektrochemie*; 3rd. ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998; 602.
- [73] Koryta, J.; Dvorák, J.; Bohácková *Lehrbuch der Elektrochemie*; Springer Verlag: Wien, 1975; 348.
- [74] Müller, R. H. *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*; Wiss. Verlags Ges.: Stuttgart, 1996; 254.
- [75] Marlow, B. J.; Rowell, L. R. Electrophoretic Fingerprinting of a Single Acid Site Polymer Colloid Latex. *Langmuir* **1991**, *7*, 2970-2980.
- [76] Schwarz, S.; Lunkwitz, K.; Keßler, B.; Spiegler, U.; Killmann, E.; Jaeger, W. Adsorption and stability of colloidal silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *163*, 17-27.
- [77] Henry, D. C. The Cataphoresis of Suspended Particles. Part I. The Equation of Cataphoresis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A* **1931**, *133*, 106-129.
- [78] Böckenhoff, K.; Fischer, W. R. Determination of electrokinetic charge with a particle-charge detector, and its relationship to the total charge. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 670-674.
- [79] Dörfler, H.-D. *Grenzflächen- und Kolloidchemie*; 1 ed.; VCH: Weinheim, 1994; 597.
- [80] Brezesinski, G.; Mögel, H.-J. *Grenzflächen und Kolloide: physikalisch-chemische Grundlagen*; Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg, 1993; 269.

- [81] Rosen, M. J. The Relationship of Structure to Properties in Surfactants IV. Effectiveness in Surface or Interfacial Tension Reduction. *J. of Colloid and Interface Science* **1976**, *56*, 320-327.
- [82] Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1989; 431.
- [83] Kricka, L. J. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clinica Chimica Acta* **2001**, *307*, 219-223.
- [84] Karas, M.; Bahr, U.; Ingendoh, A.; Hillenkamp, F. Laserdesorptions-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100 000 und 250 000 Dalton. *Angewandte Chemie* **1989**, *101*, 805-806.
- [85] Cohen, L. R.; Strupat, K.; Hillenkamp, F. Analysis of Quaternary Protein Ensembles by Matrix-assisted Laser Desorption /Ionization Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 1046-1052.
- [86] Barbacci, D. C.; Edmondson, R. D.; Russell, D. H. Evaluation of the variables that affect resolution in delayed extraction MALDI-TOF. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process* **1997**, *165/166*, 221-235.
- [87] Bantscheff, M.; Glocker, M. O. MALDI-Massenspektrometrie in der Proteomforschung. *Biospektrum* **2001**, *7*, 250-252.
- [88] Tovar, G. E. M.; Schiestel, T.; Hoffmann, C.; Schmucker, J. Protein biochips for affinity-MALDI-TOF-mass spectrometry. *Bioforum Internatl.* **2001**, *5*, 235-237.
- [89] Goldstein, J. I.; Newbury, D. I.; Echlin, P.; Joy, D. C. *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*; 2 ed.; Plenum Press: New York, 1992; 820.
- [90] Calvet, E.; Prat, H. *Recent Progress in Microcalorimetry*; Pergamon Press: London, 1963.
- [91] Denoyel, R. Microcalorimetry and ellipsometry in surfactant adsorption studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2002**, *205*, 61-71.
- [92] Wadsö, I.; Goldberg, R. N. Standards in Microcalorimetry. *Pure and Applied Chemistry* **2001**, *73*, 1625-1639.
- [93] Weber, P. C.; Wendoloski, J. J.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. Crystallographic and Thermodynamic Comparison of Natural and Synthetic Ligands Bound to Streptavidin. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3197-3200.
- [94] Wang, G.; Pelton, R.; Zhang, J. Sodium dodecyl sulfate binding to poly(N-isopropylacrylamide) microgel latex studied by isothermal titration calorimetry. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, *153*, 335-340.

- [95] Cowie, J. M. G. *Chemie und Physik der synthetischen Polymere*; Vieweg: Braunschweig, 1997; 489.
- [96] Price, C. C. The Influence of Structure on the Relative Reactivity of Free Radicals in Polymerisation Systems. *Disc. Faraday Soc.* **1947**, 2, 304-309.
- [97] Olivé, G. H.; Olivé, S. *Polymerisation*; Verlag Chemie: Weinheim, 1969; 227.
- [98] Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999.
- [99] Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999; pp S. 311.
- [100] Voss, J. The chemistry of thio acid derivatives. *The chemistry of acid derivatives*; John Wiley & Sons: Chichester, 1979; pp 1022-1063.
- [101] Janssen, M. J. Thiolo, Thiono and dithio acids and esters. *The chemistry of carboxylic acids and esters*; Interscience-Publishers: London, 1969; pp 724-728.
- [102] Myers, D. *Surfactant science and technology*; VCH: Weinheim, 1988; pp 244.
- [103] Urquiola, M. B.; Dimonie, V. L.; Sudol, E. D.; El-Asser, M. S. Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate Using a Polymerizable Surfactant. III. Mathematical Model. *Journal Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1993**, 31, 1403-1415.
- [104] Orbay, M.; Laible, R.; Dulog, L. Preparation of Amine Groups Containing Copolymers of Methylmethacrylate and their Performance in solid Polymer Composites. *Makromol. Chem.* **1982**, 183, 47-63.
- [105] Saini, G.; Leoni, A.; Franco, S. Solvent Effects in Radical Copolymerization 1. Acrylamid. *Makromol. Chem.* **1971**, 144, 235-244.
- [106] Jordan, E. F.; Bennet, R.; Shuman, A. C.; Wrigley, J. Reactivity Ratios and Copolymerization Parameters for Copolymers Incorporating n-Octadecyl Acrylate and n-Octadecylacrylamid. *J. Polym. Sci. A-1* **1970**, 8, 3113-3121.
- [107] Crauwels, K.; Smets, G. Copolymérisation de dérivés méthacryliques. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1950**, 59, 443-448.
- [108] Crauwels, K.; Smets, G. Polymères de la méthacrylamide. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1950**, 59.
- [109] Saini, G.; Leoni, A.; Franco, S. Solvent Effects in Radical Copolymerization III. Methacrylamide. *Makromol. Chem.* **1971**, 147, 213.
- [110] Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999; pp S. II / 231.
- [111] Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1999; pp S. II / 258.

-
- [112] Badiger, M. V.; Lele, A. K.; Bhalerao, V. S.; Varghese, S.; Mashelkar, R. A. Molecular tailoring of thermoreversible copolymer gels: Some new mechanistic insights. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 1175-1184.
- [113] Gallot, B.; Marchin, B. Synthesis and liquid-crystalline behaviour of liposaccharide based comb polymers. *Liquid Crystals* **1989**, *5*, 1729-1735.
- [114] Steglich, W.; Neises, B. Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren. *Angew. Chemie* **1978**, *90*, 556-557.
- [115] Bordwell, F. G.; Boutan, J. P. Conjugative Effects of Dimethylsulfonio and Trimethylammonio Groups. *JACS* **1956**, *78*, 87-91.
- [116] Malliaris, A. Effect of n-Alkane Additives on the Micellation of Ionic Surfactants. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6511-6515.
- [117] Myers, D. *Surfactant science and technology*; VCH: Weinheim, 1988; pp 107.
- [118] Argarana, C. E.; Kuntz, I. D.; Birken, S.; Axel, R.; Cantor, C. R. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Research* **1986**, *14*, 1871-1882.
- [119] Savage, M. D.; Mattson, G.; Desai, S.; Nielander, G. W.; Morgensen, S.; Conklin, E. J. *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*; Pierce Chemical Company: Rockford, 1992.
- [120] Freitag, S.; Trong, I. L.; Chilkoti, A.; Klumb, L. A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidine-biotine complex. *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 211-221.
- [121] Hendrickson, W. A.; Pahler, A.; Smith, J. L.; Satow, Y.; Meritt, E. A.; Phizackerley, R. P. Crystal Structure of Core Streptavidin Determined from Multivavelength Anomalous Diffraction of Synchrotron Radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 2190-2194.
- [122] Günzler, H. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*; 3 ed.; VCH: Weinheim, 1996; 397.
- [123] Matsui, S.; Aida, H. Hydrolysis of Some N-Alkylmaleimides. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions II* **1978**, *37*, 1277-1280.
- [124] Tashiro, T. Antibacterial and Bacterium Adsorbing Macromolecules. *Macromolecular Materials and Engineering* **2001**, *286*, 63-87.
- [125] Clement, J. L.; Jarret, P. S. Antibacterial Silver. *Metal Based Drugs* **1994**, *1*, 467-482.
- [126] Mlangeni, D.; Daschner, F. Povidone-iodine. Evaluation of povidone-iodine as an antiseptic. *Antiinfect. Drugs Chemother.* **1995**, *13*, 161-167.
- [127] Shiratisuchi, M.; Kawamura, K.; Kunieda, H.; Machida, N.; Akashi, T.; Higashimurama; Nagakura, M. Methylmethioninsulfoniumverbindungen. In *DE 2821704*; Kowa Co., Ltd., Nagoya, Aichi (Japan): Deutschland, 1977.

- [128] Klimenko, S. K.; Stolbova, T. V.; Kulikova, L. K. Synthesis and the antimicrobial and antiphage activity of sulfonium and oxosulfonium salts of condensed thianes and thiacyclohexene. *Pharmaceutical Chemistry Journal (Translation of Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal)* **2001**, *35*, 22-25.
- [129] Kanezawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. Antibacterial activity of polymeric sulfonium salts. *J. Polym. Sci. A* **1993**, *31*, 2873-2876.
- [130] Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemie*; 1 ed.; VCH: Weinheim, 1992; 1237.
- [131] Pham, Q. T.; Petiaud, R.; Waton, H.; Llauro-Darricades, M.-F. *Proton and carbon NMR spectra of polymers*; CRC Press: Boca Raton, 1991; pp 52-53.
- [132] Chemicals, W. *Azo Polymerization Initiators - Product Information VA-086*; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.: Osaka, 2000.
- [133] Matsumoto, A.; Kimura, T. *J. Macromol. Sci. Chem. A* **1996**, *33*, 1049.
- [134] Gilbert, R. G. *Emulsion Polymerisation: A Mechanistic Approach*; Academic Press: San Diego, 1995; 362.
- [135] Chern, C. S.; Lin, C. H. Particle nucleation loci in emulsion polymerization of methyl methacrylate. *Polymer* **2000**, *41*, 4473-4481.
- [136] Zimehl, R. Emulsionspolymrisationen Darstellung, Eigenschaften und Stabilität kolloidaler Polymere. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*; Christian-Albrechts Universität: Kiel, 1986; pp 206.
- [137] Ugelstad, J.; Hansen, F. K. Kinetics and Mechanism of Emulsion Polymerization. *Rubber Chemistry and Technology* **1976**, *49*, 536-609.
- [138] Moore, G. G.; Foglia, T. A.; McGahan, T. J. Preparation of Hindered Esters by the Alkylation of Carboxylate Salts with Simple Alkyl Halides. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2425-2429.
- [139] Herrera-Ordóñez, J.; Olayo, R. On the kinetics of styrene emulsion polymerization above CMC. II. Comparison with experimental results. *Journal of Polymer science: Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 2219-2231.
- [140] Herrera-Ordóñez, J.; Olayo, R. On the kinetics of styrene emulsion polymerization above CMC. I. A mathematical model. *Journal of Polymer science: Part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 2201-2218.
- [141] Fontenot, K.; Schork, F. J. Simulation of Mini/Macro Emulsion Polymerizations I. Development of the Model. *Polymer Reaction Engineering* **1992**, *1*, 75-109.
- [142] Fontenot, K.; Schork, F. J. Simulation of mini/macro emulsion polymerization. II Sensitivities and experimental comparison. *Polymer Reaction Engineering* **1993**, *1*, 289-342.
- [143] Zhang, M.-G.; Weng, Z.-X.; Huang, Z.-M.; Pan, Z.-R. Emulsion copolymerizations of MMA/BA in the presence of surface active monomers. (II) Kinetics and

- polymerization mechanism. *Ganguang Kexue Yu Guang Huaxue* **2000**, *21*, 148-151.
- [144] Amalvy, J. I.; Unzue, M. J.; Schoonbrood, H. A. S.; Asua, J. M. Reactive Surfactants in Heterophase Polymerization. 11. Particle Nucleation. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5631-5638.
- [145] Guillaume, J. L.; Pichot, C.; Guilot, J. Emulsifier-free emulsion copolymerization of styrene and butyl acrylate. III. Kinetic studies in the presence of a surface active comonomer, the sodium acrylamido undecanoate. *J. Polym. Sci. A* **1990**, *23*, 137-152.
- [146] Dullweber, F. Strukturelle und physikochemische Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin. In *Fachbereich Pharmazie*; Philipps-Universität Marburg: Marburg, 2000.
- [147] Patai, S. The chemistry of amidines and imidates. In *The chemistry of functional groups*; John Wiley & Sons: London, 1975.
- [148] Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*; 4 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1997; 1070.
- [149] Peula, J. M.; Fernández-Barbero, A.; Hidalgo-Álvarez, R.; de las Nieves, F. J. Comparative Study on the Colloidal Stability Mechanism of Sulfonate Latexes. *Langmuir* **1997**, *13*, 3938-3943.
- [150] Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M. Miniemulsion Polymerization with Cationic and Nonionic Surfactants: A Very Efficient Use of Surfactants for Heterophase Polymerization. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2679-2683.
- [151] Pham, Q. T.; Petiaud, R.; Waton, H.; Llauro-Darricades, M.-F. *Proton and carbon NMR spectra of polymers*; CRC Press: Boca Raton, 1991; pp 308f.
- [152] Sütterlin, N. *Polymer Colloids II*; Plenum Press: New York, 1980.
- [153] Goodwin, J. W.; Hearn, J.; Ho, C. C.; Ottewill, R. H. Studies on the preparation and characterisation of monodisperse polystyrene latices III. Preparation without added surface active agents. *Coll. Polym. Sci.* **1974**, *252*, 464-471.
- [154] Herold, M.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M. Polymer nanoparticles with activated-ester surface by using functional surfmers. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 770-778.
- [155] Gruber, H. J.; Kada, G.; Marek, M.; Kaiser, K. Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophoreconjugates in complex, colored biofluids. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1381*, 203-212.
- [156] Kada, G.; Kaiser, K.; Falk, H.; Gruber, H. J. Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1427*, 44-48.

-
- [157] Fujita, K.; Silver, J. Surprising Lability of Biotin-Streptavidin Bond During Transcription of Biotinylated DNA Bound to Paramagnetic Streptavidin Beads. *BioTechniques* **1993**, *14*, 608-617.
- [158] Schiestel, T. unveröffentlichte Ergebnisse: Stuttgart, 2002.
- [159] Wang, S.-W.; Robertson, C. R.; Gast, A. P. Two-Dimensional Crystallization of Streptavidin Mutants. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 7751-7761.
- [160] Pierce Chemical Company, Instructions MagnaBind™ Streptavidin: Rockford, 6/2001; pp 3.
- [161] Streptavidin Magnetic Beads, Technical Bulletin #S2140S(8/26/02); New England Biolabs, Inc.: Beverly (USA), 2002.
- [162] Dynabeads M-280 Streptavidin, Package Insert; Dynal Biotech: Oslo, 2003; pp 8.
- [163] TB262 MagPrep™ Streptavidin Beads; Novagen, Inc.: Madison, 1999; pp 4.
- [164] Weber, A.; Knecht, S.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M. Modularer Aufbau von Biochips durch mikrostrukturierte Abscheidung von funktionellen Nanopartikeln. *Chemie Ingenieur Technik* **2003**, *75*, 437-441.
- [165] Blandamer, M. J. Thermodynamic Background to Isothermal Titration Calorimetry. *Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences*; John Wiley & Sons: Chichester, 1998; pp 5-38.
- [166] Indyk, L.; Fischer, H. F. Theroretical Aspects of Isothermal Titration Calorimetry. *Methods Enzymol.*, 1998; pp 350-364.
- [167] Fisher, F. H.; Singh, N. Calorimetric Methods for Interpreting Protein-Ligand Interactions. *Methods Enzymol.*, 1995; pp 194-221.
- [168] Tarcha, P. J.; Fitch, R. M.; Dumais, J. J.; Jelinski, L. W. Particle morphology of self-hydrolyzed acrylate polymer colloids: a carbon-13 NMR and DSC study. *Journal of Polymer Science, Polymer Physics Edition* **1983**, *21*, 2389-2402.
- [169] Wilson, D. S.; Nock, S. Protein-Mikroarray-Technologie - Prinzipien und neuere Entwicklungen. *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, 510-517.
- [170] Snyder, M. Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips. *Science* **2001**, *293*, 2101-2105.
- [171] MacBeath, G.; Schreiber, S. L. Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.
- [172] Haab, B. B.; Dunham, M. J.; O., B. P. Protein microarrays for highly parallel detection and quantification of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology* **2001**, *2*, 0004.0001-0004.0013.
- [173] Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Möhwald, H.; Kalachev, A. Assembly of Polyelectrolyte Molecular Films onto Plasma-Treated Glass. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 12835-12841.

- [174] Decher, G. Supramolekulare Chemie: Ultradünne Schichten aus Polyelektrolyten. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1993**, *41*, 793-800.
- [175] Decher, G.; Eckle, M.; Schmitt, J.; Struth, B. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1998**, *3*, 32-39.
- [176] Knecht, S. Mikrostrukturierte Anlagerung biofunktionalisierter Nanopartikel mittels Photolithographie, Mikrokontaktstempeln und Mikroarrayer auf Glas-, Silizium- und Goldoberflächen. In *Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik*: Stuttgart, 2002.
- [177] Griffiths, D. G.; Partis, M. D.; Churchill, P.; Brenner, S. C.; Fleischer, S.; Moore, R. J.; Beechey, R. B. The Use of Amphiphatic Maleimides to Study Membrane-Associated Proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **1990**, *22*, 691-707.
- [178] Zhang, M.; Desai, T.; Ferrari, M. Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials* **1998**, *19*, 953-960.
- [179] Malmsten, M.; Emoto, K.; Van Alstine, J. M. Effect of Chain Density on Inhibition of Protein Adsorption by Poly(Ethylene glycol) Based Coatings. *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, *202*, 507-517.
- [180] Yang, Z.; Galloway, J. A.; Yu, H. Protein Interactions with Poly(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayers on Glass Substrates: Diffusion and Adsorption. *Langmuir* **1999**, *15*, 8405-8411.
- [181] König, T.; Skerra, A. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *Journal of Immunological Methods* **1998**, *218*, 73-83.
- [182] Lehmann, M.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M. Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach using molecularly imprinted nanospheres composite membranes. *Desalination* **2002**, *149*, 315-321.
- [183] Geibel, S.; Barth, A.; Amslinger, S.; Jung, A. H.; Burzik, C.; Clarke, R. J.; Givens, R. S.; Fendler, K. P³-[2-(4-hydroxyphenyl-2-oxo)ethyl ATP for the Rapid Activation of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 1346-1357.

11 Lebenslauf

Name:	Marc Herold
Geburtsdatum/-ort:	13.12.1972, Hanau
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1989 - 1992	Besuch des Georg-Christoph-Lichtenberg-Oberstufengymnasiums in Bruchköbel. Notendurchschnitt des Abiturzeugnisses 1,3
WS 92/93 – WS 94/95	Grundstudium im Fach Chemie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
SS 95 – WS 96/97	Chemie-Hauptstudium an der Philipps-Universität in Marburg
8/97 - 5/98	Diplomarbeit auf dem Gebiet der Analytischen Chemie am GKSS Forschungszentrum in Geesthacht (Schleswig-Holstein) bei Prof. B. Neidhart. Thema der Arbeit: "Entwicklung und Charakterisierung eines feststoffverdünnten Multielementstandards"
6/98	Abschluß des Studiums als Diplom-Chemiker und Erhalt des Diplom-Zeugnisses (Note 1,4)
9/98 – 9/99	Zivildienst beim Bremer „Umweltinstitut für Analyse und Bewertung von Schadstoffen e.V."
1.11.99 bis 30.4.03	Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Thema: „Herstellung und Charakterisierung von Aktivester-Nanopartikeln“ am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart (Arbeitsgruppe „Biomimetische Grenzflächen“ von Dr. G. E. M. Tovar).
1.5.03 bis 2004	Post-Doc am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart. Koordination von Forschungsprojekten auf dem Gebiet des „Molekularen Prägens“.